



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

MICHAEL WILLIAMES LEAL QUIRINO

**AVALIAÇÃO DE PROTEÍNAS PROCESSADORAS E LIGADORAS DE FUCOSE E
ÁCIDO SIÁLICO COMO BIOMARCADORES CLÍNICOS E INDICADORAS DE
DESFECHO EM PACIENTES COM ADENOCARCINOMA GÁSTRICO**

Recife

2020

MICHAEL WILLIAMES LEAL QUIRINO

**AVALIAÇÃO DE PROTEÍNAS PROCESSADORAS E LIGADORAS DE FUCOSE E
ÁCIDO SIÁLICO COMO BIOMARCADORES CLÍNICOS E INDICADORAS DE
DESFECHO EM PACIENTES COM ADENOCARCINOMA GÁSTRICO**

Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Inovação Terapêutica
da Universidade Federal de Pernambuco,
para a obtenção do Título de Doutor em
Inovação Terapêutica.

Área de concentração: Fármacos, medicamentos e insumos essenciais para saúde.

Orientador: Prof. Dr. Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo

Coorientadora: Profa. Dra. Michelly Cristiny Pereira

Recife

2020

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Quirino, Michael Willames Leal

Avaliação de proteínas processadoras e ligadoras de fucose e ácido siálico como biomarcadores clínicos e indicadora de desfecho em pacientes com adenocarcinoma gástrico / Michael Willames Leal. - 2020.

81 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo

Coorientadora: Profa. Dra. Michelly Cristiny Pereira.

Doutorado (tese) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica, Recife, 2020.

Inclui referências.

1. Aparelho digestivo – Câncer. 2. Marcadores biológicos de tumor. 3. Imuno-Histoquímica. I. Rêgo, Moacyr Jesus Barreto de Melo (orientador). II. Pereira, Michelly Cristiny (coorientadora). III. Título.

616.994

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2021-012

MICHAEL WILLIAMES LEAL QUIRINO

Recife, 05 de fevereiro de 2020

Tese de Doutorado intitulada “AVALIAÇÃO DE PROTEÍNAS PROCESSADORAS E LIGADORAS DE FUCOSE E ÁCIDO SIÁLICO COMO BIOMARCADORES CLÍNICOS E INDICADORAS DE DESFECHO EM PACIENTES COM ADENOCARCINOMA GÁSTRICO”, defendida por Michael Willames Leal Quirino, e **APROVADA** em 05 de fevereiro de 2020, cuja banca examinadora foi constituída pelos seguintes professores:

Presidente e examinador interno: Prof. Dr. Moacyr Jesus Barreto de Mello Rêgo

(Universidade Federal de Pernambuco)

Assinatura _____

Primeiro examinador externo: Profa. Dra. Luiza Rayanna Amorim de Lima

(Universidade de Pernambuco)

Assinatura _____

Segundo examinador externo: Prof. Dr. Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão

(Universidade Federal de Pernambuco)

Assinatura _____

Terceiro examinador externo: Prof. Dr. Jeymesson Raphael Cardoso Vieira

(Universidade Federal de Pernambuco)

Assinatura _____

Quarto examinador externo Prof. Dr. Luiz Alberto Reis Mattos Júnior

(Universidade Federal de Pernambuco)

Assinatura _____

Dedico este trabalho à minha mãe, Vandira de Castro Leal Quirino (in memoriam), que faleceu no primeiro ano do meu doutorado e não pôde estar presente neste momento tão incrível da minha vida. Seus ensinamentos e valores alimentaram minha alma e conduziram meus passos até aqui. Saudades eternas!

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, pelo dom da vida, que em sua infinita sabedoria colocou força em meu coração para vencer essa etapa de minha vida. A fé no Senhor, sem dúvidas, me ajudou a lutar até o fim.

Aos meus pais Roberto Quirino e Vandira Leal, pelos ensinamentos, força e amor incondicional. Sem vocês a realização desse sonho não seria possível. A Meus irmãos, David, Bárbara e Roberta, meus tios e primos. Todos foram encorajadores, essenciais durante minha formação acadêmica e humana.

Agradeço à minha amada esposa Nathália Leal que jamais me negou apoio, carinho e incentivo. Obrigado, por compartilhar tantos momentos bons e aguentar tantas crises de estresse e ansiedade. Sem você do meu lado esse trabalho não seria possível.

Agradeço, especialmente ao meu orientador Prof. Dr. Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo, por sua dedicação, companheirismo. Obrigado mestre, por exigir de mim muito mais do que eu imaginava ser capaz de fazer. Manifesto aqui minha gratidão por compartilhar sua sabedoria, o seu tempo e sua experiência. Foram mais de 8 anos de convivência, sinto admiração por você e tenho muito orgulho em ser seu primeiro aluno de iniciação científica. Obrigado também por me amparar nos momentos mais difíceis.

A minha coorientadora Profa. Dra. Michelly Cristiny Pereira, por seu apoio, dedicação e carinho. Obrigado por esclarecer tantas dúvidas. Por ter se dedicado tanto em me ajudar nessa reta final, sendo sempre tão amável, atenciosa e paciente, uma pessoa fantástica.

A todos do Linat, Nupit-SG em especial à Profa. Dra. Maira da Rocha Pitta, pela oportunidade de fazer parte do grupo de pesquisa e sempre ter me tratado atenciosamente.

Minha gratidão aos meus amigos de graduação, Flaviana Alves, Edso Henrique, Héctor Dayvson e Taciano França. Vocês são grandes companheiros e foram peças importantes durante minha formação acadêmica. Que nossa amizade permaneça sólida.

Em especial aos amigos que contribuíram grandemente durante o desenvolvimento dessa tese, Maria de Fátima, Antônio Félix e Mário Albuquerque, juntos compartilhamos momentos que irei lembrar com muita alegria e satisfação.

Aos amigos e colegas de todas as horas, Mardonny Chagas, Karlla Mirella, Thuanny Marina, Kamila Melo, Anderson Rodrigues, Lucas Tavares, Lucas Souza, Priscilla Stella,

Lidiane Vasconcelos, Sayonara Gonçalves, Pablo Gualberto, Wanessa Sena, Marina Ferraz, Helena Neta, Maria Clara, Kalebe Silva e Valécia de Cassia por todos os momentos marcantes dentro e fora do laboratório.

Por fim agradeço à UFPE, por me proporcionar um ambiente criativo e amigável para os estudos. Sou grato à cada membro do corpo docente, e a administração dessa instituição de ensino.

“Faz-se ciência com os fatos, como se faz uma casa com pedras; mas uma acumulação de fatos não é ciência, assim como um monte de pedras não é uma casa (POINCARÉ, 1902).”

RESUMO

O câncer gástrico é o quinto tipo de câncer mais frequente no mundo e representa a segunda causa de morte por neoplasias levando a óbito milhares de pessoas por ano. No Brasil surgiram, aproximadamente, 21.290 casos em 2019 no Brasil. Alterações no processo de glicosilação de proteínas contribuem para a progressão do câncer e antígenos glicanos sorológicos, CA-19-9, CEA, CA72-4 e CA-50, os quais são ou foram utilizados para monitorar os pacientes com Neoplasias do trato gastrointestinal em tratamento ou em recorrência. Entretanto, estes marcadores não possuem sensibilidade e especificidade adequada na prática clínica. O presente estudo analisou a marcação de cinco proteínas relacionadas a aspectos glicobiológicos tumorais: NEU3, uma enzima removedora de ácido siálico; ST3GAL3, uma enzima que catalisa a transferência de ácido siálico; SIGLEC-15, uma lectina que se liga ao ácido siálico, o TSTA3, um catalisador envolvido no processo de fucosilação durante a glicosilação das proteínas e a FUCA2, uma enzima envolvida na manutenção da homeostase no metabolismo da fucose. Dada a necessidade novos biomarcadores, esse estudo buscou encontrar novas moléculas que possam ser indicadoras de prognóstico e desfecho em pacientes com câncer gástrico. Foram realizados ensaios de imuno-histoquímica foram realizados em 71 casos de adenocarcinoma gástricos oriundos do Hospital de Câncer de Pernambuco. E os resultados foram associados com parâmetros clínico-patológicos dos pacientes através de análise univariada e multivariada. Foram realizadas análises in silico em três coortes de validação, obtidas no banco de dados cBioPortal.org. A enzima NEU3 apresentou uma relação significativa com metaplasia e neoplasia em comparação com os tecidos normais encontrados nas amostras. Não houve associação significativa da expressão de NEU3 com dados clínicos e patológicos na coorte estudada. A marcação com ST3GAL3 e TSTA3 foi significativamente maior nas amostras de pacientes com o tipo intestinal da classificação de Lauren e valor de p mais evidente nas amostras de menor grau histológico. Para SIGLEC-15 houve associação significativa com estadiamento cirúrgico mais avançado, com graus histológicos bem e moderadamente diferenciado e com a presença de invasão angiolinfática. A FUCA2 foi significativamente relacionada com estadiamento cirúrgico avançado em graus histológicos G1 e G2. Este estudo observou que estas proteínas têm expressão significante quando comparadas com algumas condições clínicas no câncer gástrico, sugerindo que elas podem ser utilizadas como biomarcadores de prognóstico, porém não de desfecho.

Palavras-chave: Biomarcadores; Imuno-histoquímica; Câncer gástrico; Genes glicanos.

ABSTRACT

Gastric cancer is the fifth most common type of cancer in the world and represents the second leading cause of death from neoplasms leading to the death of thousands of people per year. In Brazil, approximately 21,290 cases emerged in 2019 in Brazil. Changes in the protein glycosylation process contribute to cancer progression and serological glycan antigens, CA-19-9, CEA, CA72-4 and CA-50, are or have been used to monitor patients with Neoplasms of the gastrointestinal tract being treated or in recurrence. However, these markers do not have adequate sensitivity and specificity in clinical practice. The present study analyzed the labeling of five proteins related to tumor glycobiological aspects: NEU3, a sialic acid removing enzyme; ST3GAL3, an enzyme that catalyzes the transfer of sialic acid; SIGLEC-15, a lectin that binds to sialic acid, TSTA3, a catalyst involved in the fucosylation process during protein glycosylation and FUCA2, an enzyme involved in maintaining homeostasis in fucose metabolism. Given the need for new biomarkers, this study sought to find new molecules that could be indicative of prognosis and outcome in patients with gastric cancer. For this, immunohistochemistry assays were performed in 71 cases of gastric adenocarcinoma from the Hospital de Cancer de Pernambuco. And the results were associated with patients' clinical-pathological parameters through univariate and multivariate analysis. In silico analyzes were performed in three validation cohorts, obtained from the cBioPortal.org database. The NEU3 enzyme showed a significant relationship with metaplasia and neoplasia compared to the normal tissues found in the samples. There was no significant association between NEU3 expression and clinical and pathological data in the studied cohort. The marking with ST3GAL3 and TSTA3 was significantly higher in samples from patients with the intestinal type of Lauren's classification and more evident in samples of lesser histological grade. For SIGLEC-15 there was a significant association with more advanced surgical staging, with well and moderately differentiated histological grades and the presence of angiolymphatic invasion. FUCA2 was significantly related to advanced surgical staging at histological grades G1 and G2. This study observed that these proteins have significant expression when compared to some clinical conditions in gastric cancer, suggesting that they can be used as prognostic biomarkers but not as outcome.

Keywords: Biomarkers; Immunohistochemistry; Gastric cancer; Glycan genes.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1- TAXA BRUTA DE INCIDÊNCIA ESTIMADAS PARA 2018 EM PERNAMBUCO E RECIFE, DE ACORDO COM O SEXO.	19
FIGURA 2- REPRESENTAÇÃO DOS DEZ MONOSSACARÍDEOS MAIS COMUNS NA ESTRUTURA DOS GLICANOS.	26
FIGURA 3-- MONOSSACARÍDEOS ATIVADOS NAS CÉLULAS ANIMAIS.	27
FIGURA 4-- REAÇÕES DE ATIVAÇÃO DOS MONOSSACARÍDEOS	28
FIGURA 5- DIVERSIDADE DOS GLICOCONJUGADOS.	29
FIGURA 6- MODELO REPRESENTATIVO QUE FAZ UMA ASSOCIAÇÃO DOS PROCESSOS DE GLICOSILAÇÃO ABERRANTE QUE ESTÃO ENVOLVIDOS NO SURGIMENTO DOS DEZ HALMARKS DO CÂNCER, PROPOSTOS HANNAHAN EM 2011.	30
FIGURA 7- MUDANÇAS COMUNS NO PROCESSO DE GLICOSILAÇÃO DE PROTEÍNAS DURANTE A PROGRESSÃO DO CÂNCER.	31
FIGURA 8- ESTRUTURA DO ÁCIDO N-ACETILNEURAMÍNICO (NEU5AC).	32
FIGURA 9- ESTRUTURA DO SLE ^X E DO SEU ISÔMERO SLE ^A	33
FIGURA 10- MODULAÇÃO DO MICROAMBIENTE TUMORAL ATRAVÉS DA LIGAÇÃO DO SIGLEC-15 AO ANTÍGENO S ^{TN}	35

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 11- IMUNO-HISTOQUÍMICA DE NEU3 EM AMOSTRAS DE GC (A) COLORAÇÃO CITOPLASMÁTICA DE METAPLASIA, (B) COLORAÇÃO NUCLEAR (SETA AZUL, A) COLORAÇÃO DA MEMBRANA (SETA AZUL, B), COLORAÇÃO PERINUCLEAR (SETA AZUL, C) E COLORAÇÃO CITOPLASMÁTICA (AZUL SETA, D), 50 MM. 48
- FIGURA 12- IMUNO-HISTOQUÍMICA DE ST3GAL3 EM AMOSTRAS DE GC (A) COLORAÇÃO CITOPLASMÁTICA DE METAPLASIA, (B) COLORAÇÃO CITOPLASMÁTICA DE NEOPLASIA (SETA AZUL, D), BARRA DE ESCALA: 50 MM. 49
- FIGURA 13- IMUNO-HISTOQUÍMICA DE TSTA3 E FUCA2 EM AMOSTRAS DE GC. (A, TSTA3) A COLORAÇÃO CITOPLASMÁTICA, (B COLORAÇÃO DA MEMBRANA, C) COLORAÇÃO PERINUCLEAR, D) COLORAÇÃO NUCLEAR. (B, FUCA2) E), COLORAÇÃO DA MEMBRANA, F), COLORAÇÃO CITOPLASMÁTICA, G), COLORAÇÃO PERINUCLEAR, H) COLORAÇÃO NUCLEAR. BARRA DE ESCALA: 50 MM. 53
- FIGURA 14-IMUNO-HISTOQUÍMICA DE SIGLEC15 EM AMOSTRAS DE GC (A) COLORAÇÃO DA MEMBRANA, (B) COLORAÇÃO CITOPLASMÁTICA E NUCLEAR, (C) METAPLASIA POSITIVA D) CÉLULAS MIELOIDES NO MICROAMBIENTE, BARRA DE ESCALA: 50 MM. 56

LISTA DE TABELAS

TABELA 1- ESTADIAMENTO TNM SEGUNDO AMERICAN JOINT COMMITTEE ON CANCER (AJCC).	23
TABELA 2- CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS DOS PACIENTES COM ADENOCARCINOMA GÁSTRICO.	46
TABELA 3- COMPARAÇÃO PAREADA DA COLORAÇÃO DE NEU3 EM CÉLULAS NEOPLÁSICAS, NÃO TRANSFORMADAS E TECIDO GÁSTRICO ADJACENTE COM METAPLASIA.	48
TABELA 4- ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE ST3GAL3 COM CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS DE PACIENTES COM CÂNCER GÁSTRICO.....	50
TABELA 5- ANÁLISE DE REGRESSÃO UNIVARIADA E MULTIVARIADA DA CLASSIFICAÇÃO DE LAUREN EM PACIENTE GC.....	52
TABELA 6- ANÁLISE DE REGRESSÃO UNIVARIADA E MULTIVARIADA DA CLASSIFICAÇÃO DE LAUREN EM PACIENTES COM GC.....	54
TABELA 7- COMPARAÇÃO EMPARELHADA DA COLORAÇÃO DE FUCA2 EM CÉLULAS NEOPLÁSICAS, TECIDO GÁSTRICO ADJACENTE NÃO TRANSFORMADO E METAPLASIA.	54
TABELA 8- COMPARAÇÃO EMPARELHADA DA COLORAÇÃO SIGLEC15 EM CÉLULAS NEOPLÁSICAS, TECIDO GÁSTRICO ADJACENTE NÃO TRANSFORMADO E METAPLASIA.	56
TABELA 9- ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE SIGLEC15 COM CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS DE PACIENTES COM CÂNCER GÁSTRICO.....	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BCAT1	Branched Chain Amino Acid Transaminase 1
CG	Câncer gástrico
CMP	Neu5Ac- CMP-Sialic Acid
DAP12	syk, por ligação do SIGLEC-15 dos TAMs ao antígeno sTn d
DNA	Ácido desoxiribonucleico
ERK-CREB	Extracellular signal-regulated kinases (ERK)- cAMP response element binding protein (CREB)
FDA	Food and Drug Administration
FoxP3	Forkhead box P3
FUC	Fucose
GAL	Galactose
GalNac	N-acetilgalactosamina
GLC	Glicose
GlcA	Ácido glicurônico
GlcNAc	N-acetilglicosamina
HPV	Papilomavírus humano
IdoA	Ácido idurônico
lncRNA	Long non-coding RNA
MAN	Canose (Man)
M-CSF	Colony stimulating factor 1
MiRNA	(small non-coding RNA),
MUC6	Mucina 6
NEK3	NIMA related kinase 3
Neu5Ac	ácido 5-N-acetilneuramínico
NTP	Nucleosídeo trifosfato
PDGF	Platelet-derived growth factor
RNA	Ribonucleic acid
SAMPs	self-associated molecular patterns
Ser	Serina
SiRNA	Small interfering RNA

SLeX	Sialil-LewisX
STn	Sialil-Tn
ST	Sililtransferases
TACAS	Tumour-associated carbohydrates antigens),
TAMs	Macrophages associated tumor
TGF- β	Transforming growth factor
TGF- β 1	Transforming growth factor beta 1
Thr	Treonina
Tn	Antígeno Thomsen-nouvelle
TNM	Abreviação de tumor, nódulo, metástase
UDP	GAlNAc- Uridina difosfato-N-acetil-D-galactosamina
UDPGlcNAc	Uridina difosfato-N-acetil-D-glicosamina
UDP-GlcNAc	Uridine diphosphate N-acetylglucosamine
Xyl	Xilose
α GlcNAc	α - N-acetylglucosamin

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1 O CÂNCER GÁSTRICO.....	18
2.2 BIOMARCADORES NO CÂNCER.....	23
2.3 GLICOBIOLOGIA DO CÂNCER GÁSTRICO.....	25
2.4 O ÁCIDO SIÁLICO.....	32
2.5 SIGLEC (SIALIC ACID-BINDING IMMUNOGLOBULIN-LIKE LECTINS).....	34
2.6 NEU3 (NEURAMINIDASE-3).....	36
2.7 ST3GAL3 (B-GALACTOSÍDEO A2,3-SIALYLTRANSFERASE).....	36
2.8 FUCOSILAÇÃO.....	37
2.9 TSTA3 (TISSUE-SPECIFIC TRANSPLANTATION ANTIGEN 3).....	39
2.10 FUCA2 (ALFA-L-FUCOSIDASE-2).....	39
3 OBJETIVO GERAL	41
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	41
4 METODOLOGIA.....	42
5 RESULTADOS.....	45
6 DISCUSSÃO GERAL.....	60
7 CONCLUSÕES.....	69
REFERÊNCIAS.....	70

1 INTRODUÇÃO

O câncer gástrico (CG) é o quinto tipo de tumor mais comum no mundo e representa a segunda maior taxa de mortalidade quando comparado com outras neoplasias. Anualmente, morrem cerca de 7 milhões de pessoas por GC, o que representa 17% das mortes por câncer que ocorrem globalmente (BRAY et al., 2018).

A gênese do CG está intimamente ligada a alguns fatores de risco específicos, como hábitos alimentares ricos em sal e produtos defumados, além do tabagismo e etilismo. Porém, o maior agente influenciador das alterações neoplásicas no epitélio gástrico é a bactéria *Helicobacter pylori* que consegue vencer a proteção natural formada pelo suco gástrico e mucinas e induz o processo inflamatório crônico (TSUDA et al., 2017).

O diagnóstico do CG é comumente tardio e a endoscopia digestiva é o padrão ouro na prática clínica. Histologicamente, a classificação de Lauren proposta em 1965, divide o câncer gástrico em intestinal e difuso. O tipo intestinal está mais relacionado a gastrite crônica e a metaplasia intestinal e possui prognóstico mais favorável enquanto o tipo difuso representa pequenos grupos celulares que infiltram no estroma sem formar uma massa tumoral. Nessa classificação, o melhor indicativo de prognóstico é a profundidade, a extensão do envolvimento nodal e a presença ou ausência de metástases (LAUREN, 1965; PRIYADHARSHINI et al., 2017). Alguns antígenos glicosilados (CA-19-9, CEA, CA72-4 e CA-50) podem ser utilizados para monitorar pacientes em tratamento ou em recorrência. Entretanto, a limitação constituída pela falta de sensibilidade e especificidade adequada não os tornam tão efetivos quando são utilizados durante o diagnóstico precoce (MEREITER et al., 2016).

Diante das limitações encontradas nos biomarcadores estabelecidos na clínica, é necessário encontrar biomoléculas que sejam ferramentas de prognóstico, diagnóstico e monitoramento de neoplasias. Nesse contexto, as glicomoléculas podem ser utilizados como biomarcadores pois estão envolvidos em funções biológicas importantes: adesão celular, migração, sinalização e reconhecimento pelo sistema imune. Estes glicoconjugados estão alterados no câncer e são um marco nas transformações malignas. Existem duas classes principais de glicanos presentes em glicoproteínas: os O-glicanos e N-glicanos. Essas glicoproteínas podem ser modificadas terminalmente por fucosilação e sialilação. A glicosilação não obedece a modelos pré-estabelecidos, pois é regulada por diferentes fatores e pode variar de acordo com as mudanças fisiológicas e/ou patológicas (PINHO; REIS, 2015). Particularmente existe um consenso de que no câncer gástrico, ocorre expressão de O-glicanos

truncados, sialilados e fucosilados e que essas estruturas contribuem para a progressão tumoral e metástase (MEREITER et al., 2016).

Algumas glicomoléculas participam da biossíntese de glicanos, este estudo se propôs a avaliar a expressão de cinco proteínas (NEU3, SIGLEC-15, ST3GAL3, TSTA3 e FUCA2) que participam de processos importantes, relacionados a sialilação e fucosilação de glicoproteínas. A NEU 3 remove o ácido siálico dos glicosfingolípidos e sua atividade anormal tem sido associada a uma variedade de doenças, incluindo distúrbios de armazenamento lisossômico, doenças cardiovasculares e câncer (TAKAHASHI et al., 2015); O SIGLEC-15 é uma lectina do tipo imunoglobulina que atua como um aglutinante de ácido siálico e pode ser superexpressa em muitos cânceres humanos e é um alvo candidato à imunoterapia contra o câncer (WANG et al., 2019); O ST3GAL3 age catalisando a transferência de ácido siálico para o ácido CMP-siálico para substratos contendo galactose, sua expressão aumentada já foi identificada em câncer de mama e hepático (HEBBAR et al., 1999; USLUPEHLIVAN; ŞENER; İZZETOĞLU, 2019); O TSTA3, é uma proteína de ligação ao NADP(H) que catalisa reações de epimerase e redutase, no metabolismo de GDP-D manose, convertendo GDP-4-ceto-6-D-desoximanose para GDP-L-fucose. E a FUCA2 que desempenha um papel oposto ao TSTA3, é uma enzima lisossômica essencial no processo de degradação da alfa-1-fucose dos substratos (ANGATA et al., 2007; KIZUKA et al., 2017a). Ela está relacionada à transformação oncogênica, invasão linfática e vascular, e sua expressão também está associada ao escape e a tolerância imunológica. Esse estudo teve o objetivo de investigar a possível utilização dessas proteínas como marcadores prognóstico e de desfecho no câncer gástrico.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 O CÂNCER GÁSTRICO

O câncer é resultado de alterações multifatoriais envolvendo mudanças genéticas e influências ambientais. As células que sofreram o processo de transformação maligna (carcinogênese) podem modular funções biológicas ao seu favor. Geralmente, essas células ou grupos de células formam tecidos de massa tumoral (sólidos) com capacidade, muitas vezes, de se destacar (migração) e invadir tecidos adjacentes ou mesmo distantes do sítio primário do tumor (ROESCH-DIETLEN et al., 2018a).

As metástases, por sua vez, representam a principal causa de morte por câncer (ARTHMAR et al., 2013), pois estão associadas ao alto grau de agressividade do tumor e sinalizam o diagnóstico tardio ou progressão da doença, aumentando o tempo de tratamento bem como as manobras terapêuticas e reduzindo as chances de cura (KUO; LE, 2014).

Em 2018, foi responsável por mais de 1.000.000 de novos casos. O CG apresenta a terceira maior taxa de mortalidade por câncer entre todos os tipos de câncer existentes sendo duas vezes mais alta nos homens do que nas mulheres (BRAY et al., 2018). A incidência geográfica é muito variada, mas cerca da metade dos casos ocorrem na Ásia, especialmente em países da Ásia oriental, na China, Coréia, Mongólia e Japão, seguidos pela América latina, Europa central e oriental, enquanto que América do Norte e Europa ocidental o número de casos é menor (BRAY et al., 2018; COSTA; GIL DA COSTA; MEDEIROS, 2018; PAN et al., 2017).

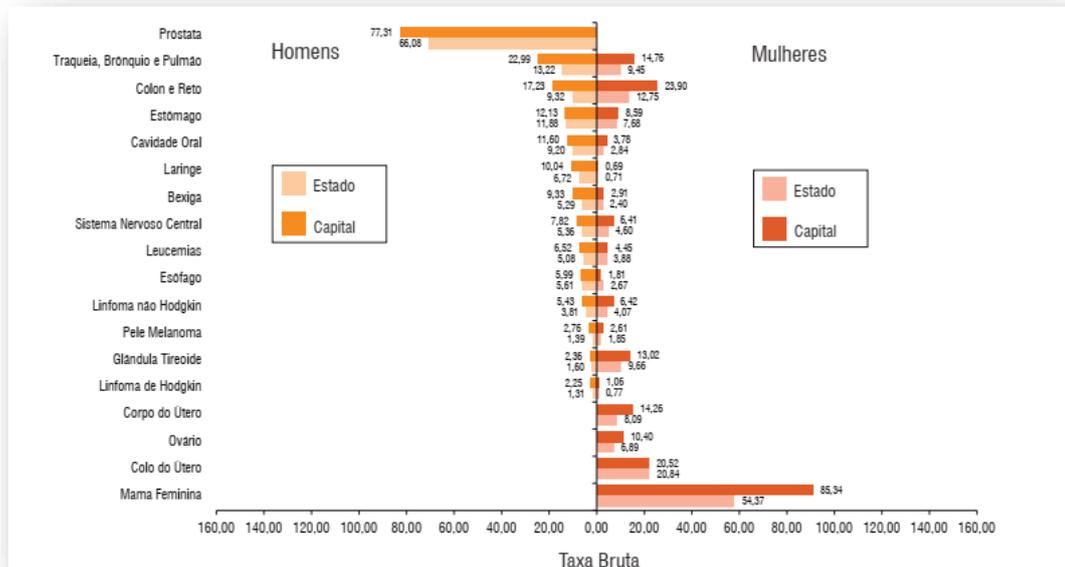
Nos últimos 50 anos ocorreu uma redução da taxa de incidência global do CG. Em 2012 foram estimados cerca de 952 mil casos e 723 mil mortes em todo o mundo. No ano de 2015, foram diagnosticados 1.113.000 casos, representando 7,5% de todos os cânceres naquele ano. No Brasil, em 2015, ocorreram 9.132 óbitos de homens e 5.132 de mulheres (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2017; MAY, 2014).

Para o Brasil, estima-se que surgiram 21.290 casos entre 2018 e 2019, 13,540 casos entre homens e 7.750 em mulheres. Para o trênio 2020-2022, estima-se um total de 13.360 casos novos para homens e 7.870 para mulheres (INCA, 2020).

É o quarto tipo de tumor mais incidente entre os homens e o sétimo entre mulheres. É o segundo mais frequente nas Regiões Norte (12,35/100 mil) e Nordeste (11,17/100 mil), sem

considerar os tumores de pele não melanoma. Em Pernambuco é quarto mais comum em homens e o oitavo entre as mulheres (Figura 1).

Figura 1- Taxa bruta de incidência estimadas para 2018 em Pernambuco e Recife, de acordo com o sexo.



Fonte: (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2017).

A origem do CG é resultado da interação de fatores genéticos e ambientais, doenças crônicas e/ou como fruto a uma resposta inflamatória contínua. Muitas vezes essa inflamação é provocada por infecções microbianas que tem grande impacto no início da doença como também na progressão do tumor e na resposta ao tratamento (COSTA; GIL DA COSTA; MEDEIROS, 2018). Fatores de risco específicos aumentam a probabilidade de desenvolvimento de tumor gástrico: dieta rica em sal e alimentos contaminados com agrotóxicos e fertilizantes. Porém o maior agente influenciador das alterações neoplásicas no epitélio gástrico, é a bactéria *Helicobacter pylori* que consegue vencer a proteção natural formada pelo suco gástrico e mucinas e induzir processo inflamatório crônico (PLUMMER et al., 2015).

Esses microrganismos expressam lipopolissacarídeos que carregam determinantes do grupo sanguíneo de Lewis, mimetizando os padrões sanguíneos, escapando da resposta imune, mantendo dessa forma a colonização assintomática. *H. pylori* também expressa adesinas que reconhecem receptores de glicanos, expressos no epitélio gástrico, gerando gastrite, atrofia,

metaplasia e úlceras. Uma sequência que potencialmente culmina no câncer gástrico, por isso, é a principal via de desenvolvimento deste tumor (PINHO et al., 2013).

H. pilory também produz insuficiência nutricional por competir pelos micronutrientes essenciais, além de provocar uma resposta inflamatória crônica que reduz a liberação de ácido clorídrico e enzimas, dessa forma impedem a solubilização dos sais minerais e conseqüentemente dificultam sua absorção (HU et al., 2018a). As infecções crônicas provocadas pelo agente *Helicobacter pylori* também são responsáveis pelo surgimento do linfoma gástrico primário, o linfoma mais frequente nessa localização que representa cerca de 5% das neoplasias gástricas primárias (JANSSEN, 2009; LEE et al., 2016). Outros agentes microbianos também podem desencadear o surgimento da doença como pela infecção com o vírus de *Epstein barr* que entra em contato com a célula epitelial gástrica através do contato com o linfócito infectado com o vírus. No CG o *Epstein barr* está associado a um subtipo específico denominado carcinoma gástrico com estroma linfoide (NISHIKAWA et al., 2018).

A deficiência em ferro também pode ser um fator predisponente ao câncer gástrico, pois pode aumentar o estresse oxidativo e o dano ao DNA (PRA et al., 2009). Alguns estudos também mostram que existe uma relação de incidência e mortalidade do câncer gástrico com a exposição aos metais tóxicos como, chumbo, arsênico, mercúrio e cádmio (HU et al., 2018a; YUAN; YANG; LI, 2016).

Dos subtipos histológicos, o adenocarcinoma gástrico é o mais comum, representando mais de 95% de todas neoplasias ligadas ao estômago. Alguns estudos também apresentam o HPV como um agente indutor de câncer de estômago, sendo responsável por etapas tardias da doença, entretanto ainda é necessário que sejam realizados estudos específicos que esclareçam seu papel nessa carcinogênese (COSTA; GIL DA COSTA; MEDEIROS, 2018; DE LIMA et al., 2012).

O TCGA (The Cancer Genome Atlas) fez a classificação molecular do câncer gástrico a partir análises de sequenciamento do DNA, RNA e matrizes de proteínas. Atualmente essa classificação divide o câncer gástrico em quatro subtipos de acordo com as alterações genéticas identificadas que são importantes para elucidar os processos relacionados a carcinogênese de cada subtipo, são eles (RIQUELME et al., 2015):

1-Subtipo positivo para o vírus *Epstein barr* (EBV), que compreende 9 a 10% dos adenocarcinomas gástricos e tem uma tendência menor de metástases linfonodais e menor mortalidade em diferentes populações. Nesse subtipo em cerca de 80% dos casos são encontradas mutações *PIK3CA*, que é o segundo gene mutante mais comum em muitos tipos

de câncer. Além disso são encontradas amplificações de *JAK2*, *CD274*, *PDCD1LG2* e *ERBB2* e deleções em *PTEN*, *SMAD4*, *CDKN2A* e *ARID1A*.

2- Subtipo de instabilidade de microssatélites (MSI), O MSI é um dos principais fenótipos da instabilidade genômica e tem sido associado a pacientes do sexo feminino em idades avançadas. Pacientes com esse subtipo geralmente são caracterizados pelo acúmulo de mutações em *PIK3CA*, *ERBB3*, *ERBB2* e *EGFR* além de mutações presentes em sítios de 'hotspot'. A principal causa de MSI no CG envolve hipermetilação do promotor *MLH1*, um dos genes envolvidos no reparo e incompatibilidade de DNA. O nível de MSI no câncer gástrico pode ser classificado em alto e baixo (MSI-H e MSI-L, respectivamente), o MSI-H é geralmente associado ao adenocarcinoma do tipo intestinal, de melhor prognóstico do que o MSI-L e que os tumores MSS, sem instabilidade de microssatélites.

3- Subtipo genomicamente estável (GS), esse subtipo foi mais relacionado ao adenocarcinoma do tipo difuso. Está relacionado ao diagnóstico em pacientes mais jovens, baixa mutação no *TP53* e em baixo grau de aneuploidia. Também foram encontradas mutações nos genes *CDH1* e *RHOA*. Mutações em *CDH1* estão associadas ao CG do tipo difuso hereditário, fenótipo pouco diferenciado e mau resultado clínico e mutações em *RHOA* está associado a alterações morfológicas e migração celular. As mutações nesse subtipo estão mais relacionadas a adesão celular.

4- Subtipo cromossômico instável (NIC), cerca de 50% dos CGs estão associados a NIC e 71% desses apresentam mutações no gene *TP53*, e nos genes *ARID1A*, *KRAS*, *PIK3CA*, *RNF43*, *ERBB2* e *APC*. Também ocorre fosforilação do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) e amplificação do gene que codifica o VEGFA e de mediadores do ciclo celular (*CCNE1*, *CCND1* e *CDK6*), além disso são encontradas amplificações genômicas de genes que codificam receptores de tirosina quinases (RTKs), importantes para o crescimento celular descontrolado.

No que se refere a diagnóstico uma grande barreira é a falta de sintomas claros da doença, em sua maioria os casos são diagnosticados em estados avançados, onde a taxa de sobrevivência gira em torno de 15 a 30% em 5 anos, uma porcentagem considerada baixa, especialmente por causa do diagnóstico tardio (LISTINSKY; SIEGAL; LISTINSKY, 2011).

O diagnóstico do CG inicia com o histórico clínico do paciente, através da avaliação de sinais, sintomas e histórico familiar. O estadiamento clínico é de suma importância para um tratamento adequado. Fazem parte dos exames de estadiamento: exames de laboratório, endoscopia digestiva alta, incluindo biópsia das lesões, tomografia de abdome, tórax com

contraste oral e venoso, e ressonância magnética. A classificação TNM (Tabela 1) que indica qual o estágio histopatológico do tumor, é o principal determinante do plano de tratamento, pois é um forte preditor de sobrevida e recorrência da doença (LUDWIG et al., 2018; SHEN, 2013).

O tratamento do câncer ainda é um desafio, apesar das diferentes formas de tratamento existentes, que incluem procedimentos cirúrgicos, além de quimioterapia, radioterapia, terapia hormonal e terapia alvo molecular (XIE et al., 2016). Embora seja o tratamento mais utilizado, a quimioterapia não apresenta especificidade, ou seja, células tumorais e normais são atingidas, promovendo diversos efeitos colaterais. Os agentes quimioterápicos existentes são pouco solúveis, possuem um curto índice terapêutico, fraca farmacocinética e muitos têm sua atividade limitada pela resistência das células neoplásicas (RWEI; WANG; KOHANE, 2015; SUN et al., 2017).

A ressecção endoscópica cirúrgica com linfadenectomia regional e a gastrectomia total representam o tratamento padrão caso não haja metástases detectadas, para os pacientes que não podem passar por esse tratamento, a alternativa é a quimioterapia (HUANG et al., 2018). O paciente pode fazer também radioterapia e quimioterapia neoadjuvante.

Tabela 1- Estadiamento TNM segundo American Joint Committee on Cancer (AJCC).

ESTÁDIO	SOBREVIDA EM 5 ANOS (%)		
TUMOR PRIMÁRIO (T)			
TX		TUMOR PRIMÁRIO NÃO ACESSÍVEL	
TO		SEM EVIDÊNCIAS DE TUMOR PRIMÁRIO	
Tis		CARCINOMA <i>IN SITU</i> : TUMOR INTRAEPITELIAL SEM INVASÃO DE LÂMINA PRÓPRIA	
T1		TUMOR INVADE LÂMINA PRÓPRIA, MUSCULAR DA MUCOSA OU SUBMUCOSA	
T1a		TUMOR INVADE LÂMINA PRÓPRIA OU MUSCULAR DA MUCOSA	
T1b		TUMOR INVADE SUBMUCOSA	
T2		TUMOR INVADE MUSCULAR PRÓPRIA	
T3		TUMOR PENETRA TECIDO CONECTIVO DA SUBSEROZA SEM INVASÃO DE PERITÔNIO VISCERAL OU ESTRUTURAS ADJACENTES	
T4		TUMOR INVADE SEROSA (PERITÔNIO VISCERAL) OU ESTRUTURAS ADJACENTES	
T4a		TUMOR INVADE SEROSA	
T4b		TUMOR INVADE ESTRUTURAS ADJACENTES	
LINFONODOS REGIONAIS (N)			
NX		LINFONODOS REGIONAIS NÃO ACESSÍVEIS	
N0		AUSÊNCIA DE METÁSTASES EM LINFONODOS	
N1		METÁSTASES EM 1-2 LINFONODOS REGIONAIS	
N2		METÁSTASES EM 3-6 LINFONODOS REGIONAIS	
N3		METÁSTASES EM ≥ 7 LINFONODOS REGIONAIS	
N3a		METÁSTASES EM 7-15 LINFONODOS REGIONAIS	
N3b		METÁSTASES EM ≥ 16 LINFONODOS REGIONAIS	
METÁSTASES À DISTÂNCIA (M)			
M0		AUSÊNCIA DE METÁSTASES À DISTÂNCIA	
M1		METÁSTASES À DISTÂNCIA	
ESTÁDIO		T	N M
ESTÁDIO 0		Tis	N0 M0
ESTÁDIO I a		T1	N0 M0
ESTÁDIO I b		T2	N0 M0
		T1	N0 M0
ESTÁDIO II a		T3	N0 M0
		T2	N1 M0
		T1	N2 M0
ESTÁDIO II b		T4a	N0 M0
		T3	N1 M0
		T2	N2 M0
		T1	N3 M0
ESTÁDIO III a		T4a	N1 M0
		T3	N2 M0
		T2	N3 M0
ESTÁDIO III b		T4b	N0 M0
		T4b	N1 M0
		T4a	N2 M0
		T3	N3 M0
ESTÁDIO III c		T4b	N2 M0
		T4b	N3 M0
		T4a	N3 M0
ESTÁDIO IV		QUALQUER T	QUALQUER N M1

Fonte: (Adaptado de COUTINO, 2013)

2.2 BIOMARCADORES NO CÂNCER

Biomarcador é uma característica que pode ser medida e avaliada como indicadores de processos biológicos normais ou patogênicos, ou uma resposta farmacológica a intervenção terapêutica. Eles podem ser usados clinicamente para diagnóstico, prognóstico, progressão que inclui estadiamento e a extensão da doença e na resposta terapêutica à intervenção (SHELBY D. MELTON, ROBERT M. GENTA, 2011).

Selecionar e validar uma molécula como biomarcador são etapas importantes que avaliam especificidade e sensibilidade, observando os efeitos decorrentes à exposição inicial.

Sendo assim, para eleger um novo indicador biológico, algumas características devem ser observadas: a quantificação do biomarcador deve refletir a interação do sistema biológico com a substância química com sensibilidade e especificidade conhecidas; estar contido no meio biológico tornando-se acessível para análise e ter conhecimento dos valores normais do indicador em população não exposta aos agentes (YOCCOZ; NICHOLS; BOULINIER, 2003).

Algumas das alterações mais importantes provocadas por agentes infecciosos são evidenciadas no curso da infecção por *Helicobacter pylori* (VIANNA; ALMEIDA DA SILVA; BASTOS RAMIS, 2016). O *H. pylori*, coloniza o muco e adere-se ao epitélio gástrico por meio de adesinas que reconhecem receptores superficiais. Essas interações favorecem a adaptação do parasita e progressão da infecção, que está associada à patogênese de gastrite, doença péptica e câncer gástrico.

A pesquisa acerca de novos biomarcadores que sejam indicadores efetivos da presença do CG tem avançado consideravelmente, especialmente no que tange a estudos sobre as alterações genéticas no desenvolvimento e progressão deste tumor, o que é de suma importância no prognóstico. Alguns estudos têm se dedicado a analisar as alterações que ocorrem nas mucinas. Outros estudos se dedicam a analisar vias específicas que podem influenciar no crescimento celular (FERREIRA et al., 2017; HÄUSELMANN; BORSIG, 2014).

Mesmo com todos os avanços na pesquisa, ainda não existe exames séricos específicos para o câncer gástrico, sendo a endoscopia o padrão-ouro na prática clínica. Os antígenos glicanos sorológicos CA-19-9, CEA, CA72-4 e CA-50 são utilizados para monitorar pacientes com neoplasias do trato gastrointestinal em tratamento ou em recorrência. Entretanto eles não possuem sensibilidade e especificidade adequada na prática clínica, por isso não são efetivos quando usados na tentativa de um diagnóstico precoce (MEREITER et al., 2016).

Outra classe de biomarcadores que vem ganhando atenção são os RNA não codificadores, os lncRNA (do inglês: Long non-coding RNA) e miRNA (small non-coding RNA), são exemplos: a possível utilização do lncRNA- lncUECG1 no diagnóstico do ECG (Early gastric câncer), (LIN et al., 2018). Outro estudo sugere o miRNA-146b rs1536309 como um biomarcador associado a uma maior taxa de sobrevida (HU et al., 2018b) (WANG et al., 2018), lncRNA HOTAIR (do inglês, Hox Transcript Antisense Intergenic RNA) no plasma com mais de 80% de sensibilidade e especificidade para CG não invasivo, demonstrando ser um potencial biomarcador não invasivo (ELSAYED et al., 2018).

São outros exemplos de possíveis biomarcadores, a expressão de aquaporina e seus diferentes transcritos podem ser indicadores de uma maior/menor sobrevida global (THAPA et

al., 2018). A superexpressão de NEK3 e BCAT1 como indicadores de mau prognóstico (CAO et al., 2016; XU et al., 2018). Como também a utilização da Troponina L2 como biomarcador específico para previsão de metástase peritoneal (SAWAKI et al., 2018). Em outro estudo Yamanoi. et al., 2018, discute se os níveis reduzidos de glicosilação α GlcNAc na MUC6 estariam ligados ao potencial maligno e a progressão do CG (YAMANOI; NAKAYAMA, 2018).

Estes são apenas alguns dos estudos atuais que mostram como os cientistas estão em uma busca constante de novas moléculas com grande potencial de serem biomarcadores de prognóstico ou diagnóstico precoce, do CG.

A pesquisa em torno desses biomarcadores contempla as modificações de glicoconjugados (glicolipídeos, glicoproteínas) que representa um marco no contexto geral do câncer. Quando o processo de glicosilação de proteínas é interrompido ocorrem expressões incorretas de cadeias curtas de carboidratos truncados (imaturas) que são conhecidos como antígenos carboidratos associados ao tumor (TACAS- do inglês tumour-associated carbohydrates antigens), que podem ser N-glicosilados: antígeno Lewis^x, Lewis^A, sialil-Lewis^x, sialil-Lewis^A; O-glicosilados: ThomsenFriedenreich, antígenos T, Tn e suas formas sialiladas sT e sTn. Esses antígenos são encontrados na superfície celular em diferentes carcinomas ou expressos em proteínas circulantes. (CAMPOS et al., 2015).

Diversas enzimas participam dos eventos biológicos envolvidos na biossíntese dessas estruturas, tais como sialidases; catalizadores que produzem substrato para fucosiltransferases envolvidas na expressão de muitos glicanos, além de lectinas tipo imunoglobulinas que atuam como ligantes de ácidos siálicos (Siglecs). O estômago é um órgão rico em enzimas processadoras de glicano que por sua vez constituem um conjunto de potenciais biomarcadores (FERREIRA et al., 2017; REIS et al., 2010).

2.3 GLICOBIOLOGIA DO CÂNCER GÁSTRICO

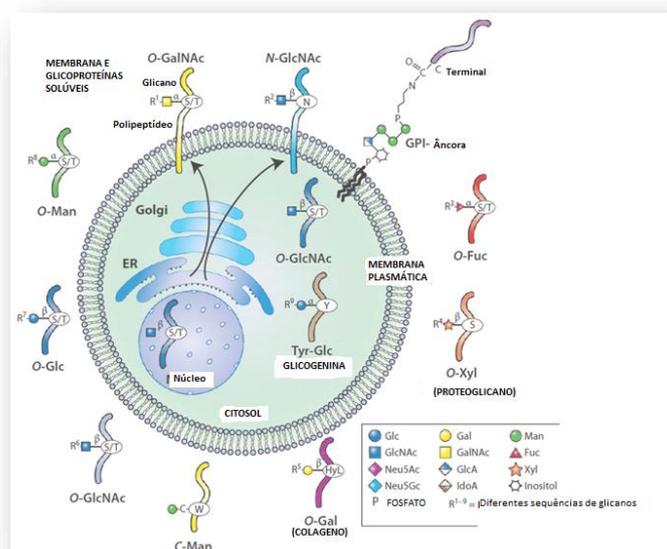
A glicobiologia é o estudo da estrutura, biossíntese, degradação e evolução dos sacarídeos, que são amplamente distribuídos na natureza. É um dos campos com maior crescimento na área das ciências naturais com grande relevância na pesquisa básica, biotecnologia e biomedicina. Atualmente tem recebido a devida importância na pesquisa do câncer, graças ao seu papel na explicação dos vários mecanismos que ocorrem na carcinogênese como também ocorre em outras doenças humanas. Os avanços nas pesquisas glicobiológicas

vêm fornecendo um conjunto variado de ferramentas importantes no diagnóstico e na formulação de estratégias terapêuticas (SHARMA et al., 2018).

A glicosilação funciona como um mecanismo regulador enzimático que produz ligações glicosídicas entre sacarídeos, proteínas e lipídios, que atuam em variados processos fisiológicos e patológicos. A glicosilação é responsável por modificações pós-traducionais complexas em diversas proteínas. Essas modificações garantem o enovelamento, tráfico e a estabilidade de mais de 50% das proteínas. A glicosilação per se ocorre no retículo endoplasmático e complexo de golgi e são orquestrados por transportadores, glicosiltransferases e glicosidases que conferem às proteínas propriedades importantes e permitem que suas funções sejam realizadas corretamente. As funções biológicas fundamentais dos glicoconjugados compreendem: adesão celular, migração, sinalização e reconhecimento imune, comunicação célula-célula e célula matriz (HIRSCHBERG, 2018).

Existem dez monossacarídeos mais comuns nos humanos que compõem a estrutura dos glicanos, são eles: N-acetilglicosamina (GlcNAc), N-acetilgalactosamina (GalNAc), ácido 5-N-acetilneuramínico (Neu5Ac ou ácido siálico), fucose (Fuc), galactose (Gal), glicose (Glc), ácido glicurônico (GlcA); ácido idurônico (IdoA); manose (Man) e xilose (Xyl) (Figura 2), as ligações dos glicanos às proteínas podem ser ramificadas com outros monossacarídeos por ligação a cadeias laterais.

Figura 2- Representação dos dez monossacarídeos mais comuns na estrutura dos glicanos.



Fonte: (Adaptado de WANG et al., 2015).

Para serem ativados como doadores para formação dos glicanos, são necessários nucleosídeos, como NDP-nucleosídeo difosfato, NTP-nucleosídeo trifosfato, UTP-uridina trifosfato e GTP-trifosfato de guanosina, e um glicosil-1-P, (um monossacarídeo com um fosfato no carbono anomérico), que funcionam como fonte de energia no processo de ativação (Figura 3).

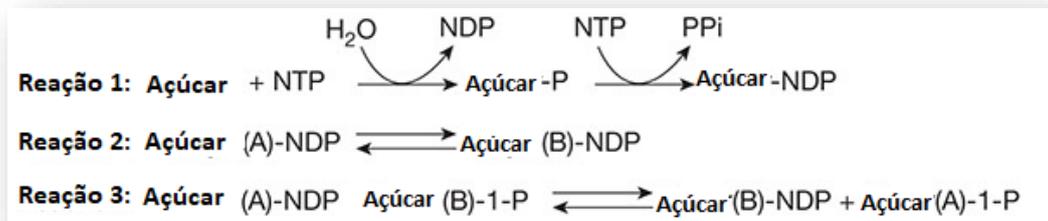
Figura 3-- Monossacarídeos ativados nas células animais.

Monossacarídeo	Forma ativada
Glc	UDP-Monossacarídeo
Gal	
GlcNAc	
GalNAc	
GlcA	
IdoA	
Xyl	
Man	GDP-Monossacarídeo
Fuc	
Neu5Ac	CMP-Neu5Ac

Fonte: O autor (2020).

Para ser doador glicosil o monossacarídeo deve assumir uma forma altamente energética, a partir da reação entre o nucleosídeo trifosfato (NTP) e o glicosil monofosfato. A ativação dos monossacarídeos pode ocorrer de três formas (Figura 4) por intermédio de uma quinase (Reação 1), por epimerização direta (Reação 2) ou por reação de troca de nucleotídeos (Reação 3) (FREEZE, 2013).

Figura 4-- Reações de ativação dos monossacarídeos



Fonte: (Adaptado de FREEZE, 2013)

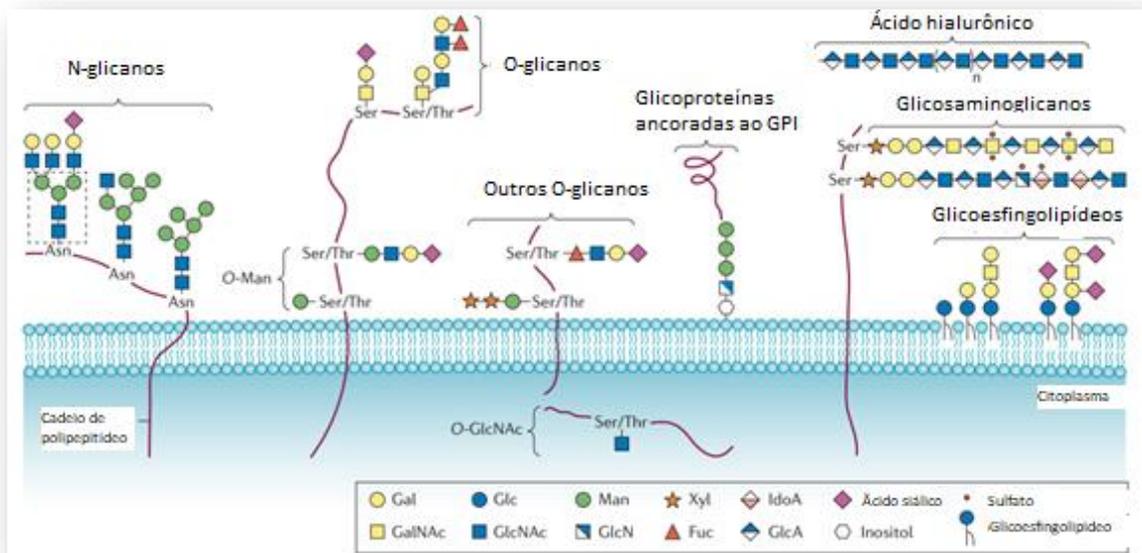
Os monossacarídeos ativados são classificados de acordo como o tipo de nucleosídeo que formam, Difosfato de uridina- (UDP- Glc, UDP-Gal, etc), Difosfato de guanidina (GDP-Man, GDP-Fuc) e Monofosfato de citosina (CMP-Neu5Ac), o ácido siálico é o único monossacarídeo presente nos animais que são ativados como monofosfato de nucleotídeos e não difosfatos (Figura 6) (VARKI, 2017; WANG et al., 2015).

Os monossacarídeos glicose e frutose são a principal fonte de carbono e energia para todos os organismos. O metabolismo celular está intimamente ligado ao processo de ativação dos monossacarídeos. Um exemplo, é a conversão de glicose em piruvato, durante a glicólise. Na glicólise ocorre formação de frutose-6-fosfato, que por sua vez é importante para formação de UDPGlcNAc (Uridina difosfato-N-acetil-D-glicosamina) e UDP-GAINAc (Uridina difosfato-N-acetil-D-galactosamina), que tem efeito direto sobre os precursores do ácido siálico (como, CMP-Neu5Ac), (FIGURA 5). Além disso o UDP-GlcNAc é substrato da enzima GlcNAc transferase, que catalisa a ramificação dos glicanos complexos (BURLEIGH et al., 2011).

A biossíntese das glicoproteínas tem seu início na via secretória que compreende o retículo endoplasmático e o complexo Golgi. A biossíntese produz glicoproteínas que serão secretadas ou que fazem parte da membrana plasmática. As glicoproteínas carregam em sua cadeia de polipeptídios um ou mais glicanos ligados de forma covalente à sua estrutura. Duas classes principais de glicanos são encontrados ligados às proteínas: O- glicanos, cujo principal representante tem seu início no complexo de golgi através da ligação de um resíduo GalNac aos grupos hidroxila dos aminoácidos serina (Ser) ou treonina (Thr), formando a O-glicosilação, GalNac α -Ser/Thr; os N-glicanos, cuja biossíntese ocorre a partir da ligação de uma cadeia de oligossacarídeos ao nitrogênio da asparagina seguindo a sequência peptídica Asp-X-Ser/Thr onde X pode ser qualquer aminoácido com exceção da prolina. Dessa forma os glicoconjugados

podem ser conhecidas de acordo com o tipo de ligação que o glicano faz com o nitrogênio, (N-glicanos) ou o oxigênio (O-glicano) (FIGURA 5). As cadeias de glicanos também podem ser ramificadas ou alongadas, apresentando em sua estrutura ácidos siálicos, fucose, N-acetilgalactosamina relacionados com os grupos sanguíneos de Lewis e sistema ABO (H) (VARKI, 2017).

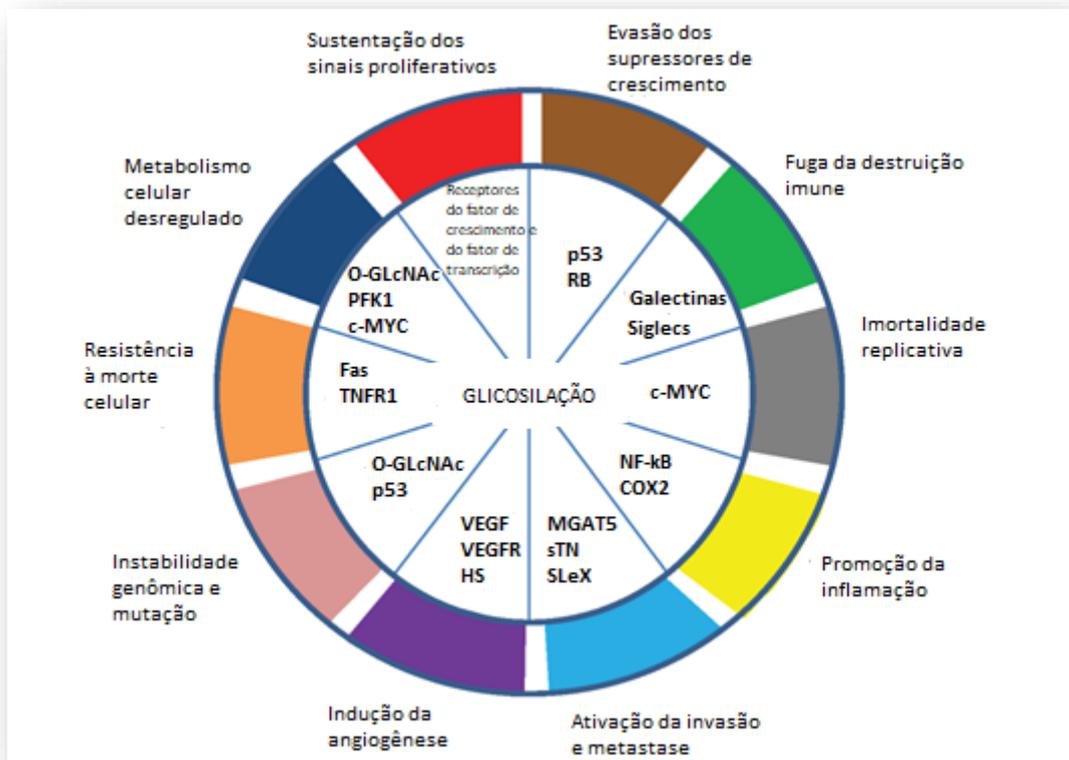
Figura 5- Diversidade dos Glicoconjugados.



Fonte: (Adaptado de PINHO; REIS, 2015)

As alterações na glicosilação já foram descritas em algumas doenças, como artrite reumatoide, distúrbios congênitos e câncer (VARKI, 2017). No câncer a glicosilação alterada foi inicialmente descrita há mais de 40 anos por MEEZAN et al., 1969, e é comumente conhecida como “aberrante”; possui papel fundamental nos principais processos que envolvem a carcinogênese e progressão do câncer, pois ocorrem mudanças no padrão de glicosilação de proteínas de membrana e das glicoproteínas que são secretadas. No câncer, os glicanos alterados participam de eventos centrais como, sinalização, dissociação, invasão, interação célula-matriz, angiogênese, metástase e modulação imunológica. MUNKLEY; ELLIOTT, 2016, discute como a glicosilação aberrante, mesmo estando ausente nos dez hallmarks do câncer, não é, por si só, uma característica do câncer, e traz o conceito mecanicista de que os glicanos desempenham um papel em todas as características que levam ao desenvolvimento e progressão do câncer, reconhecidas por HANAHAN; WEINBERG, 2011, (FIGURA 6).

Figura 6- Modelo representativo que faz uma associação dos processos de glicosilação aberrante que estão envolvidos no surgimento dos dez HALMARKS do câncer, propostos HANNAHAN em 2011.

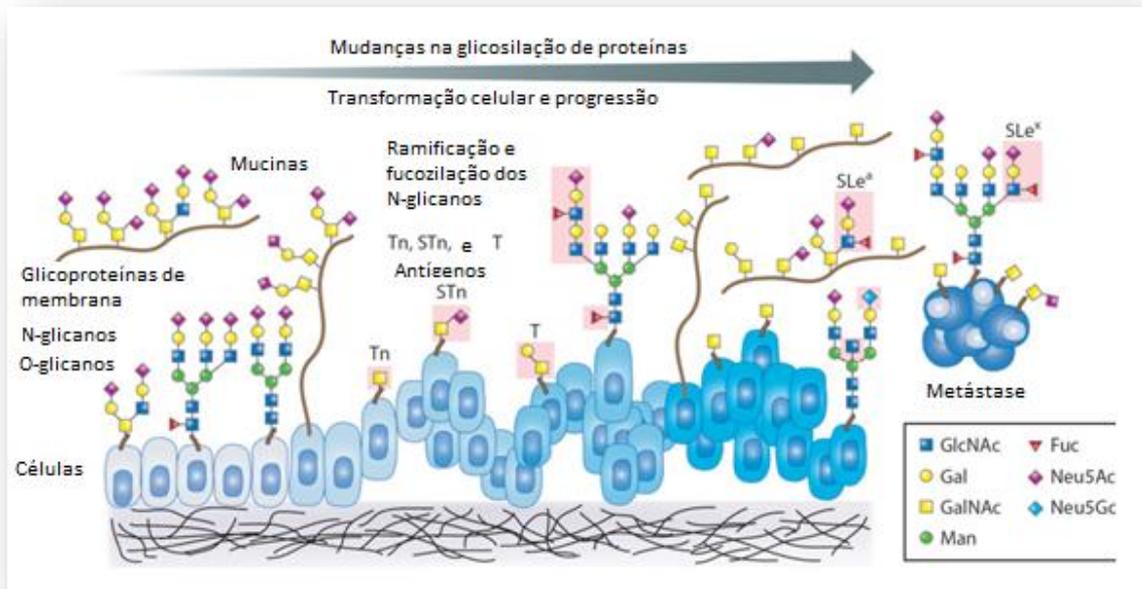


Fonte: (Adaptado de MUNKLEY; ELLIOTT, 2016).

A glicosilação no câncer é muito importante não só por atuar em todos processos reconhecidos e citados anteriormente, como também pelo fato de que a maioria dos biomarcadores tumorais existentes e aprovados pelo FDA serem glicoproteínas ou antígenos glicanos (BADR et al., 2014).

A glicosilação alterada produz cadeias aberrantes de carboidratos, essas alterações são importantes para o microambiente tumoral e para progressão do câncer. As alterações mais amplamente associadas ao câncer são sialilação e fucosilação aumentadas, O-glicanos truncados e N-glicanos ramificados (FIGURA 7). Essas alterações afetam a adesão, sinalização, metabolismo, angiogênese e modulação imunológica que estão associadas à progressão tumoral e metástase (BLANAS et al., 2018; CHRISTIANSEN et al., 2014).

Figura 7- Mudanças comuns no processo de glicosilação de proteínas durante a progressão do câncer.



Fonte: (Adaptado de WANG et al., 2015)

No câncer gástrico a principal alteração estudada é a parada no alongamento da cadeia do O-GalNAc, que são glicanos que podem ser sialilados e fucosilados. Eles são tidos como mucinas simples, pois esse tipo de glicosilação é abundante em mucinas, mas podem ser encontradas em qualquer proteína existente na membrana que apresente sítios de O-glicosilação. A literatura mostra que existe uma densidade aumentada de O-glicanos nos tumores gástricos em comparação com células normais do mesmo tecido, isso ocorre devido ao aumento significativo na expressão de GalNAc transferases em relação ao que ocorre em células normais. Essas transferases catalisam a transferência de UDP-N-acetil galactosaminas para o grupo de Ser ou Thr, formando o antígeno Tn (FIGURA 7) (CAMPOS et al., 2015; PINHO et al., 2013).

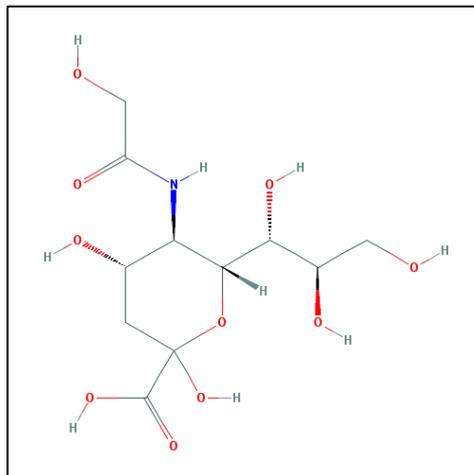
A expressão de antígenos glicoproteicos é comum em muitos tipos de câncer e estão associados com o prognóstico da doença. A exemplo, a expressão de antígenos como sialil-LewisX (SLeX), antígeno Thomsen-nouvelle (Tn) e sialil-Tn (STn), foram detectadas em quase todos os tipos de câncer (FIGURA 9). Portanto, antígenos carboidratos podem ser potenciais biomarcadores para diagnóstico e prognóstico do câncer. Além da glicosilação aberrante e da

formação de antígenos truncados dois processos são centrais na glicobiologia tumoral, a fucosilação e a sialilação(CAMPOS et al., 2015; HÄUSELMANN; BORSIG, 2014).

2.4 O ÁCIDO SIÁLICO

A sialilação é um processo de adição do ácido siálico nos glicoconjugados. Os ácidos siálicos formam uma grande família de monossacarídeos α -cetoácido com nove carbonos. Esses açúcares ácidos tem estrutura variada e estão distribuídos em diversos organismos na natureza. Os ácidos siálicos são as estruturas terminais do glicanos e desempenham um papel importante no reconhecimento molecular e celular. Este monossacarídeo é o principal produto da hidrólise dos glicolipídeos do cérebro ou das mucinas salivares. Os principais representantes dos ácidos siálicos são o Neu5Ac (FIGURA 8) e o Neu5Gl(ANGATA, 2020).

Figura 8- Estrutura do Ácido N-acetilneuramínico (Neu5Ac)



Fonte: (Adaptado de National Center for Biotechnology Information, acessado em julho de 2018)

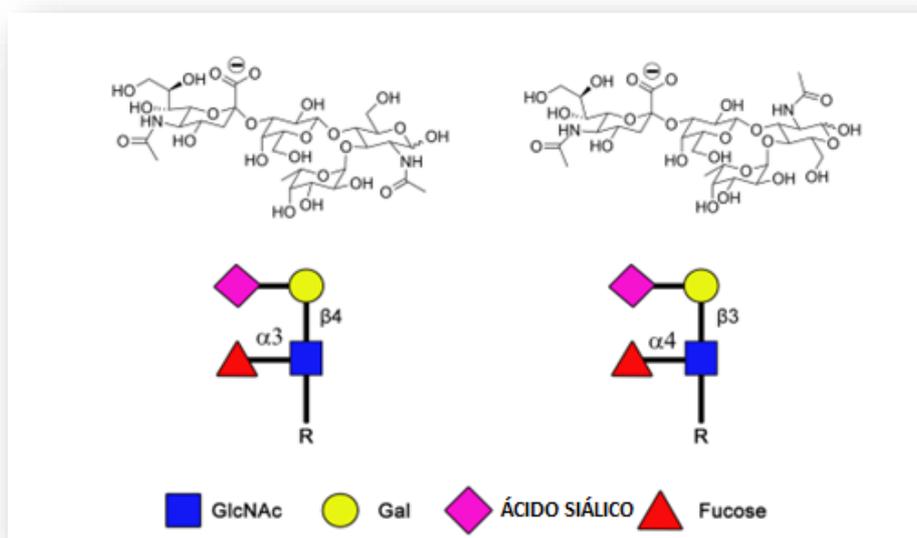
Eles foram descobertos inicialmente no ano de 1936 por Gunnar Blix, que deu o nome de “Ácido siálico”, pois a substância foi isolada em mucinas salivares, em referência a palavra grega para saliva. Entretanto, em 1941 Ernest Klenk isolou a mesma substância em glicolipídios cerebrais e atribuiu o nome de “ácido neuramínico”. Anos depois quando os nomes estavam estabelecidos, descobriram que as duas substâncias tinham relação(VARKI, 2017).

Os ácidos siálicos são removidos dos glicoconjugados pelas sialidasas, que também são conhecidas como neuraminidasas. Normalmente o termo sialidase é mais utilizado, embora as sialidasas virais sejam conhecidas como neuraminidasas, como é o caso do vírus H1N1, onde

o N1 refere-se à sua neuraminidase (sialidase). Nos organismos eucariontes as sialidases são codificadas por NEUgenes, nos mamíferos são conhecidos quatro neuraminidasas que são produtos desses genes. A NEU1 e NEU4 atuam no meio intracelular, nos endossomos ou lisossomos, reciclando sialoglicanos. O NEU1 também pode atuar na superfície celular regulando a sialilação e modulando a sinalização por meio de receptores. A NEU2 atua no citosol, reciclando sialoglicanos provenientes de autofagia ou fagocitose. A NEU3 atua principalmente na superfície celular e tem preferência por gangliosídeos. Gangliosídeos são estruturas polares formadas por unidades de oligossacarídeos carregados negativamente, que possuem uma ou mais unidades de ácidos siálicos na sua estrutura. A síntese do ácido siálico ocorre no citoplasma na forma livre Neu5Ac que é transportada para o núcleo onde é ativado pela hidrólise da citidina trifosfato, formando o CMP-ácido siálico. Em seguida é transportado para o complexo de golgi onde atua como um doador glicosídeo no alongamento das cadeias dos oligossacarídeos de glicoproteínas e glicolípídeos por ação de enzimas sialiltransferases (PEARCE; LÄUBLI, 2015).

O aumento da sialilação devido a expressão alterada de glicosiltransferases está muito associado ao câncer. Os antígenos SLe^x e SLe^a (FIGURA 11) são importantes antígenos silalidados que estão intimamente relacionados ao câncer. Os níveis de expressão do Slex têm sido correlacionados a má sobrevida de pacientes com câncer (PINHO et al., 2013).

Figura 9- Estrutura do SLe^x e do seu isômero SLe^a.



Fonte: (Adaptado de NATONI; MACAULEY; O'DWYER, 2016)

As alterações e a regulação dos ácidos siálicos são uma característica comum no câncer onde o aumento da expressão do ácido siálico na superfície celular, reduz a ligação das células tumorais a matriz extracelular, aumentando sua plasticidade e facilitando a metástase além de impedir o reconhecimento pelo sistema imune através da via alternativa de ativação do complemento. No câncer, a sialilação aumentada também inclui a expressão do ácido polissialico que está associado a vários tipos de câncer e expresso em tumores de alto grau (ADAMS et al., 2018).

Um subgrupo de lectinas tipo 1, conhecidos como Siglecs reconhecem características estruturais dos ácidos siálicos e são encontradas nas células da imunidade inata. A sialilação alterada afeta as interações com os Siglecs, essas interações por sua vez, permitem que as células neoplásicas não sejam reconhecidas, como se enviassem um sinal inibitório para imunidade inata (BEATSON et al., 2016).

2.5 SIGLEC (Sialic acid-binding immunoglobulin-like lectins)

As SIGLECS são lectinas do tipo imunoglobulinas que se ligam ao ácido siálico; são receptores transmembrana de superfície celular, com dois a dezessete domínios extracelulares, incluindo o domínio V-set e Ig-like que são sítios de ligação ao ácido siálico. Existem catorze dessas lectinas em humanos. Essas lectinas podem ser divididas em dois grupos, as comuns e as que variam entre os mamíferos. Em sua maioria são expressos em células do sistema imune, como linfócitos B e macrófagos, com exceção do siglec 4 que é expresso apenas no sistema nervoso (MACAULEY; CROCKER; PAULSON, 2014).

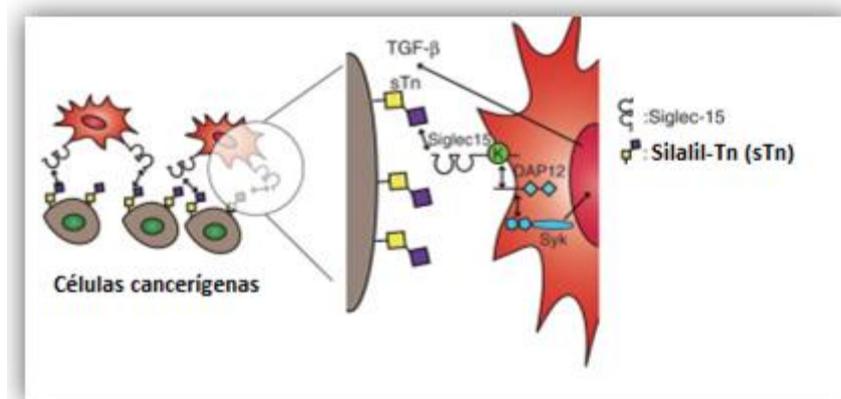
Padrões distintos de expressão de glicosilação na superfície das células tumorais são associados ao escape do sistema imunológico e contribuem para progressão do câncer. As SIGLECS pertencem à segunda classe de auto receptores de reconhecimento de padrões (do inglês, self-PRRs), esses receptores reconhecem ácidos siálicos como próprios e enviam sinais inibitórios através da sua porção citosólica. Tem-se sugerido que os ácidos siálicos associados aos glicanos atuam como “padrões moleculares auto associados” SAMPs (do inglês, self-associated molecular patterns), e a hipersialilação que é comum no câncer permite que as células neoplásicas “sejam mascaradas” e não reconhecidas pelo sistema imune (KAJANDER et al., 2011; VARKI, 2011).

A SIGLEC-15 é uma proteína transmembrana tipo 1, que consiste em dois domínios do tipo imunoglobulina, um domínio transmembranar contendo lisina e um domínio citosólico

curto. Em humanos, a SIGLEC-15 é fisiologicamente expressa nos macrófagos, células dendríticas do baço, nódulos linfáticos, nos osteoclastos, onde são importantes no processo de diferenciação. Durante o processo de evolução sua presença foi conservada nos vertebrados, especialmente por sua função essencial em reconhecer ligantes endógenos como o antígeno silail Tn (sTn) frequentemente expresso no câncer (de estômago, pâncreas, mama, etc.),(ANGATA et al., 2007).

A SIGLEC-15 não é necessariamente expressa pelas células neoplásicas, mas sua expressão é acentuada nos macrófagos associados ao tumor tipo M2, TAMs (do inglês, macrophages associated tumor). A expressão do SIGLEC-15 já foi identificada em TAMs de adenocarcinomas retal, de fígado e pulmão. As células neoplásicas secretam M-CSF, um fator estimulador de formação de colônias de macrófagos tipo M2 (do inglês, macrophage colony-stimulating factor), em consequência também ocorre o aumento na expressão de SIGLEC-15. Os TAMs são ativados através da via de transdução de sinal DAP12-syk, por ligação do SIGLEC-15 ao antígeno sTn das células neoplásicas, essa ligação por sua vez promove o aumento na secreção de TGF- β que está relacionado à progressão tumoral e metástase (FIGURA 10). Suas funções promotoras permitem a migração, invasão, transição epitélio-mesênquima e supressão da imunidade antitumoral, de forma que os TAMs atuam regulando o microambiente tumoral através da interação entre os antígenos sTn e o SIGLEC-15 (TAKAMIYA et al., 2013).

Figura 10- Modulação do microambiente tumoral através da ligação do SIGLEC-15 ao antígeno sTn.



Fonte: (Adaptado de TAKAMIYA et al., 2013)

2.6 NEU3 (Neuraminidase-3)

O conteúdo do ácido neuramínico é controlado por sialtransferases e neuraminidasas (Sialidasas, como também são conhecidas ou simplesmente NEU). Foram identificadas quatro dessas isoenzimas em humanos, a NEU1, NEU2, NEU3 e NEU4. A atividade anormal dessas enzimas tem sido associada a diversas doenças incluindo distúrbios do armazenamento lisossomal, doenças cardiovasculares, diabetes e câncer (MIYAGI; YAMAGUCHI, 2012) GUO et al., 2018).

A NEU 3 remove o ácido siálico preferencialmente do gangliosídeo GM3. O GM3 é um componente abundante que forma complexos com moléculas de sinalização celular, e é importante na modulação da adesão celular, crescimento e mobilidade. Eles alteram a organização e a ativação de moléculas envolvidas na patogênese do câncer nos microdomínios de glicosinapse (HAKOMORI; HANDA, 2015; MIYAGI; YAMAGUCHI, 2012). Alguns estudos mostram que NEU 1 e NEU3 hidrolisam a ligação do ácido siálico em biomoléculas e estão associadas a diversas respostas imunológicas, estando presentes em células Th1 e Th2 (KATOH et al., 2011). No estudo de KAMINUMA et al., 2018, eles puderam observar em camundongos BALB/c, através de um estudo de expressão lentiviral em células T CD4⁺, que a isoenzima NEU3 estava relacionada com a diferenciação de células T regulatórias induzidas (iTreg) importantes no equilíbrio anti-inflamatório, através da regulação positiva de FoxP3. Nesse estudo também se verificou que a NEU3 também protege os miócitos da morte celular induzida por hipóxia.

No câncer de pulmão a regulação positiva de NEU3 influencia a ativação do EGFR. Nessa condição o NEU3 foi regulado positivamente em diferentes linhagens de adenocarcinoma de pulmão de células não pequenas. A superexpressão de NEU3 induz um aumento na cascata de sinalização de EGFR, ativando as vias de sinalização por sobrevivência, relacionando esses efeitos ao aumento da resistência celular à hipóxia e opondo-se à morte celular pela via apoptótica (FORCELLA et al., 2018).

2.7 ST3GAL3 (B-galactosídeo α 2,3-sialyltransferase)

O processo de carcinogênese evidencia alterações importantes, dentre elas, a expressão alterada de oligossacarídeos que compõem glicoproteínas e glicolípídeos na superfície celular.

Nesse contexto, glicoconjugados sialilados mostram-se alterados durante o desenvolvimento do tumor, diferenciação e transformação oncogênica (QI et al., 2020).

O ácido siálico (ácido N-acetil neuramínico) frequentemente ocupa a posição terminal da membrana de glicoproteínas. Além disso, seus derivados desempenham uma variedade de funções biológicas: comunicação célula-célula, interação célula-matriz extracelular e adesão celular. Ácido siálico liga-se à galactose subterminal através da ligação $\alpha 2,3$ ou $\alpha 2,6$ ou a outro ácido siálico por meio da ligação $\alpha 2,8$ catalisado por uma enzima específica, formando o ácido polisiálico (ZHANG; WUHRER; HOLST, 2018).

Sialiltransferases (ST) são enzimas que transferem ácido siálico formando oligossacarídeos. Trata-se de proteínas catalisadoras que possuem substratos específicos. Dessa forma, as STs adicionam ácido siálico à porção terminal de glicolípídeos sialilados (gangliosídeos) ou na porção N- ou O-ligados de glicoproteínas. Existem várias sialiltransferases e são classificadas de acordo com as ligações que exercem (ST3GAL, ST6GAL, etc) (PEARCE; LÄUBLI, 2015).

B-galactosídeo $\alpha 2,3$ -sialiltransferase (ST3GAL3) são enzimas que catalisam a transferência de ácido siálico $\alpha 2,3$ -ligados aos resíduos terminais de Gal encontrados em glicoproteínas ou glicolípídeos. Trata-se de uma das mais importantes famílias de enzimas e estão divididas em seis subfamílias conhecidas como ST3GAL I, ST3GAL II, ST3GAL III que é alvo desse estudo, ST3 GAL IV, ST3GAL V e ST3GAL VI (USLUPEHLIVAN; ŞENER; İZZETOĞLU, 2019). Nesse contexto, a ST3GAL III adiciona o ácido neuramínico aos resíduos terminais do dissacarídeo Gal β 1-3/4GlcNAc e representa o candidato *in vivo* mais provável na biossíntese de sLe^a (KITAGAWA; PAULSON, 1993).

A expressão aberrante de sialiltransferases tem papel fundamental em diversas funções biológicas, sendo relacionada à diferenciação celular, adesão, motilidade, migração celular e patológicas como a transformação neoplásica, progressão de diversos tipos de tumores e metástases (ZHANG et al., 2019).

2.8 FUCOSILAÇÃO

A fucosilação é um processo amplamente observado em animais, plantas, bactérias e fungos. Nele ocorre a transferência de um resíduo de GDP-fucose, para cadeias de

oligossacarídeos dos glicoconjugados. Um dos papéis característicos da fucosilação é a participação no processo de inflamação; na adesão endotelial dos leucócitos, que é dependente do reconhecimento por selectinas e na fucosilação de TGF- β 1. A maioria dos receptores na superfície celular também são fucosilados, incluindo o receptor EGFR, o receptor PDGF, o receptor do fator de crescimento transformante β (TGF β R, do inglês Transforming Growth Factor Beta Receptor), a E-caderina e as integrinas (LI et al., 2018).

A fucosilação é um processo regulado por diversas proteínas (sintetizadores de GDP-fucose, transportadores de GDP-fucose e fucosiltransferases- FUTs e fucosidases). A depender do local onde a fucose é adicionada ao oligossacarídeo ela pode ocorrer de duas formas: fucosilação do núcleo de carboidrato e fucosilação terminal da proteína. São exemplos: A α -fetoproteína com fucosilação nuclear, comum no carcinoma hepatocelular e os antígenos Lewis tipo I e II onde ocorre a fucosilação terminal. O núcleo de fucose está presente nos N-glicanos e como terminal não redutor em O-glicanos, glicolípídeos e antígenos de Lewis. Enzimas fucosiltransferases regulam positivamente a expressão de antígenos fucosilados, do tipo I (H1, Lewis^a, Lewis^b e siallyl lewis^a) e do tipo II (H2, Lewis^x, Lewis^y e Siallyl lewis^x), na superfície celular (LLOYD, 2000; SHANG et al., 2017).

A fucose precisa ser ativada, e esta ativação se dá pela síntese de GDP-fucose que ocorre por duas vias: síntese de novo e de salvamento no citosol. Entretanto a via de Novo corresponde a mais que noventa por cento da produção de GDP-fucose. Duas enzimas são essenciais nesse processo GDP-manose-4,6-desidratase (GMDS) e GDP-4-ceto-6-desoximanose-3,5-epimerase-4-redutase, que também é conhecido como FX, P53B, GDP-L-Fuc sintase ou TSTA3, essas enzimas são essenciais na produção de GDP-fucose (MORIWAKI; MIYOSHI, 2010).

Os resíduos de fucose exercem função fundamental em muitas glicoproteínas. A fucosilação influencia a flexibilidade do oligossacarídeo N-ligado e a estabilidade das glicoproteínas, como resultado, regulam vários eventos fisiológicos, incluindo crescimento celular, interação e comunicação célula-célula, migração, transição epitélio-mesênquima, embriogênese e invasão tumoral (BLANAS et al., 2018). A expressão aberrante ou redução de glicanos fucosilados também é responsável por eventos patológicos, e está envolvida no surgimento do câncer e de outras doenças. No câncer a fucosilação aumentada já foi relatada em carcinoma hepatocelular, adenocarcinoma de ovário, e carcinoma papilífero da tireóide. Portanto, mudanças na fucosilação podem ser úteis no desenvolvimento de novos

biomarcadores de diagnóstico e prognóstico (MIYOSHI et al., 2012; TANICHI; KOREKANE, 2011).

2.9 TSTA3 (Tissue-specific transplantation antigen 3)

TSTA3 participa do metabolismo enzimático e afeta os processos de glicosilação, contribuindo para alteração maligna das células. O antígeno de transplante específico de tecido TSTA3 (P53B), é uma proteína de ligação ao NADP(H) que catalisa reações de epimerase e redutase, no metabolismo de GDP-D manose, convertendo GDP-4-ceto-6-D-desoximanose para GDP-L-fucose. Por sua vez, a GDP-L-fucose é transportada para o complexo de Golgi pela GDP-L-Fuc Tr (do inglês, GDP-L-Fuc transporter) onde é substrato doador de várias fucosiltransferases, que estão envolvidas na expressão de muitos glicoconjugados, em antígenos sanguíneos ABH e antígenos de adesão (KIZUKA et al., 2017b).

A atividade de TSTA3 durante a glicosilação na superfície celular, também afeta o fenótipo e a capacidade de invasão das células tumorais. Sua expressão anormal pode afetar a sua atividade enzimática na oncogênese, contribuindo diretamente nesse processo (SUN et al., 2015). O aumento da expressão de TSTA3 e de GDP-L-fucose já foi relatado em carcinoma hepatocelular o que contribuiu para o aumento da fucosilação nesse tipo de tumor (NORTON; MEHTA, 2019). Um outro estudo mostra que a alta expressão de TSTA3 tem correlação significativa com a expressão de fucosiltransferases (FUTs) no câncer colorretal, o que sugere que o TSTA3 possui papel importante na progressão do tumor (VILLAR-PORTELA et al., 2013).

2.10 FUCA2 (Alfa-L-fucosidase-2)

A Alfa-L-fucosidase (FUCA) é um componente de glicanos na superfície celular. Trata-se de uma enzima que catalisa a remoção de resíduos α -L-fucose de glicoproteínas e a superexpressão de FUCA está relacionada com a carcinogênese. Os genes FUCA1 e FUCA2 constituem os dois genes da α -L-fucosidase tecidual (tFuc) e plasmática (pFuc), respectivamente (ISHIDA et al., 2019).

Mutações no gene FUCA1 desencadeiam a fucosidose: doença de armazenamento lisossômico caracterizada pelo acúmulo de glicoesfingolípídeos e glicoproteínas fucosiladas no sistema nervoso central e periférico (SOBKOWICZ et al., 2014). Enquanto FUCA2 é o gene

codificante da α -L-fucosidase 2, enzima secretada por células do carcinoma gástrico após infecção por *Helicobacter pylori* (LIU et al., 2009).

A enzima α -L-fucosidase possui funções imunorregulatórias, promovendo extravasamento de leucócitos no estágio final da inflamação, sendo regulado pelas quimiocinas CCL3 e CCL5, o que remove a fucose das moléculas de adesão (ALI et al., 2008). Os resultados e discussões sobre a atividade enzimática de α -L-fucosidase 2 são insuficientes na literatura. Sendo assim, não fica claro a participação exclusiva dessa enzima nos processos biológicos ou quando atua em combinação com α -L-fucosidase 1 (SOBKOWICZ et al., 2014).

3 OBJETIVO GERAL

Analisar a expressão diferencial de proteínas processadoras e ligadoras de Fucose e Ácido Siálico em adenocarcinoma gástrico, e suas possíveis utilizações como marcadores de prognóstico e desfecho.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar a nível histológico a imunomarcção de NEU3, ST3GAL3, SIGLEC-15, TSTA3 e FUCA2 em amostras de câncer gástrico;
- Associar o padrão de expressão tecidual de cada proteína com os dados clínicos e histopatológicos dos pacientes e com cortes de validação;
- Correlacionar a expressão da proteína com os parâmetros de Sobrevida (Sobrevida Global, Sobrevida Livre da Doença e sobrevida livre de metástases) do câncer gástrico.

4 METODOLOGIA

4.1 Tipo e local do estudo

Esse é um estudo experimental e transversal de coorte retrospectiva. Foram selecionadas para a coorte retrospectiva, setenta e uma amostras fixadas em formalina e emblocadas em parafina de adenocarcinoma gástrico, diagnosticados no período de 2013 a 2016, fornecidas pelo Serviço de Patologia do Hospital do Câncer de Pernambuco- HCP. O estudo experimental foi realizado no Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêutica da UFPE.

4.2 Amostras Clínicas

As amostras clínicas obtidas foram previamente fixadas em formalina tamponada e embebidas em parafina. A partir dos prontuários médicos foram obtidas as seguintes informações: sexo, idade, tamanho do tumor no momento do diagnóstico, número e localização dos linfonodos retirados e sua positividade para a doença, estadiamento patológico, recorrência, óbito, tratamento cirúrgico, grau histológico, necessidade de quimioterapia/radioterapia, invasão angiolinfática, recidiva, metástase e óbito. O projeto possui aprovação pelo Comitê de ética em Pesquisa do Hospital do Câncer (Anexo I) - CAAE (CAAE: 39976214.90000.5205).

4.3 Critérios de inclusão e exclusão das amostras

Inclusão: Amostras de pacientes com diagnóstico histopatológico confirmados de adenocarcinoma gástrico.

Exclusão: As amostras dos pacientes, que não correspondiam a adenocarcinoma gástrico e que estavam sem área tumoral representativa ou com problemas de fixação evidenciado pelo alto índice de autólise.

4.4 Imuno-histoquímica

As amostras foram cortadas (4 μ m) e fixadas em lâminas silanizadas e desparafinizadas em xilol. Posteriormente foram reidratados em concentrações decrescentes de etanol (100, 95, 80, e 75%). Em seguida, foi realizada a recuperação antigênica em tampão citrato 100mM, pH

6.0 em micro-ondas 300W por 15 minutos. Após, as lâminas esfriaram e foi adicionado o bloqueador de peroxidase endógena (peroxidase a 3%) por 30 minutos à temperatura ambiente. Depois, foi efetuado o bloqueio das ligações inespecíficas com uma solução de PBS/BSA 1%, por 30 minutos a temperatura ambiente, 25°C (TA). Os cortes histológicos foram então incubados com os anticorpos primários: NEU3, SIGLEC-15, ST3GAL3, TSTA3 e FUCA2 (CUSABIO) cada anticorpo foi diluído na concentração de 1:100 em PBS-BSA 5% (p/v) e incubado a 37°C por 2 horas. Após esse período foi utilizado um sistema revelador a base de polímero livre de biotina (DAKO) por 1 hora a TA, e revelado com DAB- H₂O₂ (Sigma). Como controle positivo, foi utilizado o câncer de cólon para NEU3 e FUCA2, carcinoma de mama para SIGLEC-15 e TSTA3, e adenocarcinoma de próstata para FUCA2. Selecionados conforme indicação do fabricante dos anticorpos primários e a partir de informações do site *The human protein atlas* (Human Protein Atlas disponível em www.proteinatlas.org). Como controle negativo da técnica foi realizada a substituição do anticorpo primário por uma solução de PBS/BSA 1%.

4.5 Análise das Amostras

A análise histomorfológica foi realizada com o scanner de lâminas digital automático Panoramic MIDI II (3DHISTECH, Ltd., Budapeste, Hungria). Se mais de 10% das células tumorais foram coradas em diferentes graus de intensidade, a expressão foi considerada positiva. Coloração abaixo de 10% foi denotada como negativa. As amostras que apresentaram contrapartida de tecido normal foram descritas para a caracterização, foram avaliadas as áreas de crista e células produtoras. O local de coloração enzimática, citoplasmático, de membrana e perinuclear e nuclear, também foram analisados. Combinações de parâmetros clínico-patológicos associados e parâmetros de resultado foram feitas com a coloração enzimática e o local da coloração.

4.6 Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas no software Graphpad Prism versão 7.04. Para as avaliações de associação foi utilizado o teste de Fisher e as diferenças foram consideradas estatisticamente significantes para $p < 0,05$. Para a análise dos parâmetros de sobrevivência, foram utilizadas curvas de sobrevida segundo o método de kaplan-meyer com log-rank. A

análise de regressão logística multivariada foi realizada usando STATA9.1, com stepwise forward selection.

4.7 Análise *in silico* de coortes de validação

As coortes de validação analisadas neste estudo foram extraídas da genômica cBioPortal PC (<http://www.cbioportal.org>). Foram utilizados dados da expressão do mRNA no adenocarcinoma de estômago (TCGA Provisional, TCGA Nature, TCGA Pancancer), compreendendo 415, 265 e 412 pacientes, respectivamente. O valor da expressão de mRNA de NEU3, ST3GAL3, SIGLEC-15, TSTA3 e FUCA2 foram comparados com dados clínico-patológicos (idade, sexo, envolvimento, linfonodal, grau histológico, classificação de Lauren, status nodal, infecção por *H. Pylori*, estadiamento cirúrgico, radioterapia e recidiva) com parâmetros de desfecho (sobrevida global e sobrevivida livre de doença). A associação estatística foi realizada usando o teste exato de Fisher e as curvas de kaplan-meyer com log-rank usando o GraphPad Prism versão 7.0.

5 RESULTADOS

5.1 Características clínico-demográficas

Este estudo incluiu 71 casos de pacientes com adenocarcinoma gástrico. A maioria dos pacientes era do sexo masculino, 47 pacientes (66,1%) e 24 pacientes (33,9%) do sexo feminino, com média de idade de $59,16 \pm 12,95$ (variação = 30-89 anos) anos (Tabela 1)

Tabela 2- Características clínico-patológicas dos pacientes com adenocarcinoma gástrico.

Características clínico-patológicas	Nº de pacientes	total n=71
Idade (Anos)		
≥60	36(50.70)	
<60	35(50.69)	
Sexo		
Feminino	24(33.80)	
Masculino		
Cirurgia		
Gastrectomia Total	32(54.79)	
Gastrectomia Parcial	39(49.29)	
Treatmento Neoadjuvanto		
I	66(92.95)	
III	5(7.04)	
Estadiamento cirúrgico (TNM)		
(I e II)	19(26.76)	
(III e IV)	52(73.23)	
Envolvimento linfonodal		
SIM	25(35.21)	
NÃO		
Grau Histológico		
GI + GII	35(49.29)	
GIII	36(50.71)	
Quimioterapia		
SIM	39(54.92)	
NÃO	32(45.07)	
Radioterapia		
SIM	22(30.98)	
NÃO	49(69.01)	
Recidiva		
SIM	16(22.53)	

	NÃO	55(77.46)
Classificação de Lauren		
	INTESTINAL	33(48.52)
	DIFUSO	35(51.47)
Invasão Angiolinfática		
	DETECTEDO	29(43.28)
	NÃO DETECTEDO	38(56.71)
Infecção por <i>H. Pylori</i>		
	SIM	9(13.63)
	NÃO	57(86.36)
Classification of Lauren N-68	Angiolymphatic Invasion N-67	<i>H. Pylori</i> Infection N-66

5.2 Resultados Neu3

A imunomarcagem de NEU3 em células neoplásicas foi observada em 66 (92,95%) amostras. Dessas, 34 amostras (47,88%) foram positivas na região citoplasmática e outras 32 amostras (49,23%) apresentaram diferentes combinações de coloração, coloração membranosa, citoplasmática, perinuclear e nuclear (Figura 1B). Além disso, 35 amostras apresentaram áreas correspondentes a tecido normal, das quais 23 foram negativas e 13 apresentaram coloração NEU3.

Todas as áreas normais positivas para NEU3 estavam em amostras com contrapartida neoplásica positiva, o contrário não aconteceu. Foram encontradas quinze áreas de metaplasia, em todas elas o tecido neoplásico também era positivo para NEU3 (Figura 1A). Em 3 das 15 áreas de metaplasia não houve coloração para NEU3. A associação que mais se aproximou da significância foi com o grau histológico $p = 0,0536$. Encontramos diferença significativa na expressão de NEU3 entre os tecidos neoplásicos, metaplásicos e mucosos normais, com mucosa normal menos positiva para NEU3, $p < 0,0001$ (Tabela 3).

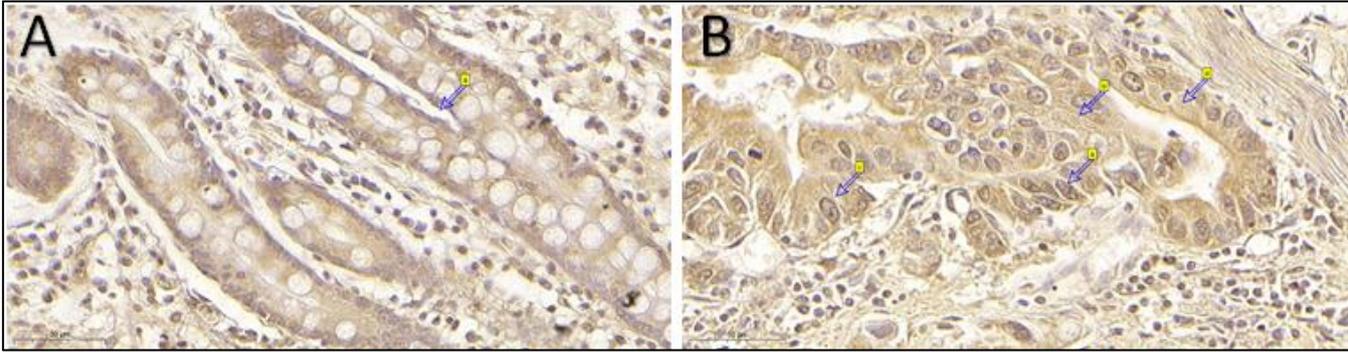


Figura 11- Imuno-histoquímica de Neu3 em amostras de GC (A) coloração citoplasmática de metaplasia, (B) coloração nuclear (seta azul, a) coloração da membrana (seta azul, b), coloração perinuclear (seta azul, c) e coloração citoplasmática (seta azul, d), 50 μ m.

Tabela 3- Comparação pareada da coloração de Neu3 em células neoplásicas, não transformadas e tecido gástrico adjacente com metaplasia.

	Normal	Neoplasia	Metaplasia	Valor P
NEU3 ⁽⁺⁾	10	66	20	<0,0001
NEU3 ⁽⁻⁾	20	5	0	

5.3 Associação entre expressão de Neu3 e sobrevida livre de doença e sobrevida geral

Nenhuma associação foi encontrada entre a coloração de Neu3 e a sobrevida global. A sobrevida média em dias para casos marcados positivamente foi de 357,5 dias, em comparação com 447 dias para casos não marcados ($p > 0,05$). A sobrevivência mínima e máxima em dias foi de 2 e 2352, respectivamente. Também não houve significância na sobrevida livre de doença. A mediana de 16 meses para os casos positivos e 18 meses para os negativos ($p > 0,05$); a sobrevida mínima e máxima em meses foi de 2 e 78, respectivamente.

5.4 Análise de regressão logística univariada e multivariada

Não houve diferença significativa nas análises multivariadas para a expressão NEU3 (dados não mostrados).

5.5 Resultados ST3GAL3

A coloração de ST3GAL3 foi positiva em 18 pacientes da coorte (25,35%). A coloração do tecido de ST3GAL3 foi observada principalmente na região citoplasmática 17 amostras (94,44%) e membrana em 1 (5,56%), na neoplasia e na parte normal (Figura 2.2B). Em 35

amostras (49,29%) das amostras foram encontradas áreas correspondentes a tecido normal. Destes, 8 (22,87%) foram positivos para ST3GAL3, em 2 deles a neoplasia também foi positiva. A coloração da parte normal estava presente nos dutos e células produtoras (faveolares) Áreas de metaplasia também foram encontradas em 20 (28,16% A) amostras, sendo que 7 (9,86%) delas apresentaram coloração citoplasmática (Figura 2.2A).

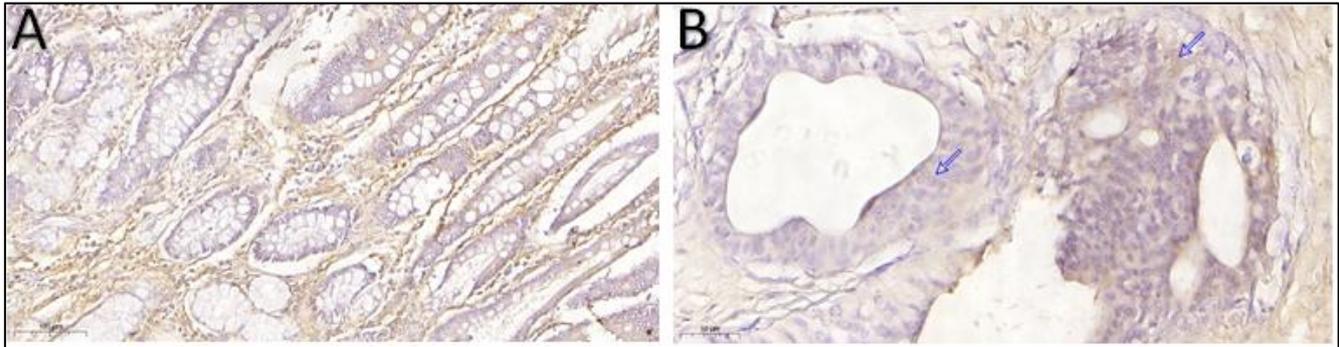


Figura 12- Imuno-histoquímica de ST3GAL3 em amostras de GC (A) Coloração citoplasmática de metaplasia, (B) coloração citoplasmática de neoplasia (seta azul, d), Barra de escala: 50 µm.

Nenhuma diferença significativa na positividade de ST3GAL3 entre tecidos tumorais, metaplásicos e mucosa normal de pacientes com câncer foi encontrada (Tabela Suplementar 3). Porém, também houve associação positiva de ST3GAL3 com o tipo de classificação difusa de Lauren ($p = <0,0001$), e maior expressão nos casos de invasão nodal positiva, $p = 0,0486$. ST3GAL3 também foi mais evidente nas quantidades no maior grau histológico (G3), ($p = <0,0001$), (Tabela 2).

Nenhuma diferença expressiva na positividade de ST3GAL3 entre tecidos tumorais, metaplásicos e mucosa normal de pacientes com câncer encontrado (Tabela Suplementar 3). Porém, também houve associação positiva de ST3GAL3 com o tipo de classificação difusa de Lauren ($p = <0,0001$), e maior expressão nos casos de invasão nodal positiva, $p = 0,0486$. ST3GAL3 também foi mais evidente nas quantidades no maior grau histológico (G3), ($p = <0,0001$), (Tabela 4).

Tabela 4- Análise de associação da expressão de ST3GAL3 com características clínico-patológicas de pacientes com câncer gástrico.

Características clínico-patológicas	ST3GAL3⁽⁺⁾	ST3GAL3⁽⁻⁾	Valor de p
	n (%)	n (%)	
Idade (Anos)	11 (15.49)	25 (35.21)	
≥60	7 (9.86)	28 (39.44)	0,4148
<60			
Sexo	4 (5.63)	20 (19.72)	
Feminino	14 (28.17)	33 (46.48)	0,2647
Masculino			
Cirurgia			>0,9999
Gastrectomia Total	8 (11.27)	24 (33.80)	
Gastrectomia Parcial	10 (14.08)	29 (40.85)	
Treatmento Neoadjuvante			
I	17 (23.94)	49 (69.01)	>0,9999
III	1 (1.41)	4 (5.63)	
Estadiamento cirúrgico (TNM)			
(I e II)	2 (2.82)	16 (22.54)	0,1297
(III e IV)	16 (22.54)	37(52.11)	
Envolvimento linfonodal			
SIM	13 (18.31)	33 (46.48)	0,5719
NÃO	5 (7.04)	20 (28.17)	
Grau Histológico			
GI + GII	14 (19.72)	21 (29.58)	0,0066
GIII	4 (5.63)	32 (45.07)	
Quimioterapia			
SIM	10 (14.08)	28 (39.44)	>0,9999
NÃO	8 (11.27)	25 (35.21)	
Radioterapia			
SIM	8 (11.27)	13 (18.31)	0,1389
NÃO	10 (14.08)	40 (56.34)	

Recidiva			
SIM	3 (4.23)	15 (21.13)	0,7450
NÃO	13 (12.31)	40 (56.34)	
Classificação de Lauren			
INTESTINAL	14(20.59%)	20(29.41%)	0,0042
DIFUSO	3(4.41%)	31(45.59%)	
Invasão Angiolinfática			
DETECTEDO	9(13.64%)	20(29.85)	
NÃO DETECTEDO	8(12.12%)	30(44.78%)	0,0002
Infecção por <i>H. Pylori</i>			
SIM	1(1.56%)	7(10.49%)	0,6673
NÃO	15(23.44%)	41(64.06%)	
Teste exato de Fisher's.			

5.6 Associação entre expressão de ST3GAL3 e sobrevida livre de doença e sobrevida global

Nenhuma associação foi encontrada entre a coloração ST3GAL3 e geral. A sobrevivência mínima e máxima em dias foi de 2 e 2352, respectivamente. A sobrevida média em dias para os casos marcados positivamente foi de 271 dias, em comparação com 418 dias para os casos não marcados ($p > 0,05$). Também não houve significância na sobrevida livre de doença, a sobrevida mínima e máxima em meses foram 2 e 78, respectivamente, com mediana de 17 meses para os casos positivos e 16 meses para os casos negativos ($p > 0,05$).

5.7 Análise in silico da coorte de validação

Analisamos três coortes de validação compostas por 265, 412, 415 pacientes com adenocarcinoma gástrico extraído do Portal cBio Cancer Genomics. A expressão do mRNA de ST3GAL3 foi associada com idade, invasão nodal, tipo intestinal, classificação de Lauren e grau histológico. MRNA de ST3GAL3; invasão nodal, onde foi menos expressa em pacientes com linfonodos cancerígenos; tipo intestinal classificação de Lauren e grau histológico, ST3GAL3 teve sua expressão reduzida nas amostras com graus mais elevados, G3. A coloração ST3GAL3 foi significativamente maior em amostras de pacientes com mais de 60 anos, TCGA NATUREZA: $p = 0,0045$, TCGA PANCANCER $P = 0,0003$, TCGA PROVISIONAL $P < 0,0001$.

Outras análises envolvendo parâmetros clínicos e patológicos (sexo, quimioterapia, radioterapia, recorrência, infecção por *H. pylori*, invasão angiolinfática) e sobrevida global e sobrevida livre de doença não foram estatisticamente significativas ($p > 0,05$).

5.8 Análise de regressão logística univariada e multivariada

Também foi observado que ST3GAL3 foi capaz de prever a classificação de Lauren. A positividade de ST3GAL3 foi uma variável importante para a classificação de Lauren e manteve as análises multivariadas (Tabela 5).

Tabela 5- Análise de regressão univariada e multivariada da Classificação de Lauren em paciente GC.

Variável	Univariada				Multivariada			
	OR	95% CI		Valor de <i>p</i>	OR	95% CI		Valor de <i>p</i>
ST3GAL	7.23	1.84	28.4	0.005	0.14	0.03	0.57	0.006
Estadiamento cirúrgico	1.00	0.34	2.92	1.000	1.08	0.61	1.91	0.777
Idade	1.25	0.49	3.21	0.633	1.14	0.40	3.23	0.804
Gênero	0.46	0.16	1.26	0.134	0.57	0.19	1.73	0.328

5.9 Caracterização de coloração TSTA3

A coloração com o anticorpo TSTA3 foi evidenciada em 58 (81,69%) amostras em diferentes compartimentos celulares. Das amostras positivas, 41 eram de pacientes do sexo masculino e 17 do feminino. A região citoplasmática foi reconhecida isoladamente em 35 amostras (60,35%), outras 23 amostras (39,65%) apresentaram combinações de coloração (membrana, perinuclear, nuclear e citoplasmática (Figura 2.3.A). Além disso, 37 amostras apresentaram áreas de tecido normal adjacentes ao tecido. Destes, 13 foram negativos e 24 positivos para TSTA3. Dos 14 que coraram, em 12 a contraparte neoplásica foi positiva. Áreas de metaplasia foram detectadas em 17 amostras, 14 foram positivos e 3 negativos. A coloração de TSTA3 foi evidenciada nos casos que estavam nos estágios I e II ($p < 0,001$), grau histológico G1 e G2 ($p = 0,0120$), e classificação do tipo intestinal de Lauren ($p = 0,0120$) e foi no limite da significância com pacientes do sexo masculino ($p = 0,0507$).

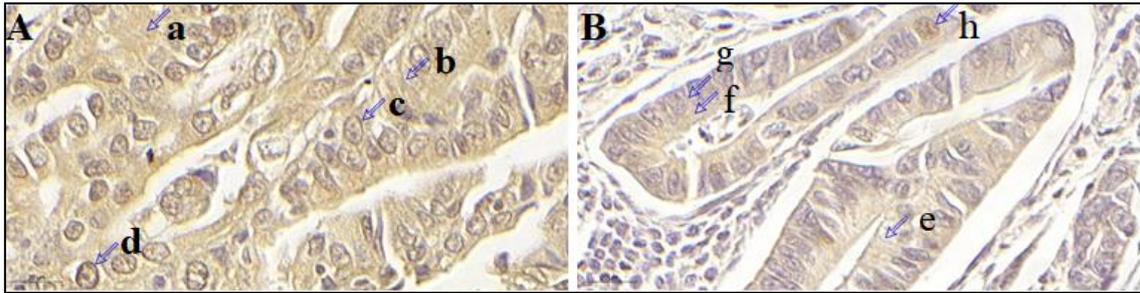


Figura 13- Imuno-histoquímica de TSTA3 e FUCA2 em amostras de GC. (A, TSTA3) a coloração citoplasmática, (b coloração da membrana, c) coloração perinuclear, d) coloração nuclear. (B, FUCA2) e), coloração da membrana, f), coloração citoplasmática, g), coloração perinuclear, h) coloração nuclear. Barra de escala: 50 µm.

5.10 Associação entre a expressão de TSTA3 e os resultados

Nenhuma associação foi encontrada entre a coloração TSTA3 e a sobrevida global. A sobrevivência mínima e máxima em dias foi de 2 e 2352, respectivamente. A sobrevida média em dias para casos positivos foi de 366 dias, em comparação com 364 dias para casos não marcados ($p > 0,05$). Também não houve significância na sobrevida livre de doença, a sobrevida mínima e máxima em meses foram 2 e 78, respectivamente, com mediana máxima de 17 meses para casos positivos e mínimo de 13,5 meses para casos negativos ($p > 0,05$).

5.11 Análise in silico

Por meio da análise em uma coorte de validação composta por 415 pacientes com adenocarcinoma gástrico extraído do Portal cBio Cancer Genomics. A expressão do mRNA de TSTA3 foi associada ao grau histológico ($p = 0,0186$) bem e moderadamente diferenciado. Outras análises envolvendo parâmetros clínicos e patológicos (idade, sexo, estadiamento, radioterapia, invasão nodal) e sobrevida global e sobrevida livre de doença não foram estatisticamente significativas ($p > 0,05$).

5.12 Análise de regressão logística univariada e multivariada

Observou-se também que o TSTA3 foi capaz de prever a classificação de Lauren (Tabela 6). Esse efeito foi mantido no modelo de análise multivariada, considerando a idade e o sexo dos pacientes.

Tabela 6- Análise de regressão univariada e multivariada da Classificação de Lauren em pacientes com GC.

Variável	Univariada				Multivariada			
	OR	95% CI		Valor de <i>p</i>	OR	95% CI		Valor de <i>p</i>
TSTA3	7.10	1.43	35.1	0.016	7.18	1.37	37.5	0.020
Idade	1.25	0.49	3.21	0.633	1.77	0.63	4.98	0.277
Gênero	0.46	0.16	1.26	0.134	0.67	0.22	2.02	0.483

5.13 Caracterização de coloração FUCA2

A coloração com FUCA2 foi evidente em 56 pacientes. Houve coloração citoplasmática em 37 amostras, membrana em 2. Em 18 amostras houve uma combinação de coloração citoplasmática / membrana / perinuclear e nuclear (Figura 2.3.B). Além disso, também encontramos 32 amostras com áreas de tecido normal adjacentes ao tecido tumoral. Dentre eles, 17 eram positivos e 15 negativos para FUCA2. Áreas de metaplasia foram detectadas em 14 amostras; todos foram marcados por FUCA2. Foi possível observar que o número de casos positivos para FUCA2 foi maior na metaplasia e neoplasia, quando comparado ao tecido normal (Tabela 7). A coloração de FUCA2 foi significativamente associada ao estadiamento cirúrgico ($p = 0,0417$), a coloração foi acentuada em tumor avançado e de forma semelhante em tumor de grau histológico inicial e avançado ($p = 0,0125$).

Tabela 7- Comparação emparelhada da coloração de FUCA2 em células neoplásicas, tecido gástrico adjacente não transformado e metaplasia.

	Normal	Neoplasia	Metaplasia	Valor de <i>p</i>
FUCA2⁽⁺⁾	17	56	14	<0,0001
FUCA2⁽⁻⁾	15	7	0	

5.14 Análise in silico

Analizamos uma coorte de validação composta por 265 pacientes com adenocarcinoma gástrico extraído do Portal cBio Cancer Genomics. A expressão do mRNA de FUCA2 foi associada à classificação de Lauren do tipo intestinal ($p = 0,0034$). E nos casos que apresentaram invasão nodal, $p = 0,0105$, em uma coorte de 357 pacientes. Outras análises envolvendo parâmetros clínicos e patológicos (idade, sexo) e sobrevida global e sobrevida livre de doença não foram estatisticamente significativas ($p > 0,05$).

5.15 Associação entre a expressão de FUCA2 e sobrevida livre de doença e sobrevida global

Nenhuma associação foi encontrada entre a coloração FUCA2 e no geral. A sobrevida média em dias (Máx. e Min.) foi 2.352 e 2, respectivamente. A sobrevida média em dias para casos marcados positivamente foi de 359 dias, em comparação com 432 dias para casos não marcados ($p > 0,05$). Também não houve significância na sobrevida livre de doença, sobrevida mínima e máxima em meses foram 2 e 78, respectivamente, com mediana de 14,5 meses para casos positivos e 20 meses para casos negativos ($p > 0,05$).

5.16 Análise de regressão logística univariada e multivariada

Não houve diferença significativa nas análises multivariadas para a expressão de FUCA2 (dados não mostrados).

5.17 Expressão de Siglec-15 em câncer gástrico

Siglec-15 foi marcado positivamente em 53 pacientes (74,64%), 17 pacientes do sexo feminino (23,94%) e 36 (50,70%) do sexo masculino. Nas lesões neoplásicas, o SIGLEC-15 foi observado no citoplasma em 14 amostras (26,41%), perinuclear em 4 (7,54%) e nuclear em apenas 1 amostra (1,88%). Por outro lado, combinações de coloração citoplasmática, nuclear e perinuclear foram observadas em 34 amostras (61,9%) (Figura 4B). Em 40 amostras (59,70%) dos 71 pacientes analisados apresentavam tecido normal adjacente, sendo 17 (42,5%) positivos para SIGLEC-15, principalmente nos ductos e células de produção das glândulas gástricas. Além disso, Siglec-15 foi detectado em 40,9% (9/22) da lesão pré-neoplásica Metaplasia intestinal (IM) e foi encontrada associação significativa entre a expressão de Siglec-15 no câncer gástrico em comparação com tecido gástrico adjacente normal não transformado e IM (IM) (Tabela 8). A análise de IHQ detectou Siglec-15 não apenas em células de câncer gástrico, mas em macrófagos infiltrantes de tumor (Figura 4A).

Tabela 8- Comparação emparelhada da coloração SIGLEC15 em células neoplásicas, tecido gástrico adjacente não transformado e metaplasia.

	Normal	Neoplasia	Metaplasia	Valor de p
SIGLEC15⁽⁺⁾	17	53	9	<0,0001
SIGLEC15⁽⁻⁾	40	18	13	

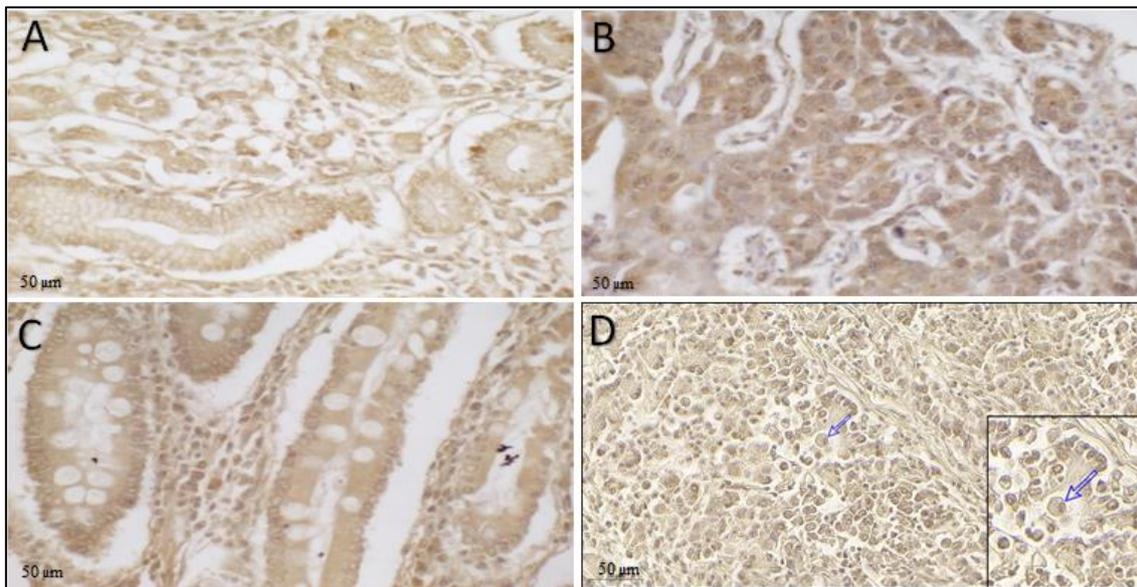


Figura 14-Imuno-histoquímica de SIGLEC15 em amostras de GC (A) coloração da membrana, (B) coloração citoplasmática e nuclear, (C) metaplasia positiva D) células mieloides no microambiente, Barra de escala: 50 µm.

Em relação ao Siglec-15 e sua associação com parâmetros clínico-patológicos, sua expressão esteve significativamente associada à classificação histológica ($p = 0,0022$) e invasão angiolinfática ($p = 0,041$), (Tabela 9). Curiosamente, a coloração de localização celular Siglec-15 também foi associada ao estágio tumor-nódulo-metástase (TNM) ($p = 0,01$). Pacientes com alto TNM (III + IV; 66,04%) apresentaram coloração Siglec-15 no citoplasma e múltiplos compartimentos celulares em comparação com pacientes com baixo estágio de TNM (I + II; 7,55%).

A análise adicional, incluindo idade, sexo, tipo de cirurgia, tratamento inicial, estado nodal, radioterapia, quimioterapia, linfonodo, infecção *H.Pylory* e classificação de Lauren não foram significativas. Em relação à sobrevida global, para Siglec-15 positivo foram 337 dias e

501 dias para o grupo negativo ($p = 0,2692$); para a sobrevida livre de doença, os grupos negativo e positivo tiveram sobrevida média de 18 e 14,5 meses, respectivamente ($p = 0,3929$) e não foram estatisticamente significantes.

O Siglec-15 também foi confirmado como preditor do grau histológico no GC pela análise multivariada, assim como pela Classificação de Lauren.

Tabela 9- Análise de associação da expressão de SIGLEC15 com características clínico-patológicas de pacientes com câncer gástrico.

Características clínico-patológicas	SIGLEC15 (+) n (%)	SIGLEC153 (-) n (%)	Valor de p
Idade (Anos)			
≥60	30 (42.25%)	6(8.45%)	0,1073
<60	23 (32.39%)	12(16.90%)	
Sexo			
Feminino	17(23.94%)	7(9.86%)	>0,9999
Masculino	36(50.70%)	11(15.49%)	
Cirurgia			
Gastrectomia Total	24(33.80%)	8(11.27%)	>0,9999
Gastrectomia Parcial	29(40.85%)	10(14.08%)	
Treatmento Neoadjuvante			
I	49(69.01%)	17(23.94%)	>0,9999
III	4(5.63%)	1(1.41%)	
Estadiamento cirúrgico (TNM)			
(I e II)	10(14.08%)	8(11.27%)	0,0566
(III e IV)	43(60.56%)	10(14.08%)	
Estadiamento cirúrgico (TNM)			
(II)	5(7.94%)	7(11.11%)	0,0075
(III)	42(66.67%)	9(14.29%)	
Envolvimento linfonodal			
SIM	36(50.70%)	10(14.08%)	0,3979
NÃO	17(23.94%)	8(11.27%)	
Grau Histológico			
GI + GII	32(45.07%)	3(4.23%)	0,0022
GIII	21(29.58%)	15(21.13%)	

Quimioterapia				
SIM	28(39.44%)	10(14.93%)	>0,9999	
NÃO	25(35.21%)	8(11.27%)		
Radioterapia				
SIM	15(21.13%)	6(8.45%)	0,7676	
NÃO	38(53.52%)	12(16.90%)		
Recidiva				
SIM	15(20.29%)	1(1.41%)	0,0546	
NÃO	38(53.52%)	17(23.94%)		
Classificação de Lauren				
INTESTINAL	28(41.18%)	6(8.82%)	0,1684	
DIFUSO	22(32.35%)	12(17.65%)		
Invasão Angiolinfática				
DETECTEDO	25(37.88%)	3(4.55%)	0,0412	
NÃO DETECTEDO	25 (37.88%)	13 (19.70%)		
Infecção por <i>H. Pylori</i>				
SIM	7(11.29%)	38(61.29%)	0,4267	
NÃO	1(1.61%)	16(25.81%)		
Teste exato de Fisher's.				

6 DISCUSSÃO GERAL

Este estudo detectou que a coloração tecidual de NEU3 se destacou em diferentes regiões da célula, incluindo apenas citoplasmáticas (50,77%), enquanto que 49,23% apresentavam combinações de marcação, membranar, citoplasmáticas, nuclear e perinuclear. A NEU3 remove o ácido siálico, de preferência do gangliosídeo GM3. GM3 é um componente abundante que forma complexos com moléculas de sinalização celular e é importante na modulação da adesão, crescimento e mobilidade das células. A NEU3 altera a organização e a ativação de moléculas envolvidas na patogênese do câncer nos microdomínios de glicosinapse (AKITA et al., 1997; KIZUKA et al., 2017a). Atualmente, é conhecido na literatura que a expressão de sialidases, como NEU1, NEU2 e NEU3, ocorre na membrana do lisossomo, no citosol e no plasma. No entanto, outras observações mostram que a localização subcelular da NEU3 pode variar com diferentes estímulos celulares. A expressão dessa enzima depende da localização acessível de seu substrato natural; há evidências de que a NEU3 também pode ser expressa no interior da membrana nuclear (WADA et al., 2007; WANG et al., 2009). Esses estudos justificam nossos achados em relação à localização de NEU3.

Dos pacientes positivos para NEU3, invasão angiolímfática foi encontrada em 50,00% das amostras; curiosamente, entre os pacientes negativos para NEU3, não foi encontrada nenhuma com invasão angiolímfática, essa associação pode estar relacionada ao fato desta enzima ter um papel importante na regulação da sinalização transmembranar e da superfície celular, através da modulação de gangliosídeos. Um estudo descobriu que a expressão aberrante de NEU3 está associada à invasão, motilidade e sobrevivência em cepas de câncer de mama e cólon (WADA et al., 2007). Além disso, encontramos uma associação significativa da expressão de NEU3 entre tecidos tumorais e metaplásicos. Isso sugere que esta enzima pode ter um papel importante no processo tumorigênese e metástase no CG. Níveis aumentados de expressão de NEU3 também já foram relatados na literatura em alguns tipos de câncer, como cólon, ovário, rim e próstata (FORCELLA et al., 2017).

Existe uma estreita relação entre a expressão de NEU3 e a via wnt / β -catenina, que é uma importante via de sinalização para a ativação da NEU3 e para a carcinogênese das neoplasias de TGI, como câncer de cólon. Essa via regula processos importantes, como migração e diferenciação celular. Quando o silenciamento de NEU3 foi promovido, resultou em menor clonogenicidade de cepas de adenocarcinoma do cólon, e crescimento

significativamente menor do câncer *in vivo* em camundongos *nude* (TAKAHASHI et al., 2015). Esses estudos demonstram que a NEU3 atua como um regulador positivo na promoção e progressão do câncer.

No presente estudo, não houve nenhuma associação de NEU3 com outros desfechos, progressão livre de doença e sobrevida global. Um estudo que incluiu imuno-histoquímica para analisar a expressão de Neu3 em 71 pacientes com adenocarcinoma de células claras do ovário também não apresentou diferença significativa nas curvas de sobrevida (NOMURA et al., 2006). O número de casos negativos para Neu3 foi um fator limitante durante a associação com dados clínicos, possivelmente um N mais alto pode ser capaz de produzir resultados significativos. Por meio de análises *in silico*, realizadas a partir dos dados de expressão do mRNA do cBioportal, não foi possível encontrar associação significativa entre o transcrito de NEU3 com os dados clínicos e de desfecho dos pacientes.

No câncer de pulmão de células não pequenas já foi descrito que a NEU3 regula as vias ERK e Akt através do EGFR. A expressão de NEU3 foi reduzida ou abolida quando o gefitinib, um inibidor da tirosina quinase do receptor de EGFR, foi usado (FORCELLA et al., 2017). O mesmo estudo avaliou a expressão do mRNA da NEU3 em alguns tipos de câncer e encontrou aumento da expressão no câncer de ovário (68,75%), próstata (55,56%) e colorretal (52,38%). Este estudo também avaliou o mRNA da NEU3 em 17 amostras de câncer gástrico e constatou que a expressão da NEU3 era alta, porém sem associação clínica.

No presente estudo, foi demonstrado pela primeira vez que a expressão de SIGLEC-15 foi positiva na maior parte dos casos CG. A expressão de SIGLEC-15 foi encontrada nas células neoplásicas, metaplásicas e normais, em todos os compartimentos celulares. A associação de receptores SIGLECs com o câncer têm sido relatadas na literatura, principalmente em neoplasias onco-hematológicas. Os SIGLECs têm papel de distinguir o próprio do não próprio, esse é um papel relevante diante das alterações na glicosilação que ocorrem no câncer. Um exemplo é o aumento da sialilação das glicoproteínas, um processo que mascara as células neoplásicas durante a carcinogênese. Esse processo por sua vez pode impedir os SIGLECs de cumprirem sua função fisiológica (FUSTER; ESKO, 2005).

Neste estudo foi possível avaliar que a expressão de SIGLEC-15 foi significativamente maior nas áreas de metaplasia e de neoplasia em comparação às áreas de tecido normal, isso mostra que essa lectina pode ter um papel relevante no processo de transformação maligna no

CG. No câncer, a produção de mucinas solúveis pode regular negativamente a resposta imune, através da ligação com receptores SIGLECs em células Natural Killers, células dendríticas e em monócitos(JASON E. HUDAK^{1,4}, STEPHEN M. CANHAM^{1,4}, 2014). Dessa maneira a alta expressão de SIGLECs reduz a resposta da imunidade inata contra as células cancerígenas por regulação negativa da resposta imune a antígenos sialilados. Uma meta-análise baseada no banco de dados TCGA revelou que o SIGLEC-15 é regulado positivamente em muitos tipos de tumores humanos em comparação ao tecido normal, incluindo bexiga, cólon, endometrióide, rim, fígado, tireoide e pulmão(WANG et al., 2019).

Wang J e colaboradores (2019) avaliaram o SIGLEC-15 em 241 amostras de câncer de pulmão de células não pequenas por imunofluorescência quantitativa e descobriram que esta proteína estava presente tanto nas células tumorais como em células estromais associadas a tumores (Células de origem mieloide- como macrófagos). No presente estudo, também foi detectado SIGLEC-15 em células do microambiente tumoral (TME), como macrófagos, corroborando o papel potencial dessa proteína na modulação do sistema imunológico. A lectina 15 do tipo imunoglobulina de ligação ao ácido siálico (SIGLEC-15) é um membro de uma família de proteínas de reconhecimento de ácido siálico envolvidas nas respostas imunes, reconhecendo ligantes e modulando a transdução de sinal intracelular(CROCKER; PAULSON; VARKI, 2007). Curiosamente, o SIGLEC-15 também está envolvido na diferenciação dos osteoclastos e infecções microbianas, expandindo seu papel em várias patologias, tornando essa proteína um alvo importante para futuras investigações em diversos campos da ciência (ANGATA, 2020).

Glicanos sialilados podem ser reconhecidos pelas SIGLEC7 e SIGLEC9, que são os membros conhecidos imunossupressores da família dos SIGLECs, que tem sua expressão relatada de forma aberrante, em leucemias e linfomas(ANGATA et al., 2007; MIYAZAKI et al., 2004). Outro estudo mostra que o SIGLEC9 possui papel imunossupressor, através da interação com as mucinas secretadas por células em câncer colorretal, impedindo a produção de interleucina 12, que é relacionada com a ativação da resposta Th1 e produção de IFN- λ (OHTA et al., 2010).

Estudos recentes identificaram o SIGLEC-15 como um novo alvo potencial para imunoterapia por seu papel supressor imunológico no TME(REN, 2019; WANG et al., 2019). Estes trabalhos mostram que o SIGLEC-15 é regulado positivamente nas células neoplásicas e superexpresso em macrófagos e células supressoras derivadas da linhagem mieloide, enquanto

poucas células mieloides normais expressam SIGLEC-15. Em contraste com PDL-1, a expressão de SIGLEC-15 em macrófagos é induzida pelo fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF), enquanto o IFN- γ inibe sua expressão. Ademais, o PD-L1 estava predominantemente localizado no citoplasma das células cancerígenas gástricas (ETO et al., 2016), enquanto no nosso estudo o SIGLEC-15 está nas regiões membranar, citoplasmáticas, perinucleares e nucleares das células tumorais. SIGLEC-15 também foi mais encontrada em pacientes com estadiamento mais avançado, sugerindo que essas proteínas supressoras imunológicas podem ter diferentes papéis (ou impactos) em diferentes estágios do câncer que devem ser mais investigados.

No presente estudo, foi demonstrado que a alta expressão de SIGLEC-15 estava intimamente relacionada ao grau histológico mais diferenciado, mantido na análise multivariada. Até o momento, não existem estudos que avaliaram a expressão de SIGLEC-15 de acordo com o grau de diferenciação dos tumores como cólon, tireoide, bexiga rim, pulmão. A alta expressão de SIGLEC-15 nessas amostras de tumores gástricos mais diferenciados pode implicar um papel anterior dessa proteína na modulação do microambiente tumoral. O SIGLEC-15 também foi positivo em maior proporção, quando o estadiamento TNM esteve em grau mais avançado (III). Houve marcação de SIGLEC-15 em quase todos os pacientes que apresentaram invasão angiolinfática. Essa relação de SIGLEC-15 com grau histológico bem e moderadamente diferenciados, com estadiamentos mais avançados e invasão angiolinfática sugere que essa lectina pode exercer uma função importante na tumorigênese e na progressão do câncer gástrico. TAKAMIYA et al., 2013, demonstraram que o SIGLEC-15 é expresso em um subconjunto de macrófagos associados ao tumor, em um modelo de co-cultura com células THP-1 (macrófagos derivados de leucemia monocítica humana) e H157 (carcinoma de pulmão humano). Os macrófagos associados a tumores (TAMs) reconhecem especificamente antígenos do grupo sialil-Tn, em vários tumores humanos, e em resposta às células positivas para sTn, os macrófagos secretam o fator de crescimento transformante (TGF- β). Ou seja, o SIGLEC-15 reconhece o antígeno e transduz o sinal, aumentando a secreção de TGF- β . Este fator produzido pelas células tumorais e pelos macrófagos, contribui para a tumorigênese e para metástase, através da inibição do sistema imune e da invasão das células tumorais (FLAVELL, RICHARD, SHOMYSEH SANJABI, STEPHEN WRZESINSKI, 2010).

Seria interessante avaliar o status programado morte ligante-1 (PDL-1) nessas amostras de GC para investigar se a expressão de SIGLEC-15 é mutuamente exclusiva a de PDL-1, como foi observado no adenocarcinoma de pulmão(WANG et al., 2019).

A imunoterapia contra o câncer utilizando bloqueio do PD-1 / PD-L1 impactou o tratamento de várias neoplasias. No entanto, esses pontos de verificação imunológicos são responsáveis apenas por uma parcial da imunidade disfuncional nos tumores sólidos humanos e muitos pacientes que respondem inicialmente adquirem resistência a essas terapias com doenças recorrentes(NOWICKI; HU-LIESKOVAN; RIBAS, 2018). Portanto, pesquisar novos normalizadores imunológicos aumentará as possibilidades de imunoterapia contra o câncer, como o SIGLEC-15. Um ensaio clínico de fase I está em andamento para avaliar o efeito do anti-SIGLEC-15 humanizado (NC318) em tumores sólidos e novos achados trazem uma grande expectativa.

Também avaliamos a expressão da sialiltransferase, ST3GAL3 e identificamos uma baixa expressão, predominantemente citoplasmática, dessa enzima nesse tipo de câncer da nossa coorte. O ST3GAL3 é uma das enzimas responsáveis pela adição de ácido neuramínico aos resíduos terminais do dissacarídeo Gal β 1-3 / 4GlcNAc. Essa sialiltransferase participa de vários eventos biológicos e representa o candidato mais provável, in vivo, à biossíntese de sLea(KITAGAWA; PAULSON, 1993).

Um estudo para caracterizar a expressão de diferentes sialiltransferases nas linhas celulares HeLa identificou que essas enzimas desempenham funções diferentes na proliferação e adesão celular, sinalizando e competindo entre si pela sialilação das proteínas alvo. O mesmo estudo também observou que essa expressão pode variar dependendo da tecido e que ST3GAL3 estava mais relacionado à sialilação da N-caderina, uma proteína transmembranar associada à adesão celular(QI et al., 2020). O estudo não encontrou associação significativa da expressão de ST3GAL3 entre tecidos tumorais, metaplásicos e mucosa normal.

Nosso estudo identificou que a expressão de ST3GAL3 é maior em graus histológicos iniciais e menor em graus mais avançados (G3). Em convergencia a esse achado, observamos que nos casos em que a expressão de ST3GAL3 era positiva, as amostras eram classificadas no tipo intestinal da classificação de Lauren. Um estudo de Jun et al., avaliou a expressão de seis *GENES* de sialiltransferases no câncer gástrico: ST3Gal1, ST3Gal2, ST3GAL3, ST3Gal4, ST3Gal5 e ST3Gal6, e observou que St3gal3 foi o que apresentou os maiores valores de

expressão de mRNA. A expressão de St3gal3 estava relacionada aos altos níveis de resíduos de NeuNAc ligados a α 2,3, na superfície celular, que por sua vez estão associados ao comportamento maligno das células cancerígenas gástricas. Este estudo mostrou que St3gal4 está mais envolvido no desenvolvimento de características malignas no câncer gástrico do que ST3GAL3(LI et al., 2012).

A expressão de ST1 e ST3GAL3 já foi avaliada no câncer e mucosa normal de 55 pacientes com câncer gástrico, por meio de um ensaio radiométrico, e constatou que os níveis das duas sialiltransferases também estavam aumentados nas células da mucosa normal (GRETSCHEL et al., 2003). Esse estudo justifica que o ST3GAL3 é aumentado nos estágios iniciais do processo de tumorigênese, mas existem outras sialiltransferases responsáveis pelo fenótipo menos favorável para pacientes com câncer gástrico. Nosso estudo sugere que ST3GAL3 pode ser um indicador de bom prognóstico em pacientes com adenocarcinoma gástrico.

ZHANG e colaboradores avaliaram a expressão de ST3GAL3 em células tumorais ovarianas HO8910PM (mais tumorigênica) e SKOV3 (menos tumorigênica). Após análise por qRT-PCR, eles observaram um aumento na expressão de sialiltransferase nas células HO8910PM quando comparadas às células SKOV3; os ensaios de Western blotting confirmaram um aumento de até duas vezes entre as cepas. As cepas foram tratadas com PACLITAXEL, com o consequente cálculo do IC50 das células e o de HO8910PM foi duas vezes mais resistente à droga quando comparadas à cepa SKOV3. Os resultados obtidos por ZHANG et al. indicam que o aumento da expressão de ST3GAL3 está relacionado à sobrevivência de células cancerígenas do ovário, fugindo da morte celular programada e ao aumento da resistência ao PACLITAXEL(ZHANG; WUHRER; HOLST, 2018). Eles também indicam que a expressão de ST3GAL3 pode variar no mesmo tipo de câncer, mas em diferentes linhagens celulares, com diferentes capacidades de progressão. Portanto, a expressão de ST3GAL3 não está apenas ligada ao tipo de tecido, mas também está relacionada à capacidade tumorigênica do câncer.

Nos dados obtidos da coorte de validação, identificamos que a expressão do mRNA de ST3GAL3 estava relacionada ao prognóstico menos favorável, essa oposição de resultados pode ser justificada pelo fato de que essas coortes são de pacientes que divergem em continentes (Ásia e Europa) e hábitos alimentares. Além disso existe a diversidade molecular presente no

câncer gástrico, heranças genéticas e outros fatores ambientais aos quais nossa coorte foi exposta.

Assim como sialilação a fucosilação é um evento bioquímico que se encontra alterado no processo carcinogênico e ainda é pouco estudado. A TSTA3 é uma das principais enzimas relacionadas ao processo de fucosilação (MORIWAKI et al., 2009; TONETTI et al., 1996; YUAN et al., 2008). Ele participa diretamente da produção da GDP-L-Fucose, um substrato importante para as fucosiltransferas, a partir do metabolismo da manose (KIZUKA et al., 2017a).

A marcação celular de TSTA3 foi predominantemente citoplasmática, mas também houve coloração de membrana, perinuclear e nuclear. Um estudo publicado em 2013 avaliou a expressão de TSTA3 por imuno-histoquímica no câncer colorretal e identificou na maioria das amostras uma marcação citoplasmática, mas em algumas amostras houve intensa marcação na região perinuclear(VILLAR-PORTELA et al., 2013).

Nosso estudo demonstrou que amostras positivas para TSTA3 apresentavam um grau histológico menos avançado da doença. Um estudo de Yang, 2018, demonstrou que a imunoeexpressão elevada de TSTA3 está relacionada a estágios mais avançados do carcinoma de células escamosas do esôfago(YANG et al., 2018). Outros estudos relatam que o aumento da expressão de TSTA3 altera a fucosilação e está relacionado ao pior prognóstico e metástase no carcinoma hepatocelular e à baixa sobrevida de pacientes com câncer de pulmão de células não pequenas (NORTON; MEHTA, 2019; PARK et al., 2020)]. Embora controversos, os dados mostram que a expressão de TSTA3 pode ter perfil de expressão diferente e valor prognóstico diferente dependendo do tipo de câncer estudado. Corroborando com o grau histológico TSTA3 foi evidenciada no tipo intestinal da classificação de Lauren, que apesar de ser o tipo mais frequente, é mais diferenciado e associado a lesões menos agressivas. Comparado ao tipo difuso, o tipo intestinal apresenta melhor prognóstico, pois o tipo difuso é pouco diferenciado, possui maior grau de penetração e não está associado a lesões pré-cancerígenas(ZHENG et al., 2008).

Nesse estudo, não foi encontrada associação positiva de TSTA3 com outros parâmetros clínicos avaliados bem como progressão livre de doença e sobrevida global. No entanto, um estudo com câncer de mama demonstra que a baixa expressão de TSTA3 significa maior tempo

de sobrevivência do que aqueles com alto nível de TSTA3(SUN et al., 2016). Isso corrobora que a expressão dessa enzima é tecido dependente e que seu valor clínico também.

Neste estudo, a expressão de FUCA2 foi observada em 56 de 63 amostras de pacientes com adenocarcinoma gástrico. A maioria das marcações estava localizada na região citoplasmática, comparando-as com os dados clínicos e patológicos, foi possível demonstrar que a expressão de FUCA2 foi detectada preferencialmente em tumores em estágios avançados (estágio 2 a 3). As α -L fucosidases são as principais enzimas que catalisam a remoção dos resíduos terminais de L-fucose ligados via α -1,2, α -1,3, α -1,4 ou α -1,6 à N-acetil glucosamina dos oligossacarídeos (CARLOS; RODRÃO; VIN, 2001; SULZENBACHER et al., 2004). A fucosilação de moléculas superficiais altera o fenótipo e a função das células tumorais, consequentemente contribui para a capacidade de progressão do câncer(LISTINSKY; SIEGAL; LISTINSKY, 2011). Em pacientes asiáticos com câncer de mama foi observado um aumento significativo da atividade da FUCA no tecido maligno nos estágios iniciais (CHENG et al., [s.d.]).

Um outro estudo sugere o uso de FUCA em combinação com CD26 pode servir para o diagnóstico precoce de câncer colorretal. Neste estudo, o uso combinado proporcionou alta sensibilidade e especificidade no diagnóstico, especialmente no estágio inicial (TNM I)(AYUDE et al., 2003).

A FUCA2 é a principal responsável pela transferência da L-fucose das células cancerígenas para o *H. pylori*, além de aumentar a expressão de antígenos de Lewis x importantes para a adesão bacteriana do *H. pylori*, permiti a camuflagem bacteriana como defesa do sistema imunológico. No presente estudo, poucas amostras com *H. pylori* foram encontradas, apenas 9 do total, todas foram positivas para FUCA2. Os poucos casos encontrados podem ser explicados pelo método de coloração não indicado para esse tipo de análise. É recomendado o uso da ureia endoscópica que é mais sensível e específica e, portanto, pode detectar casos mais positivos para essa bactéria, por isso acreditamos que o número de casos positivos para *H.pylori* em nossa coorte seja subestimado (UOTANI; GRAHAM, 2015). Nenhuma referência a *H. pylori* foi encontrada nos registros médicos do paciente.

Análise desta coorte e comparação com outros estudos que também identificaram expressão elevada de FUCA no estado inicial do tumor e nos leva a sugerir que o FUCA2 é um potencial biomarcador prognóstico, pois permite a detecção precoce do câncer gástrico. A

detecção precoce é uma grande dificuldade para o câncer gástrico, devido à ausência de sintomas ou mesmo à escassez de biomarcadores. Esses fatores limitam o tratamento e a sobrevida do paciente.

O câncer gástrico é resultado da interação de fatores genéticos e ambientais, doenças crônicas e/ou decorrente de uma resposta inflamatória contínua, muitas vezes provocada por infecções microbianas, que tem grande impacto no início, na progressão do tumor e na resposta ao tratamento (ROESCH-DIETLEN et al., 2018b). Os fatores de risco podem estar ligados a alimentação rica em sal, em produtos defumados, alimentos contaminados com pesticidas e fertilizantes. Mas, o maior fator de risco para o surgimento do CG está ligado à bactéria *Helicobacter pylori* que consegue vencer a proteção de enzimas proteolíticas, do suco gástrico e das mucinas. Esses microrganismos expressam lipopolissacarídeos que carregam determinantes do grupo sanguíneo de Lewis, mimetizando os padrões sanguíneos e permitem que eles escapem da resposta imune, mantendo dessa forma a colonização assintomática (PLUMMER et al., 2015). A bactéria *H. pylori* também expressa adesinas que reconhecem receptores de glicanos, expressos no epitélio gástrico, gerando gastrite, atrofia, metaplasia e úlceras (FERREIRA et al., 2011; PINHO et al., 2013).

A pesquisa em torno de biomarcadores contempla as modificações de glicoconjugados (glicolipídeos, glicoproteínas) que são um hallmarker do câncer de uma forma geral. Atualmente existe um consenso de que a expressão de O-glicanos truncados sialilados e fucosilados estejam relacionados a progressão e disseminação do câncer gástrico (MEREITER et al., 2016). A descoberta de novos biomarcadores continua sendo algo essencial no que se refere ao câncer gástrico. Isto porque ainda não existe um marcador específico para diagnóstico ou prognóstico da doença (MEREITER et al., 2016). O presente trabalho demonstrou que as proteínas NEU3, ST3GAL3, SIGLEC-15, FUCA2 e TSTA3, são mais expressas em algumas condições clínico patológicas. Desta maneira é possível sugerir que essas proteínas podem ser candidatas a biomarcadores de melhor prognóstico (TSTA3 e ST3GAL3) e pior prognóstico (FUCA2 e SIGLEC15) ou auxiliar o desfecho de pacientes com CG.

7 CONCLUSÕES

- A expressão de NEU3 foi mais detectado no tecido neoplásico e metaplásico, indicando que é uma alternativa na detecção de tecido gástrico anormal. A positividade de NEU3 esteve muito elevada nas nossas amostras, isso limitou alguma possível correlação com os dados clínicos.
- O ST3GAL3, quando expresso, indicou o melhor status prognóstico em pacientes com graus histológicas iniciais e tipo intestinal da classificação de Lauren.
- O SIGLEC-15 foi mais expresso nas áreas de metaplasia e neoplasia do que em áreas de tecido normal. A expressão de Siglec-15 foi frequentemente observada em células cancerígenas gástricas e em células estromais associadas a tumores (macrófagos e células mieloides), e sua expressão foi significativamente correlacionada com tecidos histológicos bem diferenciados.
- O presente estudo é o primeiro a definir a relevância prognóstica do Siglec-15 em pacientes com câncer gástrico, com associação significativa com a classificação histológica e invasão angiolinfática.
- Portanto, esses achados sugerem uma possível possibilidade prognóstica e terapêutica do Siglec-15 e mais estudos serão importantes para definir seu papel clínico no câncer gástrico.
- Os resultados sugerem que a expressão de TSTA3 está associada ao estadiamento cirúrgico inicial e ao tipo intestinal da classificação de Lauren. A análise in silico confirma o aumento da expressão de TSTA3 em graus histológicos bem e moderadamente diferenciados.
- FUCA2 foi mais expresso em amostras com estadiamento cirúrgico mais avançado. No estudo in silico, FUCA2 foi associado com o tipo intestinal da classificação de Lauren, e com pacientes que tiveram invasão nodal.
- Não foram encontradas correlações entre NEU3, SIGLEC-15, ST3GAL3, TSTA3 e FUCA2 com Sobrevida Global e Sobrevida Livre da Doença.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, O. J. et al. Targeting sialic acid-Siglec interactions to reverse immune suppression in cancer. **Glycobiology**, v. 28, n. 9, p. 640–647, 2018.
- AKITA, H. et al. Immunohistochemical evidence for the existence of rat cytosolic sialidase in rat skeletal muscles. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 107, n. 6, p. 495–503, 1997.
- ALI, S. et al. Leukocyte Extravasation: An Immuregulatory Role for α -1-Fucosidase? **The Journal of Immunology**, v. 181, n. 4, p. 2407–2413, 2008.
- ALI, S. M. et al. Prospective Comprehensive Genomic Profiling of Advanced Gastric Carcinoma Cases Reveals Frequent Clinically Relevant Genomic Alterations and New Routes for Targeted Therapies. **The Oncologist**, v. 20, n. 5, p. 499–507, 2015.
- ANASTASIA, L. et al. NEU3 sialidase strictly modulates GM3 levels in skeletal myoblasts C2C12 thus favoring their differentiation and protecting them from apoptosis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 52, p. 36265–36271, 2008.
- ANGATA, T. et al. Siglec-15: An immune system Siglec conserved throughout vertebrate evolution. **Glycobiology**, v. 17, n. 8, p. 838–846, 2007.
- ANGATA, T. Siglec-15: a potential regulator of osteoporosis, cancer, and infectious diseases. **Journal of biomedical science**, v. 27, n. 1, p. 10, 2020.
- ARTHMAR, C. et al. Mortalidade por câncer de mama em hospital de referência em oncologia , Vitória , **ES Breast cancer mortality among**, v. 16, n. 3, p. 582–591, 2013.
- AYUDE, D. et al. Clinical interest of the combined use of serum CD26 and alpha-L-fucosidase in the early diagnosis of colorectal cancer. **Disease Markers**, v. 19, n. 6, p. 267–272, 2003.
- BADR, H. A. et al. Lectin approaches for glycoproteomics in FDA-approved cancer biomarkers. **Expert Review of Proteomics**, v. 11, n. 2, p. 227–236, 2014.
- BEATSON, R. et al. MUC1 modulates the tumor immune microenvironment through the engagement of Siglec-9. **Nature immunology**, v. 17, n. 11, p. 1273–1281, 2016.
- BLANAS, A. et al. Fucosylated antigens in cancer: An alliance toward tumor progression, metastasis, and resistance to chemotherapy. **Frontiers in Oncology**, v. 8, n. FEB, p. 1–14, 2018.
- BONELLI, P. et al. Precision medicine in gastric cancer. **World Journal of Gastrointestinal Oncology**, v. 11, n. 10, p. 804–829, 2019.
- BOSMAN, F.T., CARNEIRO, F., HRUBAN, R.H., THEISE, N. D. **WHO Classification of Tumours of the Digestive System** No Title. 4th Editio ed. France: Lyon : IARC Press, 2010., 2010.

- BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394–424, 2018.
- BURLEIGH, S. C. et al. Synergizing metabolic flux analysis and nucleotide sugar metabolism to understand the control of glycosylation of recombinant protein in CHO cells. **BMC Biotechnology**, v. 11, n. 1, p. 95, 2011.
- CAMPOS, D. et al. Probing the O-glycoproteome of gastric cancer cell lines for biomarker discovery. **Molecular and Cellular Proteomics**, v. 14, n. 6, p. 1616–1629, 2015.
- CAO, Y. et al. Decreased expression of Siglec-8 associates with poor prognosis in patients with gastric cancer after surgical resection. **Tumor Biology**, v. 37, n. 8, p. 10883–10891, 2016.
- CHENG, T. et al. Down-regulation of α -L-fucosidase 1 expression confers inferior survival for triple-negative breast cancer patients by modulating the glycosylation status of the tumor cell surface, **Oncotarget**, v. 6, n. 25, [s.d.].
- CHOI, Y. J.; KIM, N. Gastric cancer and family history. **Korean Journal of Internal Medicine**, v. 31, n. 6, p. 1042–1053, 2016.
- CHRISTIANSEN, M. N. et al. Cell surface protein glycosylation in cancer. **Proteomics**, v. 14, n. 4–5, p. 525–546, 2014.
- CHUNG, C. Y. et al. Assessment of the coordinated role of ST3GAL3, ST3GAL4 and ST3GAL6 on the α 2,3 sialylation linkage of mammalian glycoproteins. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 463, n. 3, p. 211–215, 2015.
- COSTA, N. R.; GIL DA COSTA, R. M.; MEDEIROS, R. A viral map of gastrointestinal cancers. **Life Sciences**, v. 199, p. 188–200, 2018.
- CROCKER, P. R.; PAULSON, J. C.; VARKI, A. Siglecs and their roles in the immune system. **Nature Reviews Immunology**, v. 7, n. 4, p. 255–266, 2007.
- DE LIMA, M. A. P. et al. Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma in Brazil: Comparison between in situ hybridization and polymerase chain reaction detection. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 1, p. 393–404, 2012.
- DE SOUZA, M. D. F. D. et al. Overexpression of UDP-Glucose 4-Epimerase Is Associated with Differentiation Grade of Gastric Cancer. **Disease Markers**, v. 2019, p. 1–5, 2019.
- DIMITROVA, N. et al. The CBio Cancer Genomics. **PLoS ONE**, v. 32, n. 7, p. 736–740, 2017.
- DOHERTY, M. et al. Plasma N-glycans in colorectal cancer risk. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–12, 2018.
- ELSAYED, E. T. et al. Plasma long non-coding RNA HOTAIR as a potential biomarker for

- gastric cancer. **International Journal of Biological Markers**, v. 33, n. 4, p. 528–533, 2018.
- ERDOGDU, I. H. MHC class 1 and PDL-1 status of primary tumor and lymph node metastatic tumor tissue in gastric cancers. **Gastroenterology Research and Practice**, v. 2019, 2019.
- ETO, S. et al. Programmed cell death protein 1 expression is an independent prognostic factor in gastric cancer after curative resection. **Gastric Cancer**, v. 19, n. 2, p. 466–471, 2016.
- FERREIRA, J. et al. Helicobacter pylori cell-surface glycans structural features: Role in gastric colonization, pathogenesis, and carbohydrate-based vaccines. **Carbohydrate Chemistry**, v. 37, p. 160–193, 12 dez. 2011.
- FERREIRA, J. A. et al. Protein glycosylation in gastric and colorectal cancers: Toward cancer detection and targeted therapeutics. **Cancer Letters**, v. 387, p. 32–45, 2017.
- FLAVELL, RICHARD , SHOMYSEH SANJABI, STEPHEN WRZESINSKI, P. L.-L. The polarization of immune cells in tumor environment by TGFbeta. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, n. 8, p. 3–5, 2010.
- FORCELLA, M. et al. Non-small cell lung cancer (NSCLC), EGFR downstream pathway activation and TKI targeted therapies sensitivity: Effect of the plasma membrane-associated NEU3. **PLoS ONE**, v. 12, n. 10, p. 1–20, 2017.
- FORCELLA, M. et al. Deregulation of sialidases in human normal and tumor tissues. **Cancer Biomarkers**, v. 21, n. 3, p. 591–601, 2018.
- FREEZE, H. H. Understanding human glycosylation disorders: Biochemistry leads the charge. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 10, p. 6936–6945, 2013.
- FUSTER, M. M.; ESKO, J. D. The sweet and sour of cancer: Glycans as novel therapeutic targets. **Nature Reviews Cancer**, v. 5, n. 7, p. 526–542, 2005.
- GAN, Y.; LIANG, Q.; SONG, X. Diagnostic value of alpha-L-fucosidase for hepatocellular carcinoma: A meta-analysis. **Tumor Biology**, v. 35, n. 5, p. 3953–3960, 2014.
- GRETSCHEL, S. et al. Clinical relevance of sialyltransferases ST6GAL-I and ST3GAL-III in gastric cancer. **Oncology**, v. 65, n. 2, p. 139–145, 2003.
- GUO, T. et al. Selective Inhibitors of Human Neuraminidase 3. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 61, n. 5, p. 1990–2008, 2018.
- HAKOMORI, S. I.; HANDA, K. GM3 and cancer. **Glycoconjugate Journal**, v. 32, n. 1–2, p. 1–8, 2015.
- HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011.
- HASEGAWA, T. et al. Molecular cloning of mouse ganglioside sialidase and its increased expression in Neuro2a cell differentiation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 11, p.

8007–8015, 2000.

HÄUSELMANN, I.; BORSIG, L. Altered tumor-cell glycosylation promotes metastasis. **Frontiers in Oncology**, v. 4 MAR, n. February, p. 1–15, 2014.

HEBBAR, M. et al. Prognostic value of circulating soluble E-selectin concentrations in node-negative breast cancer patients. **Clinical Cancer Research**, v. 5, n. 6, p. 1427–1433, 1999.

HIRSCHBERG, C. B. My journey in the discovery of nucleotide sugar transporters of the Golgi apparatus. **Journal of Biological Chemistry**, v. 293, n. 33, p. 12653–12662, 2018.

HU, A. et al. Serum Concentrations of 15 Elements Among Helicobacter Pylori-Infected Residents from Lujiang County with High Gastric Cancer Risk in Eastern China. **Biological Trace Element Research**, v. 186, n. 1, p. 21–30, 2018a.

HU, Y. et al. Lanatoside C inhibits cell proliferation and induces apoptosis through attenuating Wnt/ β -catenin/c-Myc signaling pathway in human gastric cancer cell. **Biochemical Pharmacology**, v. 150, p. 280–292, 2018b.

HUANG, K. H. et al. Caspase-3, a key apoptotic protein, as a prognostic marker in gastric cancer after curative surgery. **International Journal of Surgery**, v. 52, p. 258–263, 2018.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Estimate/2018 – Cancer Incidence in Brazil**. [s.l.: s.n.].

INTRA, J. et al. Comparative and phylogenetic analysis of α -l-fucosidase genes. **Gene**, v. 392, n. 1–2, p. 34–46, 2007.

ISHIDA, S. et al. Alpha-L-fucosidase-1 is a diagnostic marker that distinguishes mucoepidermoid carcinoma from squamous cell carcinoma. **Pathology International**, v. 69, n. 2, p. 76–85, 2019.

JANSSEN, J. The impact of EUS in primary gastric lymphoma. **Best Practice and Research: Clinical Gastroenterology**, v. 23, n. 5, p. 671–678, 2009.

JASON E. HUDAK^{1,4}, STEPHEN M. CANHAM^{1,4}, AND C. R. B. Glycocalyx Engineering Reveals a Siglec-Based Mechanism for NK Cell Immuno-evasion. **Physiology & behavior**, v. 10, n. 1, p. 69–79, 2014.

JIN XL, ZHENG SS, WANG BS, C. H. Chen HL. Correlação de mRNA de glicosiltransferases expressão no carcinoma extra-hepático do ducto biliar com patologia clínica características. **Pancreat Hepatobiliary Dis Int.**, v. 3, n. 2, p. 292–295, 2004.

KAJANDER, T. et al. Dual interaction of factor H with C3d and glycosaminoglycans in host-nonhost discrimination by complement. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 7, p. 2897–2902, 2011.

KAMINUMA, O. et al. Contribution of neuraminidase 3 to the differentiation of induced regulatory T cells. **Genes to Cells**, v. 23, n. 2, p. 112–116, 2018.

- KATOH, S. et al. CD44 is critical for airway accumulation of antigen-specific Th2, but not Th1, cells induced by antigen challenge in mice. **European Journal of Immunology**, v. 41, n. 11, p. 3198–3207, 2011.
- KIM, K. H. et al. Direct Monitoring of Fucosylated Glycopeptides of Alpha-Fetoprotein in Human Serum for Early Hepatocellular Carcinoma by Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry with Immunoprecipitation. **Proteomics - Clinical Applications**, v. 12, n. 6, p. 1–28, 2018.
- KITAGAWA, H.; PAULSON, J. C. Cloning and expression of human Gal-beta1,3(4)GlcNAc-alpha2,3-sialyltransferase. *Biochemical and biophysical research communications*, **Biochem Biophys Res Commun**, 1993.
- KIZUKA, Y. et al. An Alkynyl-Fucose Halts Hepatoma Cell Migration and Invasion by Inhibiting GDP-Fucose-Synthesizing Enzyme FX, TSTA3. **Cell Chemical Biology**, v. 24, n. 12, p. 1467- 1478.e5, 2017a.
- KIZUKA, Y. et al. An Alkynyl-Fucose Halts Hepatoma Cell Migration and Invasion by Inhibiting GDP-Fucose-Synthesizing Enzyme FX, TSTA3. **Cell Chemical Biology**, v. 24, n. 12, p. 1467- 1478.e5, 2017b.
- KRILAVICIUTE, A. et al. Potential of non-invasive breath tests for preselecting individuals for invasive gastric cancer screening endoscopy. **Journal of Breath Research**, v. 12, n. 3, 2018.
- KUO, P.; LE, Q.-T. Galectin-1 links tumor hypoxia and radiotherapy. **Glycobiology**, v. 24, n. 10, p. 921–925, 2014.
- LAUREN, P. the Two Histological Main Types of Gastric Carcinoma: Diffuse and So-Called Intestinal-Type Carcinoma. an Attempt At a Histo-Clinical Classification. **Acta pathologica et microbiologica Scandinavica**, v. 64, p. 31–49, 1965.
- LEE, H. J. et al. The role of chronic inflammation in the development of gastrointestinal cancers: Reviewing cancer prevention with natural antiinflammatory intervention. **Expert Review of Gastroenterology and Hepatology**, v. 10, n. 1, p. 129–139, 2016.
- LEVY, G. A. Mammalian α -L-fucosidase. **Nature**, v. 186, n. 4723, p. 472–473, 1960.
- LI, J. et al. Altered mRNA expressions of sialyltransferases in human gastric cancer tissues. **Medical Oncology**, v. 29, n. 1, p. 84–90, 2012.
- LI, J. et al. Unmasking Fucosylation: from Cell Adhesion to Immune System Regulation and Diseases. **Cell Chemical Biology**, v. 25, n. 5, p. 499–512, 2018.
- LI, Y. et al. DERL3 functions as a tumor suppressor in gastric cancer. **Computational Biology and Chemistry**, v. 84, p. 107172, 1 fev. 2020.
- LIN, L. Y. et al. Tumor-originated exosomal lncUEGC1 as a circulating biomarker for early-stage gastric cancer. **Molecular Cancer**, v. 17, n. 1, p. 1–6, 2018.
- LISTINSKY, J. J.; SIEGAL, G. P.; LISTINSKY, C. M. The emerging importance of α -L-

fucose in human breast cancer: A review. **American Journal of Translational Research**, v. 3, n. 4, p. 292–322, 2011.

LIU, T. W. et al. Role for α -L-fucosidase in the control of Helicobacter pylori-infected gastric cancer cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 34, p. 14581–14586, 2009.

LLOYD, K. O. The chemistry and immunochemistry of blood group A, B, H, and Lewis antigens: Past, present and future. **Glycoconjugate Journal**, v. 17, n. 7–9, p. 531–541, 2000.

LUDWIG, K. et al. Totally laparoscopic versus open gastrectomy for gastric cancer: A matched pair analysis. **Zentralblatt fur Chirurgie - Zeitschrift fur Allgemeine, Viszeral- und Gefasschirurgie**, v. 143, n. 2, p. 145–154, 2018.

MACAULEY, M. S.; CROCKER, P. R.; PAULSON, J. C. Siglec-mediated regulation of immune cell function in disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 10, p. 653–666, 2014.

MAY, M. Attacking an epidemic. **Scientific American**, v. 311, n. 1, p. 9–10, 2014.

MEEZAN, E. et al. Comparative Studies on the Carbohydrate-Containing Membrane Components of Normal and Virus-Transformed Mouse Fibroblasts. II. Separation of Glycoproteins and Glycopeptides by Sephadex Chromatography. **Biochemistry**, v. 8, n. 6, p. 2518–2524, 1969.

MEREITER, S. et al. Glycomic analysis of gastric carcinoma cells discloses glycans as modulators of RON receptor tyrosine kinase activation in cancer. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1860, n. 8, p. 1795–1808, 2016.

MIURA, J. T. et al. Tumor profiling of gastric and esophageal carcinoma reveal different treatment options. **Cancer Biology and Therapy**, v. 16, n. 5, p. 764–769, 2015.

MIYAGI, T. et al. Plasma membrane-associated sialidase as a crucial regulator of transmembrane signalling. **Journal of Biochemistry**, v. 144, n. 3, p. 279–285, 2008.

MIYAGI, T.; YAMAGUCHI, K. Mammalian sialidases: Physiological and pathological roles in cellular functions. **Glycobiology**, v. 22, n. 7, p. 880–896, 2012.

MIYAZAKI, K. et al. Loss of disialyl Lewis^x, the ligand for lymphocyte inhibitory receptor sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin-7 (Siglec-7) associated with increased sialyl Lewis^x expression on human colon cancers. **Cancer Research**, v. 64, n. 13, p. 4498–4505, 2004.

MIYOSHI, E. et al. Fucosylation is a promising target for cancer diagnosis and therapy. **Biomolecules**, v. 2, n. 1, p. 34–45, 2012.

MONTI, E. et al. Sialidases in Vertebrates. A Family Of Enzymes Tailored For Several Cell Functions, **Adv Carbohydr Chem Biochem**, v. 64, 2010.

MORIWAKI, K. et al. A high expression of GDP-Fucose transporter in hepatocellular

carcinoma is a key factor for increases in fucosylation. **Glycobiology**, v. 17, n. 12, p. 1311–1320, 2007.

MORIWAKI, K. et al. Deficiency of GMDS Leads to Escape from NK Cell-Mediated Tumor Surveillance Through Modulation of TRAIL Signaling. **Gastroenterology**, v. 137, n. 1, p. 188–198.e2, 2009.

MORIWAKI, K.; MIYOSHI, E. Fucosylation and gastrointestinal cancer. **World Journal of Hepatology**, v. 2, n. 4, p. 151–161, 2010.

MUNKLEY, J.; ELLIOTT, D. J. Hallmarks of glycosylation in cancer. **Oncotarget**, v. 7, n. 23, p. 35478–35489, 2016.

NATONI, A.; MACAULEY, M. S.; O'DWYER, M. E. Targeting selectins and their ligands in cancer. **Frontiers in Oncology**, v. 6, n. APR, p. 1–12, 2016.

NICCOLAI, E. et al. Gastric cancer and the epoch of immunotherapy approaches. **World Journal of Gastroenterology**, v. 21, n. 19, p. 5778–5793, 2015.

NISHIKAWA, J. et al. Clinical importance of Epstein–Barr virus-associated gastric cancer. **Cancers**, v. 10, n. 6, p. 1–13, 2018.

NOMURA, H. et al. Expression of NEU3 (plasma membrane-associated sialidase) in clear cell adenocarcinoma of the ovary: Its relationship with T factor of pTNM classification. **Oncology Research**, v. 16, n. 6, p. 289–297, 2006.

NORTON, P. A.; MEHTA, A. S. Expression of genes that control core fucosylation in hepatocellular carcinoma: Systematic review. **World Journal of Gastroenterology**, v. 25, n. 23, p. 2947–2960, 2019.

NOWICKI, T. S.; HU-LIESKOVAN, S.; RIBAS, A. Mechanisms of Resistance to PD-1 and PD-L1 Blockade, **Cancer J**, v. 24, n. 1, p. 47–53, 2018.

OHTA, M. et al. Immunomodulation of monocyte-derived dendritic cells through ligation of tumor-produced mucins to Siglec-9. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 402, n. 4, p. 663–669, 2010.

OLIVEIRA, C. et al. Familial gastric cancer: Genetic susceptibility, pathology, and implications for management. **The Lancet Oncology**, v. 16, n. 2, p. e60–e70, 2015.

PAN, R. et al. Cancer incidence and mortality: A cohort study in China, 2008–2013. **International Journal of Cancer**, v. 141, n. 7, p. 1315–1323, 2017.

PARK, S. et al. Altered expression of fucosylation pathway genes is associated with poor prognosis and tumor metastasis in non - small cell lung cancer, **Int J Oncol**, p. 559–567, 2020.

PEARCE, O. M. T.; LÄUBLI, H. Sialic acids in cancer biology and immunity. **Glycobiology**, v. 26, n. 2, p. 111–128, 2015.

PICCOLI, M. et al. NEU3 sialidase role in activating HIF-1 α in response to chronic hypoxia

in cyanotic congenital heart patients. **International Journal of Cardiology**, v. 230, p. 6–13, 2017.

PINHO, S. S. et al. Gastric cancer: Adding glycosylation to the equation. **Trends in Molecular Medicine**, v. 19, n. 11, p. 664–676, 2013.

PINHO, S. S.; REIS, C. A. Glycosylation in cancer: Mechanisms and clinical implications. **Nature Reviews Cancer**, v. 15, n. 9, p. 540–555, 2015.

PLUMMER, M. et al. Global burden of gastric cancer attributable to pylori. **International Journal of Cancer**, v. 136, n. 2, p. 487–490, 2015.

PRA, D. et al. A possible link between iron deficiency and gastrointestinal carcinogenesis. **Nutrition and Cancer**, v. 61, n. 4, p. 415–426, 2009.

PRIYADHARSHINI, M. et al. Pathobiological Characteristics of Intestinal and Diffuse-Type of Gastric Carcinoma-Retrospective Study of Gastric Cancers. **International Journal of Medical and Dental Sciences**, v. 6, n. 2, p. 1462, 2017.

QI, F. et al. ST3GAL3, ST3GAL4, and ST3GAL6 differ in their regulation of biological functions via the specificities for the α 2,3-sialylation of target proteins. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 34, n. 1, p. 881–897, 2020.

REIS, C. A. et al. Alterations in glycosylation as biomarkers for cancer detection. **Journal of Clinical Pathology**, v. 63, n. 4, p. 322–329, 2010.

REN, X. Immunosuppressive checkpoint Siglec-15: a vital new piece of the cancer immunotherapy jigsaw puzzle. **Cancer Biology and Medicine**, v. 16, n. 2, p. 205–210, 2019.

RIQUELME, I. et al. Molecular classification of gastric cancer: Towards a pathwaydriven targeted therapy. **Oncotarget**, v. 6, n. 28, p. 24750–24779, 2015.

ROESCH-DIETLEN, F. et al. Frequency of human papillomavirus infection in patients with gastrointestinal cancer. **Revista de Gastroenterología de México**, v. 83, n. 3, p. 253–258, 2018a.

ROESCH-DIETLEN, F. et al. Frequency of human papillomavirus infection in patients with gastrointestinal cancer. **Revista de Gastroenterología de México (English Edition)**, v. 83, n. 3, p. 253–258, 2018b.

RWEI, A. Y.; WANG, W.; KOHANE, D. S. Photoresponsive nanoparticles for drug delivery. **Nano Today**, v. 10, n. 4, p. 451–467, 2015.

SAWAKI, K. et al. Troponin I2 as a Specific Biomarker for Prediction of Peritoneal Metastasis in Gastric Cancer. **Annals of Surgical Oncology**, v. 25, n. 7, p. 2083–2090, 2018.

SHANG, S. et al. Aided diagnosis of hepatocellular carcinoma using serum fucosylated haptoglobin ratios. **Journal of Cancer**, v. 8, n. 5, p. 887–893, 2017.

SHARMA, K. L. et al. Gastrointestinal Cancers : Molecular Genetics and Biomarkers. **Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 2018, 2018.

SHELBY D. MELTON, ROBERT M. GENTA, AND R. F. S. Biomarkers and Molecular Diagnostic Tests in Gastrointestinal Tract and Pancreatic Neoplasms. **Gastroenterology & hepatology**, v. 7, n. 11, p. 620–628, 2011.

SHEN, J. miR-490-3p Functions as a Tumor Suppressor in Gastric Cancer. **ProQuest Dissertations and Theses**, p. 158, 2013.

SOBKOWICZ, A. D. et al. Modulation of expression in BEAS-2B airway epithelial cells of α -1-fucosidase A1 and A2 by Th1 and Th2 cytokines, and overexpression of α -1-fucosidase 2. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 390, n. 1–2, p. 101–113, 2014.

SULZENBACHER, G. et al. Crystal structure of *Thermotoga maritima* α -L-fucosidase: Insights into the catalytic mechanism and the molecular basis for fucosidosis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 13, p. 13119–13128, 2004.

SUN, B. et al. Chemotherapy agent-unsaturated fatty acid prodrugs and prodrug-nanoplatfroms for cancer chemotherapy. **Journal of Controlled Release**, v. 264, p. 145–159, 2017.

SUN, Y. et al. Oncogenic potential of TSTA3 in breast cancer and its regulation by the tumor suppressors miR-125a-5p and miR-125b. **Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine**, v. 37, 4 nov. 2015.

SUN, Y. et al. Oncogenic potential of TSTA3 in breast cancer and its regulation by the tumor suppressors miR-125a-5p and miR-125b. **Tumor Biology**, v. 37, n. 4, p. 4963–4972, 2016.

SUZUKI, H.; IWASAKI, E.; HIBI, T. Helicobacter pylori and gastric cancer. **Gastric Cancer**, v. 12, n. 2, p. 79–87, 2009.

TAKAHASHI, K. et al. Sialidase NEU3 contributes neoplastic potential on colon cancer cells as a key modulator of gangliosides by regulating Wnt signaling. **International Journal of Cancer**, v. 137, n. 7, p. 1560–1573, 2015.

TAKAMIYA, R. et al. The interaction between Siglec-15 and tumor-associated sialyl-Tn antigen enhances TGF- β secretion from monocytes/macrophages through the DAP12-Syk pathway. **Glycobiology**, v. 23, n. 2, p. 178–187, 2013.

TANICHI, N.; KOREKANE, H. Branched N-glycans and their implications for cell adhesion, signaling and clinical applications for cancer biomarkers and in therapeutics. **BMB Reports**, v. 44, n. 12, p. 772–781, 2011.

THAPA, S. et al. Significance of aquaporins' expression in the prognosis of gastric cancer. **Bioscience Reports**, v. 38, n. 3, p. 1–14, 2018.

TOGAYACHI, A. et al. Glycobiomarker, Fucosylated Short-Form Secretogranin III Levels Are Increased in Serum of Patients with Small Cell Lung Carcinoma. **Journal of Proteome Research**, v. 16, n. 12, p. 4495–4505, 2017.

TONETTI, M. et al. Synthesis of GDP-L-fucose by the human FX protein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 44, p. 27274–27279, 1996.

TSUDA, M. et al. Effect on Helicobacter pylori eradication therapy against gastric cancer in Japan. **Helicobacter**, v. 22, n. 5, p. 1–6, 2017.

UOTANI, T.; GRAHAM, D. Y. Diagnosis of Helicobacter pylori using the rapid urease test. **Annals of Translational Medicine**, v. 3, n. 1, p. 1–7, 2015.

USLUPEHLIVAN, M.; ŞENER, E.; İZZETOĞLU, S. Computational analysis of the structure, glycosylation and CMP binding of human ST3GAL sialyltransferases. **Carbohydrate Research**, v. 486, n. April, 2019.

VARKI, A. Letter to the Glyco-Forum: Since there are PAMPs and DAMPs, there must be SAMPs? Glycan “self-associated molecular patterns” dampen innate immunity, but pathogens can mimic them. **Glycobiology**, v. 21, n. 9, p. 1121–1124, 2011.

VARKI, A. Biological roles of glycans. **Glycobiology**, v. 27, n. 1, p. 3–49, 2017.

VIANNA, J. S.; ALMEIDA DA SILVA, P. E.; BASTOS RAMIS, I. Genes de patogenicidade de Helicobacter pylori, polimorfismos de citocinas e fatores ambientais afetam o desenvolvimento de doenças gástricas: uma visão geral. **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção**, v. 6, n. 4, 2016.

VILLAR-PORTELA, S. et al. FX enzyme and GDP-L-Fuc transporter expression in colorectal cancer. **Histopathology**, v. 63, n. 2, p. 174–186, 2013.

WADA, T. et al. A crucial role of plasma membrane-associated sialidase in the survival of human cancer cells. **Oncogene**, v. 26, n. 17, p. 2483–2490, 2007.

WAIDELY, E. et al. Alpha-1 -Fucosidase Immunoassay for Early Detection of Hepatocellular Carcinoma. **Analytical Chemistry**, v. 89, n. 17, p. 9459–9466, 2017.

WANG, H. et al. HHS Public Protein glycosylation in cancer. **Annu Rev Pathol**, v. 2, n. 2, p. 473–510, 2015.

WANG, J. et al. Sialidase occurs in both membranes of the nuclear envelope and hydrolyzes endogenous GD1a. **Journal of Neurochemistry**, v. 111, n. 2, p. 547–554, 2009.

WANG, J. et al. Siglec-15 as an immune suppressor and potential target for normalization cancer immunotherapy. **Nature Medicine**, v. 25, n. 4, p. 656–666, 2019.

WANG, W. et al. A Genetic Variant Located in miR-146b promoter region is associated with prognosis of gastric cancer. **Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention**, v. 27, n. 7, p. 822–828, 2018.

WU, C. et al. Immunohistochemical localization of programmed death-1 ligand-1 (PD-L1) in gastric carcinoma and its clinical significance. **Acta Histochemica**, v. 108, n. 1, p. 19–24, 2006.

XIE, J. et al. Nanotechnology for the delivery of phytochemicals in cancer therapy. **Biotechnology Advances**, v. 34, n. 4, p. 343–353, 2016.

XU, Y. et al. Overexpression of BCAT1 is a prognostic marker in gastric cancer. **Human Pathology**, v. 75, p. 41–46, 2018.

YAMANOI, K.; NAKAYAMA, J. Reduced α GlcNAc glycosylation on gastric gland mucin is a biomarker of malignant potential for gastric cancer, Barrett's adenocarcinoma, and pancreatic cancer. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 149, n. 6, p. 569–575, 2018.

YANG, J. et al. High TSTA3 expression as a candidate biomarker for poor prognosis of patients with ESCC. **Technology in Cancer Research and Treatment**, v. 17, p. 1–9, 2018.

YAZAWA, S. et al. A new enzyme immunoassay for the determination of highly sialylated and fucosylated human α 1-acid glycoprotein as a biomarker of tumorigenesis. **Clinica Chimica Acta**, v. 478, n. November 2017, p. 120–128, 2018.

YOCCOZ, N. G.; NICHOLS, J. D.; BOULINIER, T. Monitoring of biological diversity – a response to Danielsen et al. **Oryx**, v. 37, n. 04, p. 2003, 2003.

YOU, J.; LIN, S.; JIANG, T. Origins and Evolution of the α -L-Fucosidases: From Bacteria to Metazoans. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. August, p. 1–9, 2019.

YUAN, K. et al. Cell surface associated alpha-L-fucose moieties modulate human breast cancer neoplastic progression. **Pathology and Oncology Research**, v. 14, n. 2, p. 145–156, 2008.

YUAN, W.; YANG, N.; LI, X. Advances in Understanding How Heavy Metal Pollution Triggers Gastric Cancer. **BioMed Research International**, v. 2016, 2016.

ZHANG, X. et al. ST3Gal3 confers paclitaxel-mediated chemoresistance in ovarian cancer cells by attenuating caspase-8/3 signaling. **Molecular Medicine Reports**, v. 20, n. 5, p. 4499–4506, 2019.

ZHANG, Z.; WUHRER, M.; HOLST, S. Serum sialylation changes in cancer. **Glycoconjugate Journal**, v. 35, n. 2, p. 139–160, 2018.

ZHENG, H. C. et al. Mixed-type gastric carcinomas exhibit more aggressive features and indicate the histogenesis of carcinomas. **Virchows Archiv**, v. 452, n. 5, p. 525–534, 2008.

ZHOU, B. et al. Plasma proteomics-based identification of novel biomarkers in early gastric cancer. **Clinical Biochemistry**, 2019.

