



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE BIOCÊNCIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

MARIA DE FÁTIMA DEODATO DE SOUZA

**GALECTINAS -1, -4 E -9 EM PACIENTES COM ADENOCARCINOMA  
GÁSTRICO: ASSOCIAÇÕES CLÍNICAS E PARÂMETROS DE ACURÁCIA**

Recife

2022

MARIA DE FÁTIMA DEODATO DE SOUZA

**GALECTINAS -1, -4 E -9 EM PACIENTES COM ADENOCARCINOMA GÁSTRICO:  
ASSOCIAÇÕES CLÍNICAS E PARÂMETROS DE ACURÁCIA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Inovação Terapêutica.

**Área de Concentração:** Concentração de Fármacos, Medicamentos e Insumos Essenciais para a Saúde.

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

Co-orientadoras: Profa. Dra. Michelly Cristiny Pereira

Profa. Dra. Luiza Rayanna Amorim de Lima

Recife

2022

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD**

Souza, Maria de Fátima Deodato de  
Galectinas - 1,-4 e -9 em pacientes com adenocarcinoma gástrico: associações clínicas e parâmetros de acurácia / Maria de Fátima Deodato de Souza - 2022.

103 f. : il., fig., tab.

Orientador: Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo.  
Coorientadoras: Michelly Cristiny Pereira e Luiza Rayanna Amorim de Lima.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, Recife, 2022.

Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Adenocarcinoma 2. Teste imunoenzimático 3. Biomarcadores em doenças I. Rêgo, Moacyr Jesus Barreto de Melo (orient.) II. Pereira, Michelly Cristiny (coorient.) III. Lima, Rayanna Amorim de IV. Título

616.99

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2023 -044

MARIA DE FÁTIMA DEODATO DE SOUZA

**GALECTINAS -1, -4 E -9 EM PACIENTES COM ADENOCARCINOMA GÁSTRICO:  
ASSOCIAÇÕES CLÍNICAS E PARÂMETROS DE ACURÁCIA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Inovação Terapêutica.

Aprovada em: 15 / 06 / 2022

**COMISSÃO EXAMINADORA**

---

Prof<sup>o</sup>. Dr. Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo (Orientador)  
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Michelle Melgarejo da Rosa (Examinadora Externa ao Programa)  
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

---

Prof<sup>o</sup>. Dr. Cristiano Aparecido Chagas (Examinador Externo ao Programa)  
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marina Ferraz Cordeiro (Examinadora Externa à Instituição)  
Universidade Federal do Vale do São Francisco - UNIVASF

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marianne de Vasconcelos Carvalho (Examinadora Externa à Instituição)  
Universidade de Pernambuco, *campus* Arcoverde - UPE

Dedico aos pacientes que de modo voluntário  
oportunizaram este estudo.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, pelo dom da vida, pela saúde e sabedoria. O Senhor é o meu refúgio e minha fortaleza!

Aos meus pais, José e Josiane pelo amor incondicional, apoio e incentivo recebidos constantemente. Agradeço pelos bons exemplos, pelas orientações e encorajamento para enfrentar os momentos difíceis. Vocês foram de fundamental importância ao longo dessa jornada. O amor de vocês me inspira a nunca desistir. Eu amo vocês!

Aos meus irmãos, Vanessa e Victor, por nossa união e por todo apoio.

Aos meus sobrinhos, Lucas e Liz, por serem meu refúgio de amor e felicidade. Espero ser para vocês, a prova de que tudo é possível quando portamos fé e determinação.

Agradeço aos meus avós, por todo amor e incentivo. Lembro-me com muito afeto do meu vovô Vicente e do meu vô Severino (*in memoriam*), tenho certeza que onde vocês estiverem, estarão muito felizes com essa conquista. Minha eterna saudade! Aos meus tios (as) e primos (as) estendo os agradecimentos pelos laços fortes. Sou grata por tudo!

À Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), ao Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica (PPGIT), aos docentes e coordenadores pelo suporte de excelência para obtenção desse título.

Ao secretário do PPGIT, Paulo, pela atenção e pronto atendimento sempre que solicitado.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Moacyr Barreto, pela oportunidade de viver tamanha experiência, por todo conhecimento compartilhado de forma admirável durante esta trajetória. Muito obrigada!

Aos professores e coorientadores Antônio Félix, Michelly Cristiny e Luiza Rayane pelas contribuições acerca do trabalho, pela disponibilidade e por toda dedicação.

À professora Maira Pitta, pela oportunidade em fazer parte do grupo de pesquisa.

Gratidão aos pacientes por oportunizarem este estudo, e pelos ensinamentos que transcendem a vida científica e acadêmica.

Aos médicos Dr. Mário Rino, Dr. Luiz Mattos e Dr. Guido Araújo pela colaboração.

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE), pelo fomento.

Agradeço aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade e pelas contribuições de excelência acerca do trabalho.

Aos integrantes do NUPIT-SG gostaria de externar minha satisfação em tê-los como colegas de trabalho. Não poderia deixar de mencionar, Antônio, Michael, Anderson, Lucas, Clara, Raquel, André, Lilia, Eduardo, Eudes, Kalebe, Vanessa, Priscilla, Amanda, Val, cuja convivência permitiu que nos tornássemos amigos. Todos os momentos compartilhados com vocês serão lembrados com muito afago.

Por fim, agradeço aos demais amigos, obrigada pelo apoio demonstrado durante todo o período em que me dediquei a este trabalho.

Muito obrigada a todos!

“A persistência é o caminho do êxito”. CHARLES CHAPLIN

## RESUMO

O câncer gástrico (CG) é uma das malignidades mais comuns do trato gastrointestinal, com sobrevida desfavorável nos estágios mais avançados. Na prática clínica, os marcadores tumorais séricos utilizados não apresentam parâmetros de acurácia suficientes para serem totalmente confiáveis. As galectinas são proteínas com afinidade aos  $\beta$ -galactosídeos que desempenham papéis importantes no processo carcinogênico. Por conseguinte, emergem como moléculas promissoras para novos marcadores biológicos. A partir dessa premissa, o presente estudo objetivou quantificar os níveis circulantes de galectina-1, galectina-4 e galectina-9 para distinguir pacientes com câncer gástrico de indivíduos saudáveis, e avaliar sua possível associação aos parâmetros clínico-patológicos. Os pacientes foram recrutados do serviço de oncologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) e da Sociedade Pernambucana de Combate ao Câncer (SPCC). Um total de 69 pacientes com diagnóstico de adenocarcinoma gástrico e 67 indivíduos saudáveis foram incluídos no estudo. Os níveis circulantes dessas galectinas foram determinados por ELISA, e os dados da expressão do mRNA dos genes LGALS1 e LGALS9 foram extraídos da plataforma cBioPortal for Cancer Genomics. A expressão tecidual de galectina-4 foi avaliada por imuno-histoquímica. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste de Mann-Whitney, Kruskal-Wallis, Pearson e teste exato de Fisher;  $p < 0,05$  foi considerado significativo. As características operacionais do receptor (ROC), sensibilidade, especificidade e razão de verossimilhança (LR) foram avaliadas utilizando o software GraphPad Prisma. Os níveis circulantes de galectina-1, -4 e -9 foram maiores nos pacientes com adenocarcinoma gástrico comparado aos indivíduos saudáveis. O ponto de corte dos níveis circulantes de galectina-1 para distinguir pacientes com adenocarcinoma gástrico de indivíduos saudáveis foi de 22935 pg/ml (sensibilidade 61,90%, especificidade 96,08%, LR: 15,79) (AUC: 0,9153,  $p < 0,0001$ ). Os níveis circulantes de galectina-1 foram associados a invasão angiolinfática ( $p = 0,0496$ ). Já o ponto de corte de galectina-4 para distinguir pacientes dos indivíduos saudáveis foi de 572,3 pg/ml (sensibilidade 98,55%, especificidade 84,62%, LR: 6,406) (AUC: 0,9632,  $p < 0,0001$ ). Adicionalmente, as análises por imuno-histoquímica revelaram que 19 (76%) das amostras foram positivas e 6 (24%) negativas para galectina-4. A imunomarcagem foi frequentemente observada em células do microambiente tumoral. O ponto de corte de galectina-9 para distinguir os grupos avaliados foi de 5517 pg/ml (sensibilidade 80,60%, especificidade 97,01%, LR: 27,00) (AUC: 0,9414,  $p < 0,0001$ ). Os níveis circulantes de galectina-9 foram associados ao sexo ( $p = 0,0033$ ), idade ( $p = 0,0158$ ), grau histológico ( $p = 0,0013$ ) e a estratégia cirúrgica ( $p = 0,0497$ ). Além disso, os

níveis de Gal-9 apresentaram uma correlação moderada com o número absoluto de neutrófilos desses pacientes ( $r = 0,4228$ ;  $p = 0,0053$ ). De maneira inédita, nossos dados apresentam parâmetros de acurácia capazes de distinguir pacientes com adenocarcinoma gástrico de indivíduos saudáveis. Dessa forma, essas moléculas surgem como potenciais marcadores biológicos.

Palavras-chave: Câncer gástrico; ELISA; Acurácia; Biomarcador.

## ABSTRACT

Gastric cancer (GC) is one of the most common malignancies of the gastrointestinal tract, with poor survival in more advanced stages. In clinical practice, the serum tumor markers used do not have enough accuracy parameters to be completely reliable. Galectins are proteins with affinity for  $\beta$ -galactosides that play important roles in the carcinogenic process. Therefore, they emerge as promising molecules for new biological markers. Based on this premise, the present study aimed to quantify the circulating levels of galectin-1, galectin-4 and galectin-9 to distinguish patients with gastric cancer from healthy individuals, and to assess their possible association with clinicopathological parameters. Patients were recruited from the oncology service of the Clínical Hospital of the Federal University of Pernambuco (UFPE) and from the Pernambuco Society for the Fight against Cancer (SPCC). A total of 69 patients diagnosed with gastric adenocarcinoma and 67 healthy subjects were included in the study. Circulating levels of these galectins were determined by ELISA, and mRNA expression data from the LGALS1 and LGALS9 genes were extracted from the cBioPortal for Cancer Genomics platform. Tissue expression of galectin-4 was evaluated by immunohistochemistry. Statistical analyzes were performed using the Mann-Whitney, Kruskal-Wallis, Pearson and Fisher's exact tests;  $p < 0.05$  was considered significant. Receptor operating characteristics (ROC), sensitivity, specificity, and likelihood ratio (LR) were evaluated using GraphPad Prisma software. Circulating levels of galectin-1, -4 and -9 were higher in patients with gastric adenocarcinoma compared to healthy subjects. The cutoff of circulating galectin-1 levels to distinguish patients with gastric adenocarcinoma from healthy subjects was 22935 pg/ml (sensitivity 61.90%, specificity 96.08%, LR: 15.79) (AUC: 0.9153,  $p < 0.0001$ ). Circulating levels of galectin-1 were associated with angiolymphatic invasion ( $p = 0.0496$ ). The galectin-4 cutoff point to distinguish patients from healthy individuals was 572.3 pg/ml (sensitivity 98.55%, specificity 84.62%, LR: 6.406) (AUC: 0.9632,  $p < 0.0001$ ). Additionally, immunohistochemical analysis revealed that 19 (76%) of the samples were positive and 6 (24%) negative for galectin-4. Immunolabeling was frequently observed in cells from the tumor microenvironment. The galectin-9 cut-off point to distinguish the groups evaluated was 5517 pg/ml (sensitivity 80.60%, specificity 97.01%, LR: 27.00) (AUC: 0.9414,  $p < 0.0001$ ). Circulating levels of galectin-9 were associated with sex ( $p = 0.0033$ ), age ( $p = 0.0158$ ), histological grade ( $p = 0.0013$ ) and surgical strategy ( $p = 0.0497$ ). In addition, Gal-9 levels showed a moderate correlation with the absolute number of neutrophils in these patients ( $r = 0.4228$ ;  $p = 0.0053$ ). In an unprecedented way, our data present parameters

of accuracy capable of distinguishing patients with gastric adenocarcinoma from healthy individuals. Thus, these molecules emerge as potential biological markers.

**Keywords:** Gastric cancer; ELISA; Accuracy; Biomarker.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### TESE

Figura 1 –	Distribuição por sexo dos dez tipos de câncer mais incidentes, exceto os casos de câncer de pele não melanoma, estimados para o triênio 2020-2022 no Brasil segundo o INCA.	25
Figura 2 –	Fatores relacionados ao risco do desenvolvimento do câncer gástrico.	26
Quadro 1 –	Classificação <sup>a</sup> da World Health Organization (WHO) para tumores gástricos. <sup>a</sup> Códigos morfológicos da Classificação Internacional de Doenças Oncológicas (ICD-O) {904A}. O comportamento tumoral é codificado como /0 para tumores benignos, /1 para comportamento não especificado, limítrofe ou incerto, /2 para carcinoma <i>in situ</i> e neoplasia intraepitelial grau III, e /3 para tumores malignos. <sup>b</sup> A classificação é adaptada a partir da classificação histológica anterior para tumores da WHO (691). Para as neoplasias neuroendócrinas, a classificação foi simplificada para ser mais útil na classificação morfológica; * Códigos aprovados pelo Comitê da IARC/OMS para o ICR-O em março de 2010.	28
Figura 3 –	Fluxograma do tratamento para o câncer gástrico. Receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2); Cisplatina e 5-fluorouracil (CF); Cisplatina e Capecitabina (CX).	33
Figura 4 –	Classificação estrutural das galectinas.	37
Figura 5 –	Galectinas na carcinogênese e progressão tumoral. Essas proteínas podem atuar de modo pró e/ou antitumorigênica, regulando diversos processos que incluem a apoptose, adesão migração, transformação celular (EMT), invasão e metástase, escape imune e angiogênese.	38
Figura 6 –	Representação estrutural da galectina-1 em sua forma homodimérica, mantida por interações não covalentes envolvendo os terminais N e C de suas subunidades.	39
Figura 7 –	Representação estrutural da galectina-4.	41

Figura 8 –	Representação estrutural da galectina-9. N-Domínio de galectina-9 humana em complexo com carboidrato.	42
Gráfico 1 –	Curvas ROC exemplificando diferentes classificadores.	49

#### ARTIGO 1 – CIRCULATING LEVELS OF GALECTIN-1 AND GALECTIN-9 AS A POTENTIAL BIOMARKERS FOR GASTRIC ADENOCARCINOMA

Figure 1 –	Concentrations of circulating Galectina-1 (Gal-1) in samples from control group and patients with gastric cancer (GC). **** indicates $p < 0.0001$ . Line at blue: median with interquartile range (A), and concentrations of circulating Galectin-9 (Gal-9) in samples from control group and patients with gastric cancer (GC). **** indicates $p < 0.0001$ . Line at blue: median with interquartile range (B).	57
Figure 2 –	Correlation between circulating levels of Galectin-9 (Gal-9) and absolute neutrophils in patients with gastric cancer (GC).	61
Figure 3 –	Receiver operating characteristic (ROC) curve demonstrating the sensitivity and specificity of circulating levels of Gal-1 to discriminate patients with gastric cancer (GC) from control group (A). Receiver operating characteristic (ROC) curve demonstrating the sensitivity and specificity of circulating levels of Gal-9 to discriminate patients with gastric cancer (GC) from control group (B). AUC: area under the curve. CI: confidence interval.	62
Supplementary Figure 1 –	There was no significant difference between the medians of Gal-1 in serum (yellow) and plasma (green) samples from patients with GC (A). There was no significant difference between the medians of Gal-9 in serum (yellow) and plasma (green) samples from patients with GC (B). Control = healthy subjects, GC = gastric cancer.	70

#### ARTIGO 2 – EVALUATION OF GALECTIN-4 CIRCULATION LEVELS IN PATIENTS WITH GASTRIC ADENOCARCINOMA

Figure 1 –	Comparison of the circulating Gal-4 levels between patients with gastric cancer (GC) and control group. **** indicates $p < 0.0001$ (A),	78
------------	--	----

Receiver operating characteristic (ROC) curve for Gal- 4 validity for distinguishing GC (B), Photomicrograph evidencing Galectin-4 immunostaining in well-differentiated gastric adenocarcinoma tissue (C), Galectin-4 immunostaining in tumor cells invading adipose tissue (D), and Galectin-4 immunostaining in poorly differentiated gastric adenocarcinoma tissue (E). Scale bar: 100/50  $\mu\text{m}$ .

## LISTA DE TABELAS

### TESE

Tabela 1 –	Medidas de acurácia dos marcadores tumorais séricos frequentemente utilizados na clínica para o diagnóstico do CG.	32
------------	--	----

### ARTIGO 1 – CIRCULATING LEVELS OF GALECTIN-1 AND GALECTIN-9 AS A POTENTIAL BIOMARKERS FOR GASTRIC ADENOCARCINOMA

Table 1 –	Clinical-demographic characteristics of the GC patients.	56
Table 2 –	Associations and correlations between circulating levels of Galectin-9 (Gal-9) and clinical-pathological parameters in 67 patients with gastric cancer (GC).	58
Supplementary Table 1 –	Associations and correlations between circulating levels of Galectin-1 (Gal-1) and clinical-pathological parameters in 67 patients with gastric cancer (GC).	71
Supplementary Table 2 –	Correlations between circulating levels of Galectin-1 (Gal-1) and hematological parameters in patients with gastric cancer (GC).	72
Supplementary Table 3 –	Correlations between serum and plasma Gal-9 levels and hematological parameters in the GC.	73
Supplementary Table 4 –	Association between the expression value of (LGALS1) mRNA with the main clinical-pathological characteristics of patients with gastric cancer (GC).	74
Supplementary Table 5 –	Association between the expression value of (LGALS9) mRNA with the main clinical-pathological characteristics of patients with gastric cancer (GC).	75

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFP	- $\alpha$ -fetoproteína
APC	- Do inglês, <i>Adenomatous Polyposis Coli gene</i>
AUC	- Do inglês, <i>Area Under the Curve</i>
B7-H1	- Do inglês, <i>B7 homolog 1</i>
CAAE	- Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
CA19-9	- Antígeno Carboidrato 19-9
CA72-4	- Antígeno Carboidrato 72-4
CA125	- Antígeno Carboidrato 125
CA24-2	- Antígeno Carboidrato 24-2
CA50	- Antígeno Carboidrato 50
CDH1	- Do inglês, <i>Cadherin 1 gene</i>
CD44	- Do inglês, <i>Cluster of Differentiation 44</i>
CD137	- Do inglês, <i>Cluster of Differentiation 137</i>
CEA	- Antígeno Carcinoembrionário
CG	- Câncer Gástrico
CGS	- Cânceres Gástricos
CRD	- Do inglês, <i>Carbohydrate Recognition Domain</i>
CTLA-4	- Do inglês, <i>Cytotoxic T-lymphocyte Antigen 4</i>
CF	- Cisplatina e 5-fluorouracil
CX	- Cisplatina e Capecitabina
CD3	- Do inglês, <i>Cluster of Differentiation 3</i>
EBV	- Vírus Epstein-Barr
EMT	- Do inglês, <i>Epithelial-Mesenchymal Transition</i>
ROS	- Do inglês, <i>Espécies Reativas do Oxigênio</i>
GAL-1	- Galectina-1
GAL-4	- Galectina-4
GAL-9	- Galectina-9
GALs	- Galectinas
GSTMI	- Do inglês, <i>Glutathione S-Transferase Mu 1</i>
HC	- Hospital das Clínicas
HER2	- Do inglês, <i>Human Epidermal growth factor Receptor-type 2</i>

H-ras	- Do inglês, <i>HRas Proto-Oncogene, GTPase</i>
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 2N	- Ácido Sulfúrico
IgE	- Imunoglobulina E
INCA	- Instituto Nacional de Câncer
IL-17	- Interleucina 17
IL-10	- Interleucina 10
LRs	- Razões de Verossimilhanças
LR+	- Razão de Verossimilhança Positiva
LR-	- Razão de Verossimilhança Negativa
MSI	- Do inglês, <i>Microsatellite Instability</i>
MUC1	- Do inglês, <i>Mucin 1, Cell Surface Associated</i>
NEC	- Do inglês, <i>Neuroendocrine Carcinoma</i>
NET	- Do inglês, <i>Neuroendocrine Tumour</i>
NHS	- Do inglês, <i>Healthy Normal Subjects</i>
PAF	- Polipose Adenomatosa Familiar
PBS	- Tampão Fosfato-salino
PBS-BSA	- Tampão Fosfato Salino - Albumina
PD-1	- Do inglês, <i>Programmed Cell Death 1</i>
PDL1	- Do inglês, <i>Programmed Death-Ligand 1</i>
ROC	- Do inglês, <i>Receiver-Operating Characteristic</i>
SPCC	- Sociedade Pernambucana de Combate ao Câncer
TCGA	- Do ingles, <i>The Cancer Genome Atlas Research Network</i>
TCLE	- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TGI	- Trato Gastrointestinal
TIM-3	- Do inglês, <i>T-cell Immunoglobulin and Mucin Domain-3</i>
TMB	- Tetrametilbenzidina
VEGFs	- Do inglês, <i>Vascular Endothelial Growth Factors</i>
UFPE	- Universidade Federal de Pernambuco
WHO	- Do ingles, <i>World Health Organization</i>

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>19</b>
1.1	OBJETIVOS	22
1.1.1	<b>Objetivo Geral</b>	<b>22</b>
1.1.2	<b>Objetivos Específicos</b>	<b>22</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b>	<b>23</b>
2.1	ASPECTOS GERAIS - CÂNCER	23
2.2	CÂNCER GÁSTRICO	24
2.2.1	<b>Epidemiologia</b>	<b>24</b>
2.2.2	<b>Aspectos clínicos e histopatológicos</b>	<b>27</b>
2.2.3	<b>Diagnóstico</b>	<b>31</b>
2.2.4	<b>Tratamento</b>	<b>33</b>
2.3	GALECTINAS	36
2.3.1	<b>Galectina-1</b>	<b>38</b>
2.3.2	<b>Galectina-4</b>	<b>40</b>
2.3.3	<b>Galectina-9</b>	<b>42</b>
<b>3</b>	<b>PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS</b>	<b>45</b>
3.1	POPULAÇÃO DE ESTUDO	45
3.2	BLOCOS DE PARAFINA	45
3.3	DOSAGEM DAS GALECTINAS	46
3.4	IMUNO-HISTOQUÍMICA	46
3.5	ANÁLISE DE IMAGENS	47
3.6	ACURÁCIA DIAGNÓSTICA	47
3.7	ANÁLISE IN SILICO	49
3.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	50
<b>4</b>	<b>ARTIGO 1 – CIRCULATING LEVELS OF GALECTIN-1 AND GALECTIN-9 AS A POTENTIAL BIOMARKERS FOR GASTRIC ADENOCARCINOMA</b>	<b>51</b>
<b>5</b>	<b>ARTIGO 2 – EVALUATION OF GALECTIN-4 CIRCULATION LEVELS IN PATIENTS WITH GASTRIC ADENOCARCINOMA</b>	<b>76</b>
<b>6</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>81</b>

	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>82</b>
<b>APÊNDICE A -</b>	<b>QUESTIONÁRIO DE PESQUISA</b>	<b>95</b>
<b>APÊNDICE B -</b>	<b>TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE/HC)</b>	<b>97</b>
<b>APÊNDICE C -</b>	<b>TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE/SPCC)</b>	<b>100</b>
<b>ANEXO A -</b>	<b>PARECER HC/UFPE</b>	<b>102</b>
<b>ANEXO B -</b>	<b>PARECER SPCC</b>	<b>103</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O câncer gástrico é uma malignidade heterogênea, cuja a carcinogênese está atribuída a um processo multifatorial (PETRYSZYN; CHAPELLE; MATYSIAK-BUDNIK, 2020). A cada ano, mais de um milhão de casos são diagnosticados em todo o mundo, estabelecendo a doença como o quinto câncer mais diagnosticado e o sétimo mais prevalente (RAWLA; BARSOUK, 2019). No Brasil, estimou-se para cada ano do triênio 2020-2022 cerca de 21.230 novos casos entre homens e mulheres. Na região Nordeste, o CG é o terceiro câncer mais frequente em homens (10,63/100 mil), e o sexto mais frequente entre as mulheres (7,03/100 mil), excluindo os tumores de pele não melanoma. Para o estado de Pernambuco, estimou-se cerca de 830 novos casos para 2020 (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2020).

A taxa de sobrevida dos pacientes está intimamente relacionada ao estágio da doença no momento do diagnóstico. Pacientes com CG precoce não apresentam sintomas específicos; dessa forma, o diagnóstico clínico geralmente ocorre em estágio intermediário ou avançado, o que retarda a conduta terapêutica e leva a um prognóstico desfavorável (CHEN et al., 2017a; LIU; XIAO, 2014). Apesar do progresso nas últimas décadas no diagnóstico e terapia do CG, a taxa de sobrevida global ainda permanece baixa, principalmente nas doenças avançadas (YOU et al., 2019). Portanto, detectar marcadores biológicos que apresentem um potencial promissor para detectar a doença em estágios iniciais pode auxiliar no direcionamento da conduta terapêutica ideal e ágil, sendo capaz de melhorar o prognóstico do câncer (YE et al., 2020).

Atualmente, os marcadores tumorais séricos utilizados na prática clínica para o auxílio no diagnóstico da doença e principalmente para o segmento clínico consistem no antígeno carcinoembrionário (CEA), os antígenos de carboidratos CA19-9, CA72-4, CA125, CA24-2, CA50 e também pepsinogênio e  $\alpha$ -fetoproteína (AFP). Todavia, carecem de especificidade e sensibilidade, e nenhum deles é exclusivo para a detecção do CG (NECULA et al., 2019; ZHOU et al., 2020). Partindo-se dessa premissa, se faz necessário rastrear novos biomarcadores, com melhores parâmetros de acurácia. Nesse contexto, surgem as galectinas.

As galectinas são proteínas da família das lectinas, com capacidade de ligação a carboidratos, que apresentam afinidade especificamente aos  $\beta$ -galactosídeos (HOKAMA;

MIZOGUCHI; MIZOGUCHI, 2008; MODENUTTI et al., 2019). Atualmente, 15 membros dessa família são reconhecidos em mamíferos, 11 das quais são encontradas em humanos (CHAN et al., 2018; CHOU et al., 2018; RAPOPORT; BOVIN, 2015).

Evidências crescentes demonstram que as galectinas contribuem para muitas características do câncer, incluindo a sinalização, proliferação, resistência aos sinais de morte celular, evasão da vigilância imune, indução da angiogênese e ativação da metástase (THIJSEN et al., 2015). No entanto, os dados sobre os perfis de expressão das galectinas no CG ainda são insipientes. Dessa forma, o estudo desses aspectos representa uma importante ferramenta que poderá identificar novos marcadores biológicos/ou alvos terapêuticos.

A galectina-1 (Gal-1) é uma proteína do tipo protótipo, composta por um único domínio de reconhecimento de carboidratos (CRD), que se conecta a outros monômeros para formar redes de galectinas multiméricas (BATZKE et al., 2018). Esta molécula é expressa em vários tipos de tecidos em condições normais e patológicas (ASTORGUES-XERRI et al., 2014; JOHANNES; JACOB; LEFFLER, 2018). Várias atividades biológicas são atribuídas à Gal-1 em diferentes etapas da progressão do tumor, como por exemplo, a invasão, metástase, angiogênese e proteção aos tumores das respostas imunes do hospedeiro (BACIGALUPO; CARABIAS; TRONCOSO, 2017a; CHEN et al., 2014).

A galectina-4 (Gal-4) é uma proteína do tipo tandem, composta por dois domínios de reconhecimento de carboidratos (CRD) conectados a uma única cadeia peptídica. Esta molécula é expressa sobretudo nas células epiteliais do trato intestinal (CAO; GUO, 2016; HONG et al., 2019; RUSTIGUEL et al., 2016). Funcionalmente, Gal-4 desempenha um papel crucial na regulação bioquímica, no desenvolvimento e progressão do tumor (CAO; GUO, 2016). Atua nos processos de proliferação celular, progressão, adesão e metástase tumoral (CHEN et al., 2017b).

Outra proteína do tipo tandem é a galectina-9 (Gal-9). Essa lectina é amplamente distribuída em vários órgãos e tecidos (MOAR; TANDON, 2021). Análoga a outras galectinas, Gal-9 modula muitas funções biológicas, incluindo a regulação da polaridade das células epiteliais e migração celular, bem como na progressão maligna (AVTENYUK et al., 2022). Desempenha papéis importantes na imunidade tumoral, regulação da sobrevivência, proliferação e migração das células tumorais (YANG; RABINOVICH; LIU, 2008).

Diante do exposto, o presente estudo visou investigar os níveis circulantes de galectina-1, -4 e -9 para distinguir pacientes com câncer gástrico de indivíduos saudáveis, bem como, avaliar suas possíveis associações com os parâmetros clínico-patológicos e laboratoriais no câncer gástrico.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo Geral

Analisar o perfil das galectinas -1, -4 e -9 no câncer gástrico visando sua utilização como biomarcador clínico.

### 1.1.2 Objetivos Específicos

- Quantificar os níveis circulantes das galectinas -1, -4 e -9 em amostras de soro e plasma de pacientes com câncer gástrico e em indivíduos saudáveis através do ELISA;
- Investigar a expressão tecidual da galectina-4 em amostras de câncer gástrico por imuno-histoquímica;
- Correlacionar os dados experimentais do ELISA com os parâmetros clínico-patológicos da doença;
- Analisar os parâmetros de acurácia das galectinas investigadas (especificidade, sensibilidade, curva ROC e os razões de verossimilhanças);
- Validar os resultados obtidos experimentalmente com os de coortes de validação (in silico).

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 ASPECTOS GERAIS – CÂNCER

A palavra “câncer” designa um conjunto de doenças crônicas, com etiologia multifatorial (CLAVEL, 2007), cuja patogênese é caracterizada por um processo mutagênico de diversas etapas, pelas quais as células neoplásicas adquirem propriedades como potencial ilimitado de proliferação, autonomia e resistência aos sinais antiproliferativos e apoptóticos (LUO; SOLIMINI; ELLEDGE, 2009). Além disso, essas células apresentam capacidade para migrar e invadir tecidos adjacentes, bem como, se disseminar para um local distante do sítio primário, ou seja, metastizar (LEBER; EFFERTH, 2009).

Atualmente, o câncer é considerado um dos principais problemas de saúde pública em todo o mundo, estando entre as principais causas de morte prematura. Os dados estatísticos sobre a incidência e mortalidade são crescentes. Esses números refletem, sobretudo, o envelhecimento e o crescimento populacional, alterações de prevalência e distribuição dos fatores de risco, que podem, em alguns casos, estar associados ao desenvolvimento socioeconômico (BRAY et al., 2018; INCA, 2020).

Dentro desse grupo de malignidades, os tumores do trato gastrointestinal (TGI) estão entre os mais frequentes e correspondem a aproximadamente um terço da incidência e mortalidade globais associados ao câncer (BIJLSMA et al., 2017; LAU et al., 2020). Os cânceres do TGI referem-se aos que eventualmente se desenvolvem nos diversos órgãos que constituem esse sistema, incluindo o esôfago, estômago, cólon, fígado, pâncreas e vesícula biliar (BACIGALUPO; CARABIAS; TRONCOSO, 2017; BIJLSMA et al., 2017).

Essas doenças estão relacionadas a diversos fatores etiológicos; citam-se os fatores genéticos, fatores ambientais, síntese intragástrica de carcinógenos, agentes infecciosos e alterações patológicas. A ausência de sintomas específicos nos estágios iniciais resulta no diagnóstico tardio e atraso no tratamento. Além disso, a maioria desses cânceres são agressivos e rapidamente metastizam, o que causa a elevada mortalidade. Quanto às estratégias terapêuticas, atualmente, a radioterapia combinada à quimioterapia continua sendo a principal medida. Entretanto, o prognóstico permanece desfavorável em decorrência da falta de biomarcadores específicos e da resistência aos quimioterápicos (CUI et al., 2019).

Em face do exposto, é crucial a identificação de novos alvos moleculares para auxiliar no desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais eficazes (BACIGALUPO; CARABIAS; TRONCOSO, 2017).

## 2.2 CÂNCER GÁSTRICO

O câncer gástrico, também designado câncer de estômago, é um dos tumores malignos mais comuns do sistema digestivo, associado à alta morbimortalidade em todo o mundo (SONG et al., 2017; YOON; KIM, 2015). A carcinogênese gástrica decorre de um processo complexo de múltiplas etapas, protagonizada por diversos fatores ambientais e genéticos, cujo o desenvolvimento resulta do acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas que ativam as vias oncogênicas e/ou inativam supressores tumorais, levando ao crescimento e sobrevivência desordenados das células (FIGUEIREDO; GARCIA-GONZALEZ; MACHADO, 2013; SEDDA et al., 2014). Categoricamente, é uma doença heterogênea que apresenta diferentes fenótipos, prognóstico e respostas ao tratamento (OUE et al., 2019).

### 2.2.1 Epidemiologia

Todos os anos, quase 1 milhão de novos casos de CG são diagnosticados em todo o mundo, tornando-o o quinto tipo de malignidade mais comum e a terceira principal causa de morte associada ao câncer. Estas constatações levaram a Organização Mundial de Saúde a considerar essa malignidade um importante problema de saúde global (AJANI et al., 2022; RYU et al., 2017; STRONG, 2018; VENERITO et al., 2019; YAO et al., 2019).

A incidência do CG é mais comum nos países em desenvolvimento comparado aos países desenvolvidos economicamente (TSAI et al., 2017), variando amplamente entre populações de determinadas localizações geográficas e grupos socioeconômicos, associados principalmente a variações na dieta (MA et al., 2016). Ademais, a incidência é, frequentemente, duas vezes maior em homens do que em mulheres, na maioria dos casos após os 60 anos de idade (BALAKRISHNAN et al., 2017). Entre os homens, é o tumor maligno mais diagnosticado e uma das principais causas de morte em vários países da Ásia Ocidental; cita-se o Irã, Turquemenistão e Quirguistão. Áreas com alta incidência, em ambos os sexos, no Leste da Ásia incluem a Mongólia, Japão e a República da Coreia,

enquanto na América do Norte, Norte da Europa e em regiões Africanas as taxas geralmente são baixas (BRAY et al., 2018).

No Brasil, estimam-se para cada ano do triênio 2020-2022 cerca 21.230 novos casos de CG, excluindo-se os casos de câncer de pele não melanoma. Esse valor distribuído por sexo corresponde a 13.360 entre homens e 7.870 nas mulheres, classificando a doença como o quarto tipo de câncer mais incidente em homens e o sexto para as mulheres (Figura 1) (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2020).

**Figura 1.** Distribuição por sexo dos dez tipos de câncer mais incidentes, exceto os casos de câncer de pele não melanoma, estimados para o triênio 2020-2022 no Brasil segundo o INCA.

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	65.840	29,2%	Homens	Mulheres	Mama feminina	66.280	29,7%
Cólon e reto	20.520	9,1%			Cólon e reto	20.470	9,2%
Traqueia, brônquio e pulmão	17.760	7,9%			Colo do útero	16.590	7,4%
Estômago	13.360	5,9%			Traqueia, brônquio e pulmão	12.440	5,6%
Cavidade oral	11.180	5,0%			Glândula tireoide	11.950	5,4%
Esôfago	8.690	3,9%			Estômago	7.870	3,5%
Bexiga	7.590	3,4%			Ovário	6.650	3,0%
Linfoma não Hodgkin	6.580	2,9%			Corpo do útero	6.540	2,9%
Laringe	6.470	2,9%			Linfoma não Hodgkin	5.450	2,4%
Leucemias	5.920	2,6%			Sistema nervoso central	5.220	2,3%

**Fonte:** INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (2020).

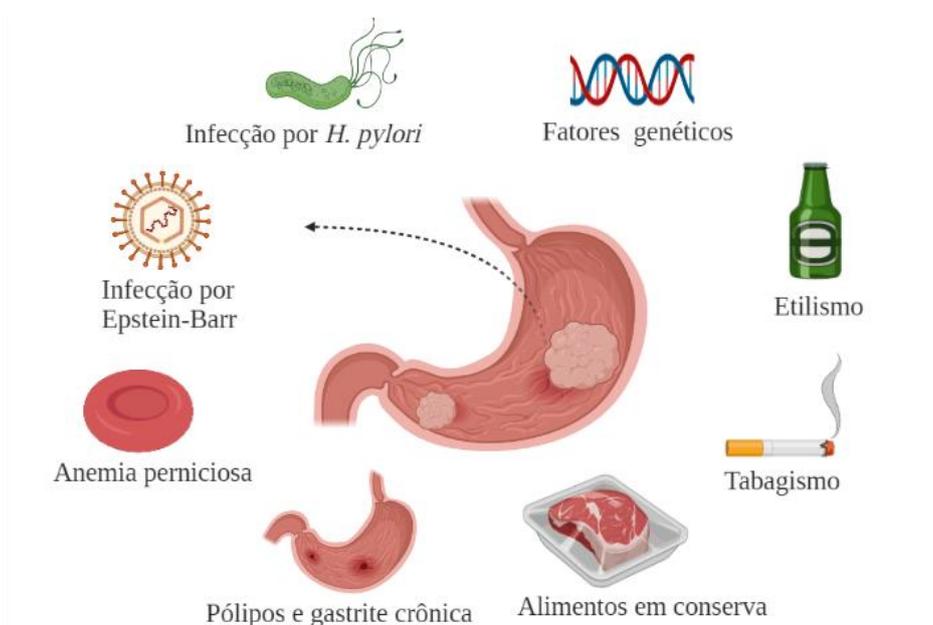
Quanto a incidência por sexo nas regiões do Brasil, o CG em homens é o segundo câncer mais frequente na Região Norte (11,75/100 mil), seguido pela Região Nordeste (10,63/100 mil) ocupando a terceira posição. Nas Regiões Sul (16,02/100 mil), Sudeste (13,99/100 mil) e Centro-Oeste (9,38/100 mil) é o quarto mais frequente. Para as mulheres, é o quinto mais frequente nas Regiões Sul (9,15/100 mil) e Norte (6,03/100 mil). Nas demais Regiões, Centro-Oeste (6,71/100 mil) e Nordeste (7,03/100 mil), ocupa a sexta posição. Para o estado de Pernambuco, estimou-se cerca de 480 novos casos entre homens e 350 nas mulheres (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2020).

Anualmente, os cânceres gástricos são responsáveis por 783.000 mortes, correspondendo a aproximadamente 8,3% de todas as mortes por câncer no mundo (RAWLA; BARSOUK, 2019). Para mais, a doença ressecável apresenta uma taxa de

sobrevida estimada em cerca de 20% a 30 % em 5 anos. Consequentemente, essa malignidade tem um impacto significativo na saúde geral e na expectativa de vida em todo o mundo (BALAKRISHNAN et al., 2017; REDDAVID et al., 2018).

Etiologicamente, a carcinogênese gástrica está associada a múltiplos fatores ambientais e genéticos (CHENG; LIN; TU, 2016; KARIMI et al., 2014). Nesse contexto, algumas condições apresentam-se como fatores de risco como o histórico familiar de CG, infecções por *Helicobacter pylori* e por Epstein-Barr (EBV), pólipos gástricos, gastrite atrófica crônica, fatores alimentares, tabagismo, etilismo, obesidade, radiação, anemia perniciosa e gastrectomia parcial (Figura 2) (CHEN et al., 2015; KREJS, 2010; ZALI; REZAEI-TAVIRANI; AZODI, 2011).

**Figura 2.** Fatores relacionados ao risco do desenvolvimento do câncer gástrico.



**Fonte:** Elaborada pela autora (2022).

O CG geralmente ocorre de forma esporádica. Apesar disso, aproximadamente 10% dos casos estão associados ao histórico familiar (CHOI; KIM, 2016). Quanto aos fatores genéticos, mutações herdadas em alguns genes, como o fenótipo nulo de GSTM1 ou o gene CDH1, e polimorfismos dos genes das interleucinas IL-17 e IL-10 estão associados a um risco elevado de câncer gástrico. A síndrome de Lynch é outro distúrbio hereditário que aumenta o risco desse tipo de câncer. Além disso, mutações pontuais no promotor da APC podem causar alguns distúrbios, cita-se a polipose adenomatosa

familiar (PAF), a forma mais comum de câncer gástrico intestinal familiar (RAWLA; BARSOUK, 2019).

A infecção por *Helicobacter pylori* é uma condição substancial para o desenvolvimento do câncer gástrico (BORNSCHEIN; MALFERTHEINER, 2011; SONG; ZHOU, 2015). A inflamação induzida por essa bactéria provoca danos teciduais que levam a atrofia gástrica. O epitélio gástrico pode ser substituído por metaplasia intestinal, podendo evoluir para uma displasia e subsequentemente desencadear um processo neoplásico (ISHAQ; NUNN, 2015; MARQUÉS-LESPIER; GONZÁLEZ-PONS; CRUZ-CORREA, 2016). Ademais, o declínio na prevalência de *H. pylori* está significativamente associado à redução da incidência de câncer gástrico em muitas partes do mundo. Por outro lado, áreas com alta prevalência dessa infecção apresentam um aumento na incidência e mortalidade por câncer gástrico (DEN HOED; KUIPERS, 2016).

No entanto, tem sido observado nas últimas décadas um declínio na incidência do CG em todo o mundo. Fato que está principalmente atrelado à redução da infecção por *H. pylori*, mas também ao progresso no armazenamento e preservação de alimentos e redução do consumo de alimentos salgados e defumados, bem como, a maior disponibilidade de frutas e vegetais frescos (PETRYSZYN; CHAPELLE; MATYSIAK-BUDNIK, 2020; RAWLA; BARSOUK, 2019).

### **2.2.2 Aspectos clínicos e histopatológicos**

O estômago é um órgão do sistema digestivo, situado na cavidade abdominal entre o esôfago e o intestino delgado. Sua principal função é a formação do quimo e a digestão de alguns alimentos por meio da atividade química e muscular (JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO. J, 2013).

Esse segmento é subdividido em quatro sítios anatômicos: cárdia, fundo, corpo e piloro que é subdividido em duas partes, antro e canal pilórico (DANGELO, J.G; FATTINI, C.A.,2011). Histologicamente, a parede do órgão é revestida por um epitélio colunar simples que produz muco. No epitélio são formadas as fossetas gástricas, onde são encontradas as glândulas responsáveis pela produção das enzimas digestivas. A camada muscular é composta por células musculares lisas. Já a camada subserosa é formado por tecido conjuntivo moderadamente denso, apresentando vasos sanguíneos e linfáticos (JUNQUEIRA, L.C; CARNEIRO. J, 2013).

Em contraste com as funções fisiológicas, a acidez estomacal associada a fatores ambientais, promovem condições favoráveis ao desenvolvimento de doenças, que incluem o câncer, contribuindo para uma considerável morbidade humana (KIM; SHIVDASANI, 2016).

Os tumores que se desenvolvem no estômago podem ser de caráter benigno, de comportamento não específico, carcinoma *in situ* ou maligno, e de acordo com o tecido originário, classificados como tumores epiteliais, tumores mesenquimais, linfomas e tumores secundários (Quadro 1) (BOSMAN, F.T. et al.,2010). Aproximadamente 90% dos cânceres gástricos são adenocarcinomas, que surgem nas glândulas da camada mais superficial do estômago (CHENG; LIN; TU, 2016; DENG et al., 2021; KARIMI et al., 2014).

**Quadro 1** - Classificação<sup>a</sup> da World Health Organization (WHO) para tumores gástricos. <sup>a</sup> Códigos morfológicos da Classificação Internacional de Doenças Oncológicas (ICD-O) {904A}. O comportamento tumoral é codificado como / 0 para tumores benignos, / 1 para comportamento não especificado, limítrofe ou incerto, / 2 para carcinoma *in situ* e neoplasia intraepitelial grau III, e / 3 para tumores malignos. <sup>b</sup> A classificação é adaptada a partir da classificação histológica anterior para tumores da WHO (691). Para as neoplasias neuroendócrinas, a classificação foi simplificada para ser mais útil na classificação morfológica; \* Códigos aprovados pelo Comitê da IARC/OMS para o ICD-O em março de 2010.

---

**Tumores epiteliais**

Lesões pré-malignas		Carcinoma neuroendócrino	
Adenoma	<b>8140/0</b>	(NEC)	<b>8246/3</b>
Neoplasia intraepitelial		Grande célula NEC	<b>8013/3</b>
(displasia), baixo grau	<b>8148/0*</b>	Pequena célula NEC	<b>8041/3</b>
Neoplasia intraepitelial		Carcinoma	
(displasia), alto grau	<b>8148/2*</b>	adenoneuroendócrino misto	<b>8244/3</b>
		Célula EC, produtora de	
Carcinoma		serotonina NET	<b>8241/3</b>
Adenocarcinoma	<b>8140/3</b>	Produção de gastrina NET	
Adenocarcinoma papilar	<b>8260/3</b>	(gastrinoma)	<b>8153/3</b>
Adenocarcinoma tubular	<b>8211/3</b>		
Adenocarcinoma mucinoso	<b>8480/3</b>	<b>Tumores mesenquimais</b>	
Carcinoma pouco coeso		Tumor de glomus	<b>8711/0</b>
(incluindo carcinoma de células		Tumor de células granulares	<b>9580/0</b>
em anel de sinete e outras		Leiomioma	<b>8890/0</b>
variantes)	<b>8490/3*</b>	Fibromixoma plexiforme	<b>8811/0*</b>
Adenocarcinoma misto	<b>8255/3</b>	Schwannoma	<b>9560/0</b>
Carcinoma adenoescamoso	<b>8560/3</b>	Tumor miofibroblástico	
Carcinoma com estroma linfoide		inflamatório	<b>8825/1</b>
(carcinoma medular)	<b>8512/3</b>	Tumor gastrointestinal	
Adenocarcinoma hepatoide	<b>8576/3</b>	estromal	<b>8936/3</b>
Carcinoma de células escamosas	<b>8070/3</b>	Sarcoma de kaposi	<b>9140/3</b>
Carcinoma indiferenciado	<b>8020/3</b>	Leiomiosarcoma	<b>8890/3</b>
		Sarcoma sinovial	<b>9040/3</b>
Neoplasias neuroendócrinas <sup>b</sup>			
Tumor neuroendócrino (NET)		<b>Linfomas</b>	
NET G1 (carcinoide)	<b>8240/3</b>		
NET G2	<b>8249/3</b>		

---

**Tumores secundários**

**Fonte:** Adaptado de (BOSMAN, F.T. et al., 2010).

Patologicamente, refere-se a CG em estágio inicial aqueles limitados à mucosa ou submucosa, independentemente do tamanho e da presença de metástase linfonodal.

Malignidades intermediárias são aquelas que invadem a camada muscular gástrica, enquanto o CG em estágio avançado refere-se aqueles que infiltram a subserosa para órgãos próximos ou metastizam (SONG et al., 2017).

As características clínicas do CG são inespecíficas e corroboram com o diagnóstico tardio. Geralmente, os estágios iniciais da doença são assintomáticos ou apresentam sintomas inespecíficos, como dispepsia. Nos estágios avançados, podem ocorrer dor abdominal, anorexia e perda de peso. Além disso, os tumores ulcerados podem estar associados à hematêmese. O vômito persistente pode ser um indício de estenose pilórica (CORREA, 2013).

O CG é uma doença heterogênea que apresenta variações intertumoral e intratumoral. Consequentemente, a diversidade de fatores tumorais e microambientais conferem ao tumor características biológicas distintas, bem como diferentes respostas ao tratamento (GAO et al., 2018).

Corriqueiramente, a classificação dessa malignidade é baseada nas características histopatológicas e morfológicas (HO; TAN, 2019). As classificações mais utilizadas se baseiam nos critérios da WHO e nos de Lauren. Em 2010, a WHO recategorizou o adenocarcinoma gástrico em cinco subtipos histológicos: tubular, papilar, mucinoso, pouco coeso e misto. Nessa classificação, o carcinoma gástrico de células em anel de sinete é agrupado no subtipo pouco coeso (BERLTH et al., 2014; LUU et al., 2017). Todavia, a classificação de Lauren é amplamente utilizada, e distingue o CG em dois subtipos: intestinal e difuso. Esses subtipos exibem diferenças patológicas, epidemiológicas e etiológicas (MA et al., 2016; SITARZ et al., 2018).

O tipo difuso acomete frequentemente pacientes mais jovens e do sexo feminino, antagônico ao tipo intestinal que é mais frequente em homens em faixas etárias mais avançadas. Além disso, ao que tudo indica, o tipo difuso apresenta um prognóstico desfavorável e uma quimiossensibilidade mais reduzida que o tipo intestinal (PERNOT et al., 2020). Quanto à patogênese, o subtipo intestinal está associado à sequência de gastrite atrófica crônica, metaplasia intestinal e displasia, e também está associado a fatores ambientais; enquanto o difuso tem origem na mucosa gástrica normal e está mais relacionado a fatores genéticos (MARRELLI et al., 2018; SITARZ et al., 2018).

Infelizmente, as classificações fundamentadas na morfologia são ineficientes em refletir a heterogeneidade molecular do CG, bem como, orientar a prática clínica nos casos de CG avançado para determinar o prognóstico ou prever a resposta ao tratamento (WANG; LIU; HU, 2019). Para solucionar essa deficiência, o perfil molecular em larga

escala e rendimento levou a várias classificações moleculares na diligência de descobrir particularidades específicas de subtipos, que podem ser exploradas para intervenções terapêuticas (HO; TAN, 2019).

Na última década, com os avanços nas tecnologias, a rede Atlas do Genoma do Câncer (TCGA) classificou o CG em quatro subtipos: Epstein-Barr positivo, instabilidade de microssatélites (MSI), subtipos genomicamente estáveis e instabilidade cromossômica. Essa classificação apresenta implicações biológicas e clínicas importantes para pesquisa básica, diagnóstico e tratamento medicamentoso (CHIA; TAN, 2016; LIM et al., 2016). Entretanto, sua aplicação na prática clínica é inviabilizada pela utilização de técnicas de ponta e pelo alto custo.

Outras classificações também baseadas em metodologias complexas foram descritas. Porém, muitas vezes os laboratórios não dispõem dessas metodologias; pois não apresentam validação em larga escala, com diferenças marcantes em epidemiologia, mecanismos moleculares e prognóstico, seu poder prognóstico é reduzido pela falta de acompanhamento dos pacientes, nenhum deles leva em consideração as células estromais ativas e não malignas, o que as torna limitantes (ALESSANDRINI et al., 2018).

### **2.2.3 Diagnóstico**

O diagnóstico das neoplasias gástricas é inicialmente conduzido pela anamnese. A presença de sintomas como perda de peso, disfagia, sinais de sangramento gastrointestinal, anemia e vômito persistente estão frequentemente relacionados a malignidades gastrointestinais superiores. Quando relatado, os pacientes são submetidos à endoscopia digestiva alta com biópsia (MACONI et al., 2008). Através do exame endoscópico, serão descritos o tamanho, localização, forma e rigidez do tumor primário (AJANI et al., 2017). Apesar da técnica em pauta ser considerada padrão-ouro no diagnóstico do CG, apresenta uma taxa de falso-negativo de até 19% (VRADELIS et al., 2011).

Após o diagnóstico histopatológico, a tomografia computadorizada do abdômen e do tórax, deve ser realizada para a avaliação de metástases e para consequentemente determinar as opções terapêuticas. Todavia, esse procedimento apresenta uma capacidade limitada em avaliar a disseminação do tumor para os linfonodos adjacentes, além de não ser eficaz na determinação da extensão da invasão tumoral, e na detecção de metástase maiores do que 5 mm de diâmetro no fígado ou pulmão (LAYKE; LOPEZ, 2004).

A profundidade da invasão tumoral também pode ser determinada pela combinação dos achados de outras técnicas como a endoscopia e a ultra-sonografia endoscópica. Além disso, a ultrassonografia endoscópica é útil na identificação de linfonodos perigástricos aumentados (AJANI et al., 2017). Adicionalmente, quando as investigações por imagem são negativas, a laparoscopia pode ser requerida afim de detectar doenças peritoneais e metastáticas com menos de 5 mm de diâmetro (THRUMURTHY et al., 2013).

Na prática clínica, os marcadores tumorais gástricos auxiliam no diagnóstico, na determinação do estágio clínico, avaliação das respostas ao tratamento e na triagem de recorrência após a terapia (MATSUOKA; YASHIRO, 2018). Os marcadores utilizados para detecção do CG compreendem o antígeno carcinoembrionário (CEA), os antígenos de carboidratos (CA) - CA19-9, CA72-4, CA125, CA24-2, CA50, além do pepsinogênio e  $\alpha$ -fetoproteína (AFP), mas nenhum deles é específico (NECULA et al., 2019). Dos marcadores mencionados anteriormente, os mais frequentemente utilizados são o CEA, CA19-9 e o CA72-4; todavia, esses marcadores apresentam parâmetros de acurácia insatisfatórios, o que torna sua eficácia questionável (Tabela 1) (YE et al., 2020; YU; ZHANG; ZHAO, 2016).

**Tabela 1.** Medidas de acurácia dos marcadores tumorais séricos frequentemente utilizados na clínica para o diagnóstico do CG.

	<b>CEA</b> <b>(ng/ml)</b>	<b>CA19-9</b> <b>(U/ml)</b>	<b>CA72-4</b> <b>(U/ml)</b>
<b>AUC</b>	0.712	0.585	0.722
<b>VALOR LIMITE NORMAL</b>	$\leq 5$	$\leq 27$	$\leq 5.3$
<b>SENSIBILIDADE %</b>	20.10	21.40	27.60
<b>ESPECIFICIDADE %</b>	94.70	96.20	85.10
<b>LR+/LR-</b>	3.79/0.85	5.63/0.82	1.85/0.85

AUC = área sob curva, IC = intervalo de confiança, LR+ = razão de verossimilhança positiva, LR- = razão de verossimilhança negativa.

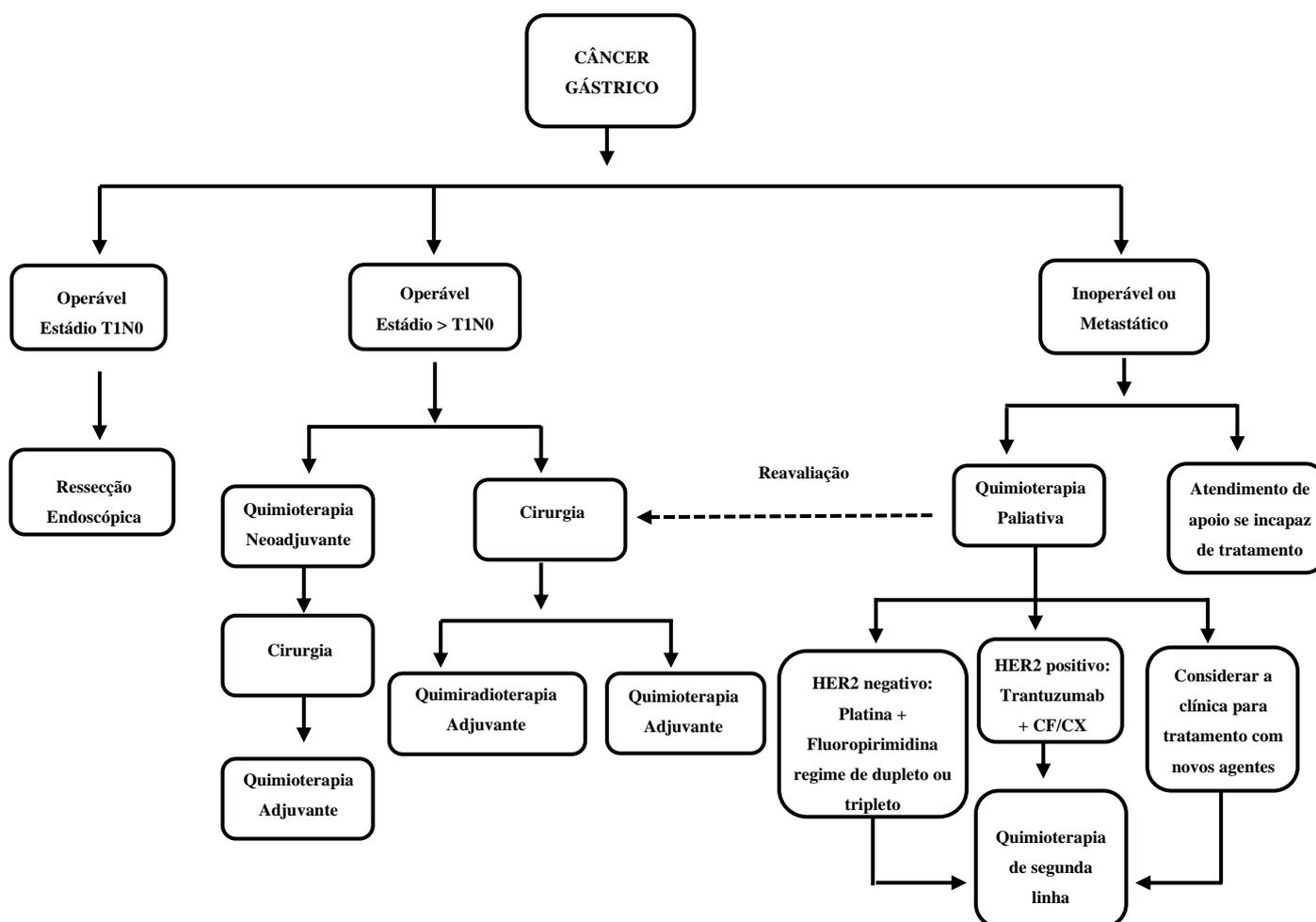
**Fonte:** Adaptado de (LIANG et al., 2016).

Isto posto, a fim de otimizar o diagnóstico precoce e nortear a conduta terapêutica, se faz necessário rastrear novos biomarcadores com melhor eficácia para o CG (CHEN et al., 2020).

## 2.2.4 Tratamento

As opções terapêuticas para o câncer gástrico incluem cirurgia, quimioterapia, radioterapia, terapia com alvo molecular e imunoterapia. Sendo o estágio tumoral fator determinante para o direcionamento da estratégia de tratamento, e sua consequente eficácia (Figura 3) (SONG et al., 2017).

**Figura 3.** Fluxograma do tratamento para o câncer gástrico. Receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2); Cisplatina e 5-fluorouracil (CF); Cisplatina e Capecitabina (CX).



Fonte: Adaptado de (SMYTH et al., 2016).

A ressecção cirúrgica continua sendo a única opção terapêutica potencialmente curativa para o câncer gástrico, sobretudo, nos estágios iniciais (CHARALAMPAKIS et al., 2018; DUARTE et al., 2018). A localização do tumor, o padrão de crescimento e a profundidade da lesão determinam o tipo de procedimento cirúrgico. Isto posto, casos precoces confinados à mucosa, bem diferenciados, menores do que 2 cm e não ulcerados são tratados por ressecção endoscópica. Em contra partida, os tumores mais avançados requerem cirurgia, devido à possibilidade de metástases linfonodais (OTT et al., 2011; SMYTH et al., 2016).

Em síntese, a gastrectomia consiste na retirada parcial ou total do estômago. Quando uma margem proximal macroscópica de 5 cm for alcançada entre o tumor e a junção gastroesofágico, a gastrectomia subtotal pode ser realizada. Para cânceres difusos, é recomendada uma margem de aproximadamente 8 cm. Quando não, é indicada uma gastrectomia total (SMYTH et al., 2016).

O CG apresenta uma alta tendência ao envolvimento linfonodal, cuja disseminação varia com a gravidade da doença, tornando-o um importante fator prognóstico. Dessa forma, a gastrectomia associada à dissecação dos gânglios linfáticos apresenta intenção curativa (DEGIULI et al., 2016; FUGAZZOLA et al., 2018). Quanto à extensão da linfadenectomia, a ressecção D1 implica na remoção dos linfonodos perigástricos. Na D2, ocorre a remoção dos linfonodos perigástricos e aqueles ao longo das artérias gástrica esquerda, hepática e esplênica comum e do eixo celíaco (SMYTH et al., 2016). Já a ressecção D3 consiste na remoção dos linfonodos D2, mais os linfonodos do ligamento hépato-duodenal e da raiz do mesentério (TONETO, 2012).

Nas últimas décadas, a modalidade de cirurgia minimamente invasiva e de tratamento endoscópico agregaram positivamente a abordagem cirúrgica para o CG. Essas intervenções são menos invasivas e menos dispendiosas; além disso, não apresentam impacto negativo nos resultados oncológicos, preservam as funções fisiológicas, refletindo em melhorias na qualidade de vida dos pacientes (MIHMANLI et al., 2016; SON; KIM, 2014).

Um dos primeiros procedimentos minimamente invasivos é a cirurgia laparoscópica. Em resumo, essa modalidade utiliza além dos instrumentos cirúrgicos, ferramentas como tubos e câmeras de vídeo, para realizar pequenas incisões (NUNOBE et al., 2016). No entanto, evidências sugerem que a gastrectomia assistida por robô oferece benefícios relacionados a linfadenectomia e restauração digestiva, comparado ao procedimento laparoscópico (ORDITURA et al., 2014).

A ressecção cirúrgica bem-sucedida para o CG localizado exibe uma taxa de sobrevida superior a 90%. No entanto, nos casos avançados a sobrevida é baixa (20%-50% em 5 anos) apenas com a cirurgia. Logo, as terapias multimodais, como radioterapia, quimioterapia perioperatória ou pós-operatória, bem como a quimiorradioterapia podem melhorar a sobrevida dos pacientes submetidos a cirurgia curativa (ASHRAF; HOFFE; KIM, 2013; CHARALAMPAKIS et al., 2018; ORDITURA et al., 2014).

A quimioterapia neoadjuvante consiste na administração sistêmica do quimioterápico antes do tratamento locorregional definitivo, sendo potencialmente útil para pacientes com tumores em estágios avançados. Tal modalidade terapêutica pode resultar na redução dos tumores e como consequência melhora a ressecção curativa. Ademais, teoricamente apresenta algumas vantagens: identificação de pacientes que possivelmente se beneficiarão da quimioterapia adjuvante, tratamento precoce da doença micrometastática, diminuição da resistência aos medicamentos devido à exposição precoce, entre outras. Em contrapartida, apresentam algumas desvantagens como atraso na terapia local, risco de progressão para os pacientes quimiorresistentes e aumento da probabilidade de complicações perioperatórias (DE VITA et al., 2007; RAJDEV, 2010).

A radioterapia neoadjuvante também é capaz de conferir um potencial aumento na taxa de cirurgia curativa. Teoricamente, tem a vantagem de tratar um tumor com vascularização intacta sem a remodelação fibrótica tumoral seguido à cirurgia. No entanto, não existem dados patológicos disponíveis para ajudar a orientar seu uso (RAJDEV, 2010).

Outra estratégia terapêutica é o tratamento adjuvante, administrado após a ressecção cirúrgica, com a finalidade de reduzir a recorrência do tumor e melhorar a sobrevida global (ASHRAF; HOFFE; KIM, 2013). Esta opção terapêutica é recomendada para pacientes com CG avançado que foram submetidos a cirurgia sem administração de quimioterapia pré-operatória, recomendando-se quimiorradioterapia pós-operatória ou quimioterapia adjuvante (SMYTH et al., 2016).

No CG metastático as chances de cura são mínimas. No entanto, algumas estratégias terapêuticas podem aliviar os sintomas e ajudar a manter o tumor sob controle (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2018). Nesses casos, a primeira linha de tratamento baseia-se nos esquemas de platina/fluoropirimidina. Já para o tratamento de segunda linha, é recomendada a quimioterapia com um taxano (docetaxel, paclitaxel) ou irinotecano ou ramucirumab como agente único ou em combinação com paclitaxel. Aos pacientes que apresentam a expressão positiva do receptor 2 do fator de crescimento

epidérmico humano (HER2), é recomendado o trastuzumabe em conjunto com quimioterapia à base de platina e fluoropirimidina (SMYTH et al., 2016).

Simultâneo ao desenvolvimento dos agentes biológicos, a imunoterapia inovou o cenário oncológico. Mediante ao bloqueio dos pontos de verificação imunes, como o antígeno 4 citotóxico associado a linfócitos T (CTLA-4), células programadas morte-1 (PD-1) e seu ligante (PD-L1 ou B7-H1), foi verificada eficácia nos diversos tipos de cânceres sólidos. Futuramente, a interrupção dos pontos de verificação imune pode se tornar uma opção terapêutica para o CG (COUTZAC et al., 2019).

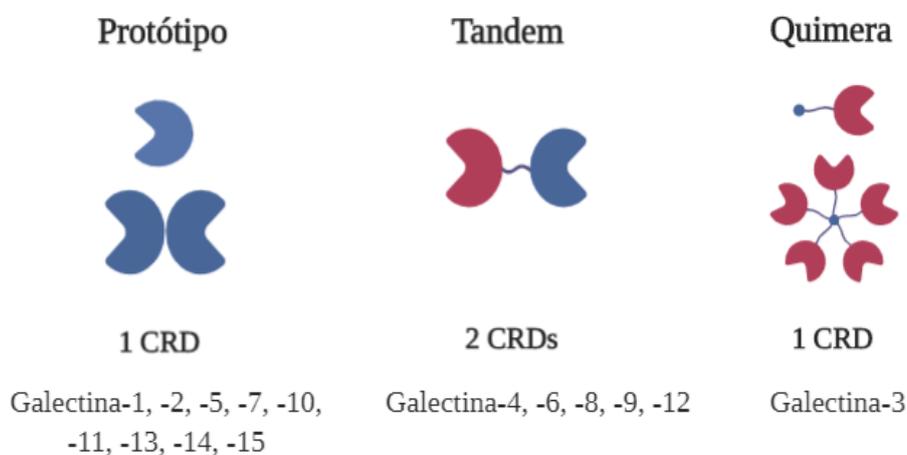
### 2.3 GALECTINAS

A glicosilação alterada é uma característica inerente ao câncer, e pode ser inspecionada para diagnóstico e possível terapia dessa malignidade. Nesse cenário, as galectinas (Gals) surgem como importantes proteínas associadas ao desenvolvimento e progressão tumoral (MARTÍNEZ-BOSCH et al., 2019).

As galectinas compreendem uma subfamília de proteínas lectinas que apresentam afinidade a glicanos, especificamente aos  $\beta$ -galactosídeos. Essa ligação é mediada por um ou dois domínios de reconhecimento a carboidratos (CRD), composto por aproximadamente 130 aminoácidos (MANERO-RUPÉREZ et al., 2020; SALAMANNA et al., 2019; WADOWIAK et al., 2018).

Atualmente, existem 15 galectinas conhecidas em mamíferos, 11 das quais são encontradas em humanos. Dependendo da organização estrutural, são classificadas em três grupos: (1) galectina do tipo protótipo que contém apenas um CRD e geralmente formam homodímeros não covalentes (galectinas-1,2,5,7,10,11,13,14,15); (2) galectinas de repetição em tandem são caracterizadas por dois CRDs não idênticos que são ligados por um peptídeo ligante (galectinas-4,6, 8,9,12), e (3) galectina do tipo quimera que apresenta um domínio CRD e uma região N-terminal que permite a formação de oligômeros (galectina-3) (Figura 4) (BALAN; NANGIA-MAKKER; RAZ, 2010; CHOU et al., 2018; GIOVANNONE et al., 2018; KAUR et al., 2016).

**Figura 4.** Classificação estrutural das galectinas.



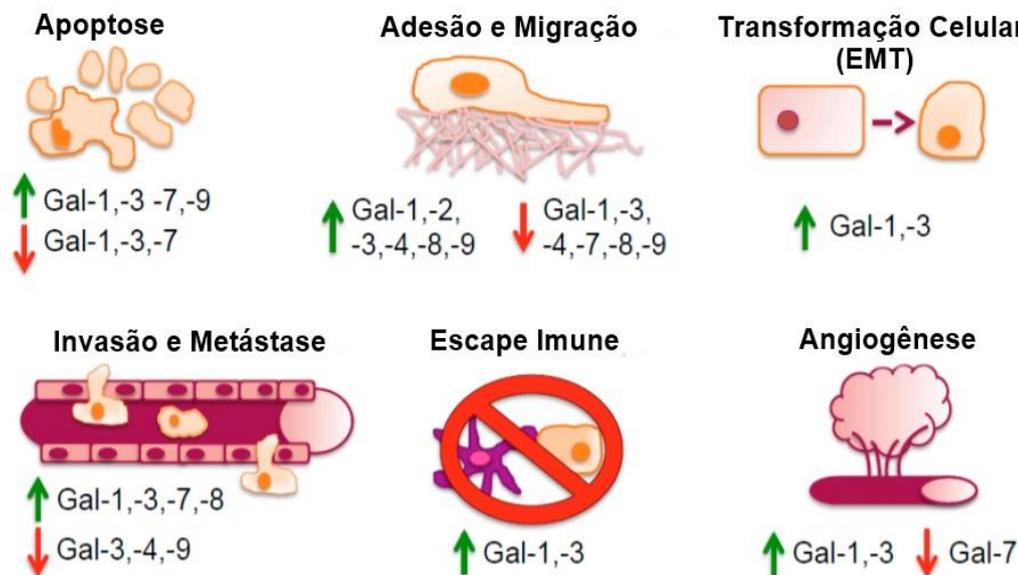
**Fonte:** Elaborada pela autora (2022).

Essas lectinas são sintetizadas no citoplasma da célula, e algumas podem ser translocadas para o núcleo. Apesar de não apresentarem um peptídeo sinal de secreção típico, essas moléculas podem ser secretadas no espaço extracelular por via não-canônica (VASTA et al., 2017). A interação dessas proteínas com os glicanos da superfície celular é capaz de desencadear variadas funções (NABI; SHANKAR; DENNIS, 2015).

No compartimento extracelular, podem estimular a comunicação celular, levando a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), mobilização do cálcio intracelular e secreção de fatores de crescimento endotelial vascular (VEGFs). Intracelularmente, as galectinas agem ligando-se a proteínas citoplasmáticas e nucleares, regulando a transdução de sinal e respostas biológicas (TIMOSHENKO, 2015; VAN DER HOEVEN et al., 2016).

As galectinas são moduladas durante a diferenciação das células e no desenvolvimento dos órgãos; por conseguinte, erros na modulação podem ocorrer em condições fisiológicas e patológicas (CHANG et al., 2017). Dessa forma, podem exibir efeitos variados ou contrastantes, com base no contexto biológico e microambiental (THAN et al., 2015). No contexto tumoral, a expressão e função dessas moléculas podem variar consideravelmente entre os tipos de câncer. De modo geral, participam da carcinogênese e progressão tumoral, como evidenciado na figura 5 (CHANG et al., 2017; DINGS, 2018).

**Figura 5.** Galectinas na carcinogênese e progressão tumoral. Essas proteínas podem atuar de modo pró e/ou antitumorígenica, regulando diversos processos que incluem a apoptose, adesão, migração, transformação celular (EMT), invasão e metástase, escape imune e angiogênese.



Fonte: (DINGS,2018).

A concentração dessas lectinas no soro ou plasma humano é tipicamente alta, na faixa de picomolar, e sua presença no soro pode resultar da saída do tecido, como foi demonstrado para outras proteínas. Diante disso, essas moléculas emergem como potenciais biomarcadores para o câncer (JOHANNES; JACOB; LEFFLER, 2018).

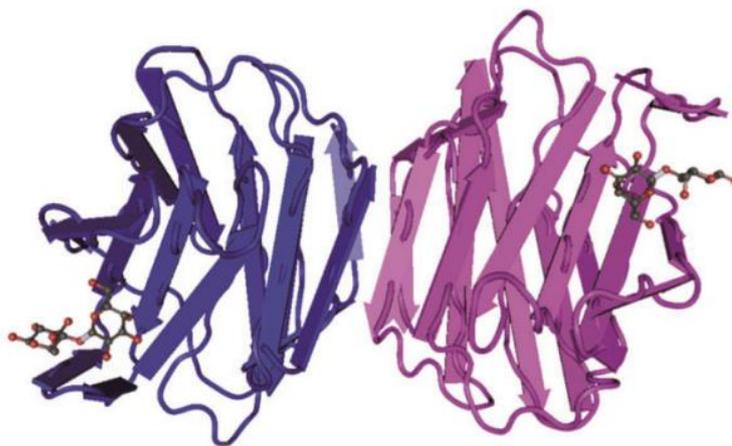
Todavia, os dados sobre os níveis circulantes das galectinas no câncer gástrico ainda são incipientes. Ademais, estudos sobre a avaliação da acurácia diagnóstica nesse contexto também são escassos.

### 2.3.1 Galectina-1

A galectina-1 é uma lectina de 14 KDa pertencente à família das galectinas com afinidade a glicanos contendo  $\beta$ -galactosídeos (CHONG et al., 2016; SHIH et al., 2018; YOU et al., 2019). Esta proteína é codificada pelo gene LGALS1 localizado no cromossomo 22q12. Como membro do grupo protótipo, Gal-1 é um homodímero não covalente com um único CRD por subunidade (ASTORGUES-XERRI et al., 2014;

BRINCHMANN; PATEL; IVERSEN, 2018). A preservação estrutural do dímero ocorre por meio das interações hidrofóbicas na interface monomérica e pelo núcleo hidrofóbico. As unidades monoméricas são organizadas de modo que os dois CRDs estejam localizados nas extremidades opostas da estrutura quaternária (Figura 6) (COUSIN; CLONINGER, 2016).

**Figura 6.** Representação estrutural da galectina-1 em sua forma homodimérica, mantida por interações não covalentes envolvendo os terminais N e C de suas subunidades.



**Fonte:** (BARRIENTOS et al., 2014).

Os CRDs opostos impulsionam eventos de reconhecimento celular e de transdução de sinal conectando adequadamente os ligantes glicosilados, o que confere a Gal-1 a propriedade de proteína multivalente. Logo, acredita-se que Gal-1, através das interações multivalentes com glicoconjugados da superfície celular, medeia diversas funções biológicas (COUSIN; CLONINGER, 2015, 2016).

A proteína em pauta é sintetizada nos ribossomos citosólicos, e pode ser direcionada para o núcleo, ser translocada para o meio intracelular das membranas celulares ou ser secretada (COUSIN; CLONINGER, 2016; YOU et al., 2018). Quanto à secreção, esta ocorre através de um mecanismo não ortodoxo, envolvendo a translocação direta através da membrana plasmática, desconsiderando a via clássica do retículo endoplasmático mediado pela vesícula/Golgi para exocitose (COUSIN; CLONINGER, 2016).

Expressa em diversos tecidos normais e patológicos, Gal-1 exhibe múltiplas atividades biológicas (ASTORGUES-XERRI et al., 2014). No contexto tumoral, está associada a diversos papéis, incluindo a agregação celular, apoptose, disseminação

metastática, imunidade tumoral, angiogênese e mimetismo vasculogênico; mostrando-se como um alvo promissor no câncer (KIM et al., 2012; YANG; RABINOVICH; LIU, 2008; YOU et al., 2019).

Nesse aspecto, Gal-1 é capaz de interagir com as principais vias de sinalização envolvidas na carcinogênese. No compartimento intracelular, Gal-1 pode participar de interações proteína-proteína com H-Ras, protocaderina-24 e Gemin4, de forma independente aos carboidratos (COUSIN; CLONINGER, 2016; SALATINO et al., 2008). A propósito, a superexpressão de Gal-1 nas células neoplásicas reflete em uma maior associação de membrana da H-ras e na transformação celular (RABINOVICH, 2005).

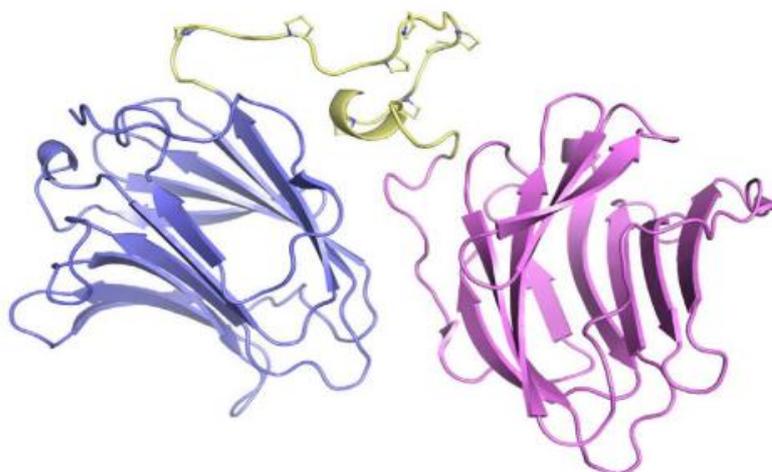
Extracelularmente, por meio de interações multivalentes, Gal-1 é capaz de desempenhar, por exemplo, a disseminação metastática através de interações com glicoproteínas na MEC, como a laminina e a fibronectina, ou agregação celular/formação tumoral mediada pela ligação de Gal-1 a glicoproteínas da superfície celular, como 90K/Mac-2BP e Mucina 1, entre outros mecanismos celulares (COUSIN; CLONINGER, 2016).

Especificamente no CG, foi proposto que Gal-1 contribui para progressão tumoral desempenhando importantes funções nas células estromais tumorais e associadas ao tumor favorecendo os processos de migração e invasão, angiogênese e inibindo a apoptose (BACIGALUPO; CARABIAS; TRONCOSO, 2017).

### **2.3.2 Galectina-4**

A galectina-4 é uma lectina de 36 KDa, descrita como quarto membro da família das galectinas (KIM; PARK; JEON, 2013; PACLIK et al., 2008). A proteína referida é codificada pelo gene LGALS4 localizado no cromossomo 19q13.2 (HUFLEJT; LEFFLER, 2003; SUN et al., 2019). Classificada como tipo de repetição em tandem, Gal-4 é composta por 2 CRDs diferentes que são conectados por uma única cadeia peptídica (Figura 7) (BRINCHMANN; PATEL; IVERSEN, 2018; HONG et al., 2019). Apesar de ambos os CRDs compartilharem cerca de 40% de sequências idênticas, suas predileções de ligação a outros dissacarídeos e polissacarídeos são diferentes. Dessa forma, é esperado a preferência por distintos conjuntos de ligantes (CAO; GUO, 2016; HONG et al., 2019).

**Figura 7.** Representação estrutural da galectina-4.



**Fonte:** (RUSTIGUEL et al., 2016).

Por conseguinte, os ligantes naturais dessa molécula são diversos e incluem os antígenos de grupos sanguíneos humanos, glicoproteínas, mucina 1 associada a superfície celular (MUC1), glicosfingolipídios e colesterol sulfatado. Além dos  $\beta$ -galactosídeos, Gal-4 também pode se ligar ao sulfato. Devido à estrutura bivalente ou multivalente e à afinidade com os ligantes citados, desempenha papéis importantes na regulação bioquímica, no desenvolvimento e progressão tumoral (CAO; GUO, 2016).

Gal-4 é expressa predominantemente nas células epiteliais ao longo do trato gastrointestinal (BACIGALUPO et al., 2013; TRONCOSO et al., 2012). Sua secreção ocorre tanto pela parte basolateral quanto apical das células epiteliais intestinais através da via de secreção não clássica (HOKAMA; MIZOGUCHI; MIZOGUCHI, 2008; MIZOGUCHI; MIZOGUCHI, 2007).

Quanto às funções biológicas, atua desempenhando um importante papel no controle da inflamação intestinal, no trato gastrointestinal de indivíduos saudáveis. No intestino, a galectina-4 interage com as células T ativadas através da ligação a CD3 e promove a apoptose das células T mediada por calpaína, mas não dependente de caspase (PACLIK et al., 2008). No âmbito tumoral, desempenha funções que incluem a proliferação celular, progressão, adesão e metástase tumoral (CHEN et al., 2017b).

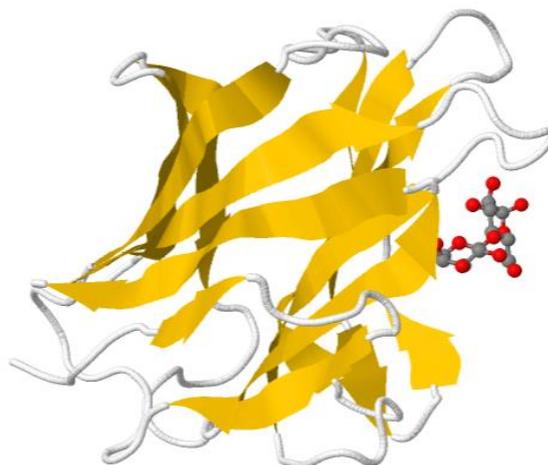
As informações disponíveis sobre a expressão de Gal-4 no câncer são limitadas, tendo papel evidenciado explicitamente apenas no desenvolvimento do câncer colorretal (CRC). Nessa malignidade, a expressão de Gal-4 apresentou-se drasticamente reduzida em comparação aos tecidos normais de cólon, sendo capaz de promover a progressão e

metástase tumoral. Além disso, verificou-se que Gal-4 inibe a tumorigênese das células de CRC por meio da via de sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina e da via de sinalização IL-6/NF- $\kappa$ B/STAT3. Em contraste, no câncer gástrico, a alta expressão da galectina-4 demonstrou ser um preditor independente de metástase (CAO; GUO, 2016).

### 2.3.3 Galectina-9

A galectin-9 é relatada como nono membro da família das galectinas (FUJITA et al., 2017). Trata-se de uma proteína de 34-39 kDa, codificada pelo gene LGALS9 localizado no cromossomo 17, braço longo no locus 11.2 (17q11.2) em humanos. Gal-9 é uma galectina do tipo de repetição em tandem, e como membro desse grupo, apresenta dois CRDs N- e C-terminais não homólogos unidos por um peptídeo chamado de domínio de ligação (Figura 8) (JOHN; MISHRA, 2016; MOAR; TANDON, 2021). Baseado na diferença no comprimento do peptídeo de ligação que separa os dois CRDs, Gal-9 humana é classificada em três isoformas denominadas Gal-9(S), Gal-9(M) e Gal-9(L) (WIERSMA et al., 2011).

**Figura 8.** Representação estrutural da galectina-9. N-Domínio de galectina-9 humana em complexo com carboidrato.



**Fonte:** RCSB Protein Data Bank (PDB). Disponível em: <<https://www.rcsb.org/3d-view/jsmol/3lse/1>>. Acesso em: 20 de maio de 2022.

Gal-9 apresenta capacidade de ligação a diferentes carboidratos exibindo propriedades de ligação bi/multivalente para agrupar múltiplos glicoconjugados ou oligossacarídeos multivalentes (JOHN; MISHRA, 2016). As redes formadas por Gal-9 podem agrupar vários glicoconjugados multivalentes entre tipos semelhantes ou

diferentes de células e ao mesmo tempo desencadear a interação celular com as proteínas da matriz extracelular (JOHN; MISHRA, 2016).

Diferentes receptores são descritos para Gal-9, incluindo a proteína dissulfeto isomerase (PDI), CD44, CD137, TIM-3 e IgE, demonstrando seus potenciais papéis em diferentes condições fisiológicas e patológicas (MOTAMEDI et al., 2019). Nesse aspecto, por exemplo, foi relatado que a via Tim-3-galectina-9 é operada por diversas células neoplásicas humanas e provavelmente está envolvida na imunidade antitumoral (YASINSKA et al., 2019).

Gal-9 é expressa em diferentes tecidos e células normais com predomínio nas células epiteliais, endoteliais e imunes. Já em condições patológicas, sua expressão foi detectada em tumores sólidos e algumas malignidades hematológicas (MEGGYES et al., 2021). Quanto ao mecanismo de secreção, algumas evidências sugerem que essa proteína é liberada das células pela via não clássica (FUJITA et al., 2017).

Funcionalmente, essa galectina é conhecida por desempenhar distintos papéis celulares, incluindo modulação da diferenciação celular, regulação da polaridade das células epiteliais, adesão, agregação, migração e morte celular. Através da modulação dessas atividades, Gal-9 está envolvida em muitos processos fisiológicos e patológicos, como imunidade, inflamação e câncer (AVTENYUK et al., 2022; BACIGALUPO et al., 2013; TRONCOSO et al., 2012).

Em condições fisiológicas normais, Gal-9 parece modular a imunidade de células T, induzindo apoptose em subpopulações específicas de células T. Além disso, essa lectina está localizada no citoplasma e na superfície das células e parece ser liberada das células tumorais (JIANG et al., 2013). Em muitos tumores sólidos, a perda da expressão de Gal-9 está associada à progressão metastática, e o tratamento recombinante com essa molécula preveniu a disseminação metastática em alguns estudos pré-clínicos (FUJIHARA et al., 2013).

No CG, dados demonstraram que a perda da expressão de Gal-9 pode estar envolvida na progressão desse tumor (YANG et al., 2014b). Além disso, a positividade dessa proteína em tecidos de CG estava associada ao estágio tumoral inicial e uma tendência de melhor sobrevida global, sugerindo que Gal-9 pode estar envolvida na supressão da progressão dessa neoplasia (CHOI et al., 2017).

Ainda são escassas as informações na literatura sobre o perfil de expressão e funções das Gals-1, -4, e -9 no CG. Portanto, o estudo desses aspectos representa uma importante ferramenta que possibilitará uma melhor compreensão do envolvimento

dessas moléculas no desenvolvimento e progressão dessa malignidade, bem como, a descoberta de potenciais marcadores biológicos e/ou alvos biológicos.

### 3 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

#### 3.1 POPULAÇÃO DE ESTUDO

A população alvo do estudo foram os pacientes atendidos no ambulatório de Oncologia e Cirurgia Oncológica do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (HC/UFPE) e na Sociedade Pernambucana de Combate ao Câncer (SPCC). Foram incluídos no estudo 69 pacientes com diagnóstico de adenocarcinoma gástrico. 67 indivíduos saudáveis, sem doenças inflamatórias e que não usavam drogas imunomoduladoras, foram incluídos como controle. As amostras de sangue periférico foram obtidas de pacientes e de indivíduos saudáveis. As coletas foram realizadas no período do diagnóstico ao tratamento inicial, de 2014 a 2021, e as amostras de soro e plasma foram conservadas congeladas a -80 °C. Dos prontuários médicos e da ficha clínica específica (Apêndice A) foram obtidos os dados clínicos e laboratoriais. Todos os pacientes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Apêndice B; Apêndice C) para participar do estudo. O estudo obteve aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa do CEP/HC/UFPE (nº do parecer: 3.083.401) (Anexo A) e CEP/SPCC (nº do parecer: 3.780.389) (Anexo B).

**Critérios de inclusão para os pacientes com câncer gástrico:** Foram incluídos no estudo indivíduos maiores de 18 anos, de ambos os sexos, com diagnóstico histopatológico confirmado de adenocarcinoma gástrico.

**Critérios de exclusão para os pacientes com câncer gástrico:** Foram excluídos pacientes que fizeram utilização de medicamentos imunomoduladores e que apresentaram doenças de base de cunho inflamatório que poderiam interferir no resultado da pesquisa.

#### 3.2 BLOCOS DE PARAFINA

Do arquivo do Serviço de Patologia da Sociedade Pernambucana de Combate ao Câncer (SPCC) foram selecionadas 25 amostras de câncer gástrico primário do tipo adenocarcinoma, diagnosticados entre o período de 2013 a 2016. Os espécimes clínicos foram previamente fixados em formalina tamponada e emblocados em parafina.

### 3.3 DOSAGEM DAS GALECTINAS

Os níveis de galectina-1, -4 e -9 presentes no soro e plasma dos pacientes com adenocarcinoma gástrico e de indivíduos saudáveis foram quantificados por ELISA sanduíche (Enzyme-linked immunosorbent assay). Os kits tinham limite de detecção entre 20000 pg/ml - 312,5 pg/ml (Gal-1), 2000 pg/ml - 31,25 pg/ml (Gal-4) e 6000 - 46.875 pg/ml (Gal-9) (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA). Em uma microplaca de 96 poços foram aplicados 50 µL por poço do anticorpo de captura previamente diluído com Tampão Fosfato-Salino (PBS), incubado overnight à temperatura ambiente. Posteriormente, os poços foram lavados com tampão de lavagem (PBS + tween), e o bloqueio das ligações inespecíficas foi realizado adicionando-se 150 µL do tampão fosfato salino - albumina (PBS-BSA) 1% (p/v) por 1 hora à temperatura ambiente. Os poços da placa foram novamente lavados, seguido da adição de 50 µL da amostra em PBS-BSA 1% (p/v) e incubado por 2 horas à temperatura ambiente. Após uma nova lavagem dos poços, 50 µL do anticorpo de detecção diluído em PBS-BSA 1% (p/v) foram adicionados em cada poço da placa. O excesso do anticorpo foi retirado com a solução de lavagem. Em seguida, 50 µL da HRP-Streptavidina foram adicionados aos poços e incubado por 20 min à temperatura ambiente na ausência de luz. Após a lavagem dos poços, 50 µL de Tetrametilbenzidina (TMB) foram aplicados em cada poço e incubado por 20 min no escuro à temperatura ambiente. Após, 25 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N foram adicionados em cada poço para cessar a reação. Ao término, para determinar a absorbância de cada poço foi utilizado um leitor de microplacas (BioTek Instruments, Inc., Winooski, EUA) no comprimento de ondas de 450 nm. Para mensuração dos níveis das galectinas, uma regressão logística foi aplicada para descontar o valor do branco em todas as amostras.

### 3.4 IMUNO-HISTOQUÍMICA

Os blocos de parafina foram cortados em micrótomo em 4 µm de espessura, montados em lâminas silanizadas, desparafinizados em xilol e reidratados em concentrações decrescentes em álcool etílico (100%, 95%, 80% e 70%). Em seguida, foi feita a recuperação antigênica com tampão citrato 100 mM, pH 6.0 em micro-ondas 300 W por 15 min. Após o resfriamento, as lâminas foram incubadas com bloqueador de peroxidase endógena (peróxido de hidrogênio) 3% (p/v) por 30 min à temperatura

ambiente e posteriormente foi feito o bloqueio das ligações inespecíficas com o bloqueador proteico tampão fosfato-salino-albumina de soro bovino (PBS-BSA) 1% (p/v) por 30 min a temperatura ambiente. Os cortes histológicos foram incubados com o anticorpo primário policlonal LGALS4 (CUSABIO) diluído na concentração 1:100 em PBS-BSA 1% (p/v) por 16 horas a 4 °C. O excesso do anticorpo foi retirado com duas lavagens com tampão PBS. Em seguida, foi aplicado o sistema de amplificação utilizando kit comercial DAKO EnVision™ por 1 hora a temperatura ambiente. Por fim, as amostras foram reveladas com diaminobenzidina (DAB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e contracoradas com hematoxilina. Como controle positivo, foi utilizado tecido de intestino delgado conforme a indicação do fabricante do anticorpo (CUSABIO TECHNOLOGY LLC) e a partir de informações do site The Human Protein Atlas (<https://www.proteinatlas.org/>), os controles negativos foram estabelecidos substituindo o anticorpo primário por anticorpo anti-IgG humana (DAKO).

### 3.5 ANÁLISE DE IMAGENS

A análise histomorfológica foi realizada com o auxílio do scanner de lâminas digital automático Panoramic MIDI II (3DHISTECH, Ltd., Budapest, Hungria). Os casos que apresentaram marcações em mais de 10% das células neoplásicas nos diferentes graus de intensidade foram considerados positivos e os que não apresentaram foram caracterizados como negativos.

### 3.6 ACURÁCIA DIAGNÓSTICA

A acurácia diagnóstica alude à concordância entre um teste proposto (índice) e um padrão de referência para a capacidade de detectar uma condição alvo, podendo ser quantificada pelas medidas de precisão diagnóstica como a sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivos e negativos, AUC (do inglês, *area under the curve*), e razões de verossimilhanças positiva e negativa. O ponto de partida é a construção de uma tabela 2 X 2 com os resultados do teste proposto de um lado e os do padrão de referência do outro (BORGES, 2016; FLORKOWSK, 2008).

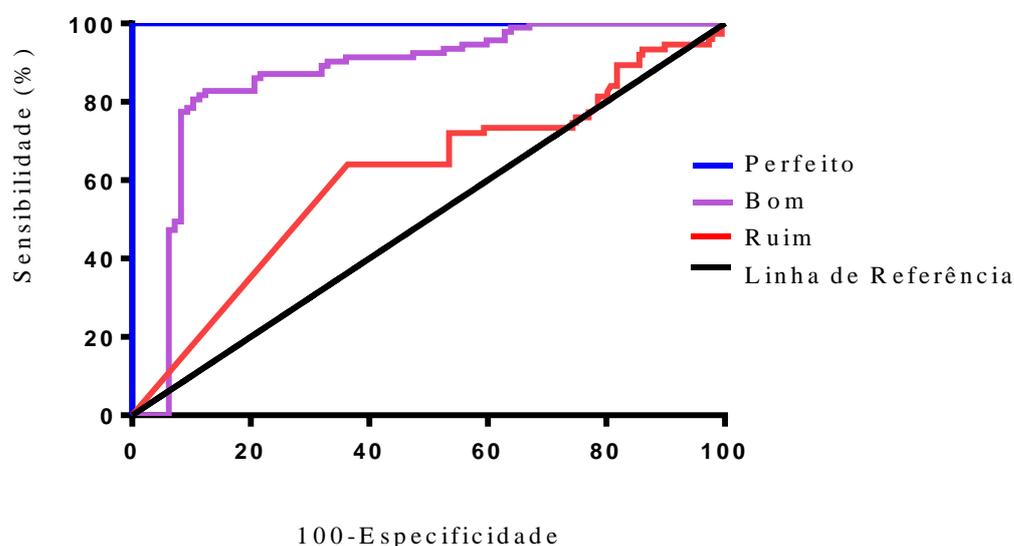
A sensibilidade diagnóstica corresponde à proporção de indivíduos que apresentam uma condição alvo e que fornecem resultados positivos para o teste que está sendo proposto. Já a especificidade, é a proporção de indivíduos sem a condição alvo e que tem resultados negativos para o teste proposto (COHEN et al., 2016; FLORKOWSK, 2008).

Outros parâmetros a serem destacados são os valores preditivos. O valor preditivo positivo corresponde a proporção de resultados positivos que são verdadeiros positivos, enquanto o valor preditivo negativo descreve a proporção de resultados negativos que são verdadeiros negativos. Esses valores dependem da prevalência da condição alvo na população avaliada, diferentemente da sensibilidade e especificidade (EUSEBI, 2013; FLORKOWSK, 2008).

A avaliação do desempenho diagnóstico, geralmente requer a criação de um ponto de corte (cut-off) a partir de dados contínuos. Dependendo do objetivo clínico, o ponto de corte ideal pode ser selecionado, dessa forma, à sensibilidade e à especificidade de um teste tendem a variar (FLORKOWSK, 2008). Além disso, o desempenho de um teste para discriminar pacientes com e sem doença pode ser analisado pela curva ROC ROC (do inglês, *receiver-operating characteristic*). A curva ROC é gerada plotando a taxa de sensibilidade no eixo y contra a 1- especificidade no eixo x (CARTER et al., 2016).

Em combinação, a curva ROC e sua AUC correspondentes são funções de sensibilidade e especificidade de um modelo de previsão. Quanto às interpretações dos valores, um teste com valor de 1,0 é considerado perfeito, 0,9-0,99 excelente, 0,8-0,89 bom, 0,7-0,79 justo, 0,51-0,69 ruim, e valores menores ou iguais a 0,5 não tem valor diagnóstico (Gráfico 1) (CARTER et al., 2016).

**Gráfico 1.** Curvas ROC exemplificando diferentes classificadores.



**Fonte:** Elaborada pela autora (2022).

Outra medida para avaliar a precisão diagnóstica são as razões de verossimilhanças (LRs). A razão de verossimilhança positiva (LR+) corresponde as chances de ocorrer um resultado positivo em indivíduos com a doença em relação aos sem a doença. Quanto mais longe o LR + for de 1, mais fortes serão as evidências da presença da doença. Em contrapartida, a razão de verossimilhança negativa (LR-) expressa quantas vezes é provável um resultado negativo ocorrer em indivíduos com a doença comparado aos indivíduos sem a condição patológica. Dessa forma, quanto menor a LR-, mais fortes as evidências de ausência da doença (EUSEBI, 2013).

### 3.7 ANÁLISE IN SILICO

A coorte de validação analisada neste estudo foi extraída do cBioPortal for Cancer Genomics (<http://www.cbioportal.org>) (CERAMI et al., 2012; GAO et al., 2013). Foram utilizados dados da expressão do mRNA do Adenocarcinoma do Estômago (TCGA, Firehose Legacy), composto por 415 amostras passíveis de análise. O valor da expressão do mRNA de LGALS1 e LGALS9 foram comparadas com os dados clínico-patológicos disponíveis na coorte de validação.

### 3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as análises estatísticas foram realizadas no *software* GraphPad Prism versão 6.01. Para avaliação dos dados foi utilizado testes não-paramétricos de Mann-Whitney para comparações entre duas médias e Kruskal-Wallis para comparações múltiplas. O teste de Pearson ( $r$ ) foi utilizado para analisar a correlação dos níveis das galectinas e os parâmetros clínicos e hematológicos. As correlações foram definidas como fracas, moderadas e fortes quando  $r < 0,40$ ,  $r = 0,40 - 0,60$  e  $r > 0,60$ , respectivamente. As associações estatísticas da coorte de validação foram realizadas utilizando o teste exato de Fisher.

Os valores de cut-off ótimos foram calculados para estimar a melhor sensibilidade e especificidade. A curva ROC foi plotada e as áreas sob curvas ROC foram calculadas para avaliar o desempenho das galectinas estudadas para discriminar CG de indivíduos saudáveis, com Intervalo de confiança de 95% (IC 95%). Os resultados foram apresentados considerando o valor mediano, mínimo e máximo, com  $p < 0,05$  sendo considerado significativo.

#### 4 ARTIGO 1 – CIRCULATING LEVELS OF GALECTIN-1 AND GALECTIN-9 AS POTENTIAL BIOMARKERS FOR GASTRIC ADENOCARCINOMA

Maria de Fátima Deodato de Souza<sup>1</sup>; José André Camelo de Alcantara<sup>1</sup>; Michael Williams Leal Quirino<sup>1</sup>; Antônio Felix da Silva Filho<sup>2</sup>; Luiz Alberto Mattos<sup>3</sup>; Mário Rino Martins<sup>4</sup>; Michelly Cristiny Pereira<sup>1</sup>; Maira Galdino da Rocha Pitta<sup>1</sup>; Luiza Rayanna Amorim de Lima<sup>5</sup>; Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo<sup>1</sup>.

1. Research Center for Therapeutic Innovation Suely Galdino - NUPIT SG, Federal University of Pernambuco, Recife - PE- Brazil.
2. Department of Dentistry, University of Pernambuco (UPE) - Arcoverde *Campus*, PE, Brazil.
3. Clinical Hospital, Federal University of Pernambuco HC / UFPE, Recife - PE - Brazil.
4. Society of Pernambuco Against the Cancer (SPCC), Recife - PE - Brazil.
5. Postgraduate Program in Health and Social and Environmental Development, University of Pernambuco Garanhuns *Campus*, PE, Brazil.

Correspondence: Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo  
Research Center for Therapeutic Innovation Suely Galdino (NUPIT-SG), Federal University of Pernambuco, Av. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, Recife, PE 50670-901, Brazil. E-mail: Moacyr.rego@ufpe.br

**Conflict of interest:** The authors declare no conflict of interest.

#### ABSTRACT

**Background:** Gastric cancer (GC) is often detected in advanced tumor stages, with an unfavorable prediction. Markers available in the clinic routine do not present precise diagnostic accuracy to assist in diagnosis or therapeutic management. In this work, we studied Galectin-1 (Gal-1), identified as an important molecule in the progression of GC, and Galectin-9 (GAL-9) a lectin that plays a role in immune response, apoptosis, cell proliferation and cell death.

**Objective:** The aim was to evaluate the circulating levels of Gal-1 and Gal-9 and their clinical relevance in patients with GC.

**Methods:** A total of sixty-nine patients with GC and sixty-seven age and gender matched healthy subjects were analyzed in the study. Circulating Gal-1 and Gal-9 were quantified by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Receiver operating characteristics (ROC) were calculated to assess diagnostic accuracy.

**Results:** The analyzes revealed that the levels of Gal-1 founded in GC patients were 25507 pg/ml (2070 - 114040 pg/ml) significantly higher than the levels founded in the control group 4290 pg/ml (156.3 - 34265 pg/ml) ( $p < 0.0001$ ). Furthermore, there was a significant association between angiolymphatic invasion and Gal-1 levels ( $p = 0.0496$ ). The cut-off concentrations for Gal-1 to distinguish GC patients from the control group was 22935 pg/ml (sensitivity 61.90%, specificity 96.08%, LR: 15.79) (AUC: 0.9153,  $p < 0.0001$ ). Circulating Gal-9 levels were significantly higher in patients 7780 pg/ml (697.2 - 16906 pg/ml) than in the control group 3365 pg/ml (46.88 - 6097 pg/ml) ( $p < 0.0001$ ). In patients, elevated circulating levels of Gal-9 were higher in males ( $p = 0.0033$ ), in individuals older than 60 years ( $p = 0.0158$ ), it was associated with histological grade I ( $p = 0.0013$ ), and with partial gastrectomy ( $p = 0.0497$ ). Additionally, Gal-9 was moderately correlated with the patients' absolute number of neutrophils ( $r = 0.4228$ ;  $p = 0.0053$ ). According to the accuracy analyses, Gal-9 levels were efficient in distinguishing patients with GC from the control group (AUC: 0.9414;  $p < 0.0001$ ).

**Conclusion:** Taken together, our data indicate that Gal-1 and Gal-9 may be useful biological markers to distinguish gastric cancer from healthy individuals.

**Keywords:** Stomach cancer; accuracy; ELISA; galectin; biological marker.

## INTRODUCTION

Gastric cancer (GC) is a commonly diagnosed malignancy and one of the leading causes of mortality worldwide (TANG et al., 2021; YUSEFI et al., 2018). Its incidence varies widely according to different geographic and socioeconomic regions, being more frequent in men than in women, in most cases after 60 years old (PETRYSZYN; CHAPELLE; MATYSIAK-BUDNIK, 2020). Gastric adenocarcinoma is the most common histological subtype, representing approximately 95% of malignant gastric neoplasms. Lymphomas, leiomyosarcoma, gastrointestinal stromal tumors (GIST) and neuroendocrine tumors correspond to a small percentage of GC (ABDI et al., 2019; AJANI et al., 2017; BALAKRISHNAN et al., 2017; MACHLOWSKA et al., 2020).

GC diagnosed patients present a low overall survival that could be explained by a later detection and a limited prediction from clinical markers. In clinical practice, diagnosis and prognosis of the disease are aided by the measurement of circulating tumor markers, including carcinoembryonic antigens CEA, carbohydrate antigen CA19-9 and CA72-4.

However, these markers do not show high accuracy, mainly in the early stages of gastric cancer (SHIMADA et al., 2014). Thus, the diagnosis is based on digestive endoscopy and biopsy (NECULA et al., 2019; ZHOU et al., 2020). However, this procedure relies on the skill of the professional, is invasive and expensive, and causes the patients discomfort and anxiety (WU et al., 2019).

Galectins are a family of fifteen lectins with an affinity for glycans containing  $\beta$ -galactosides (CHEVALIER; PANDIT; MARTIN-SALDA, 2022). The binding capacity of these molecules is mediated by one or two carbohydrate recognition domains (CRDs) (GIOVANNONE et al., 2018; MANERO-RUPÉREZ et al., 2020; RAPOPORT; BOVIN, 2015). Faced with a functional diversity, dysfunction or altered expression of these molecules has often been associated with pathological conditions, including cancer (THIJSSSEN et al., 2015).

Galectin-1 (Gal-1) is encoded by the LGALS1 gene and is characterized by a high affinity for glycans containing  $\beta$ -galactosides. This lectin is secreted by cells and has the ability to bind and cross-link glycoconjugates on cell surfaces. Consequently, Gal-1 contributes to different events associated with cancer biology, including tumor transformation, cell cycle regulation, apoptosis, cell adhesion, migration, and inflammation and the breakdown of immune surveillance. Increased Gal-1 expression has been associated with a poor prognosis in patients with GC (BACIGALUPO; CARABIAS; TRONCOSO, 2017; GOUD; BHATTACHARYA, 2021; LONG et al., 2018; YOU et al., 2018, 2021).

Galectin-9 (Gal-9) is encoded by the LGALS9 gene and it is secreted through a nonclassical pathway and can be found in either the cytoplasm or the extracellular matrix. Gal-9 can bind several receptors and consequently form multivalent networks (DAPAT et al., 2017; MOAR; TANDON, 2021; WADOWIAK et al., 2018; WIERSMA et al., 2011; YANG et al., 2021). Among the receptors reported for Gal-9 are protein disulfide isomerase (PDI), CD44, CD137, TIM-3, and IgE (MOTAMEDI et al., 2019). Gal-9 is a protein that plays important roles in the immune response, apoptosis, proliferation and cell death (YANG et al., 2014b). In the tumor context, specifically in some tumors of the gastrointestinal tract such as hepatocellular carcinoma, cholangiocarcinoma, gallbladder carcinoma, and gastric cancer, Gal-9 suppresses cell proliferation and tumor growth (TADOKORO et al., 2017).

Based on these informations, the aim of the study was to evaluate circulating levels of Gal-1 and Gal-9 in patients with GC, to investigate its potential value as a diagnostic and/or prognostic biomarker.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Study Population**

Peripheral blood samples were obtained from patients with a confirmed diagnosis of gastric adenocarcinoma at the Clinical Hospital, Federal University of Pernambuco (HC/UFPE), and at the Society of Pernambuco Against Cancer (SPCC), Brazil. Collections were carried out in the period from the diagnosis to the treatment, from 2014 to 2021, and conserved frozen at -80 °C. Demographic, clinical-pathological, and hematological data were collected from hospital records. A total of 69 samples were obtained from the patients at the time of the primary diagnosis before any therapeutic intervention. The control group consisted of 67 gender and age paired healthy subjects without inflammatory diseases and who did not use immunomodulatory drugs. To be included in the study, all subjects signed an informed consent form. The study is approved by the research ethics committee of the HC/UFPE seen no. 3.083.401 and SPCC no. 3.780.389.

### **Measurement of Galectin-1 and Galectin-9**

Circulating levels of Galectin-1 and galectin-9 were quantified by sandwich Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), according to the manufacturer's recommendation (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA). The detection limits for Galectin-1 and Galectin-9 were 312.5 pg/ml and 46.87 pg/ml, respectively.

### **Validation Cohort**

Quantitative data on LGALS1 and LGALS9 mRNA expression were extracted from the cBioPortal for Cancer Genomics platform (<http://www.cbioportal.org>) (CERAMI et al., 2012; GAO et al., 2013). The study selected for analysis was the Stomach Adenocarcinoma cohort (TCGA, Firehose Legacy) (415 samples) assessed by RNA-seq. Briefly, the LGALS1 and LGALS9 mRNA expression value was compared with clinical pathological data available in the study cohort.

## Statistical Analysis

Statistical analysis was performed through GraphPad Prism software version 6.01. The non-parametric Mann-Whitney test was used for two-group comparisons and Kruskal-Wallis for multiple comparisons. Pearson's test ( $r$ ) was used to analyze the correlation between circulating levels of Gal-1 and Gal-9 with clinical and hematological parameters. Correlations were defined as weak, moderate, and strong when  $R < 0.40$ ,  $R = 0.40 - 0.60$ , and  $R > 0.60$ , respectively. Statistical associations of the validation cohort were performed using Fisher's Exact test.

Receiver-operating characteristic (ROC) was plotted to establish the cut-off value for circulating levels of Gal-1 and Gal-9 that corresponded to the best percentage of sensitivity and specificity. The area under ROC curves (AUC) was calculated to analyze the diagnostic accuracy of Gal-1 and Gal-9 in patients with GC, with a 95% confidence interval (95% CI). The results were expressed as median value, minimum and maximum.  $p \leq 0.05$  was considered significant.

## RESULTS

### Patients with GC have higher circulating Gal-1 and Gal-9 than healthy subjects

A total of 63 patients with GC were analyzed for Gal-1 (19 female, 44 male; mean age 61.8, range 28-82). The control group was formed by 51 healthy subjects (24 female, 27 male; mean age 60.0 years, range 41-87). Patients and controls were paired by gender ( $p = 0.0642$ ) and age ( $p = 0.0552$ ).

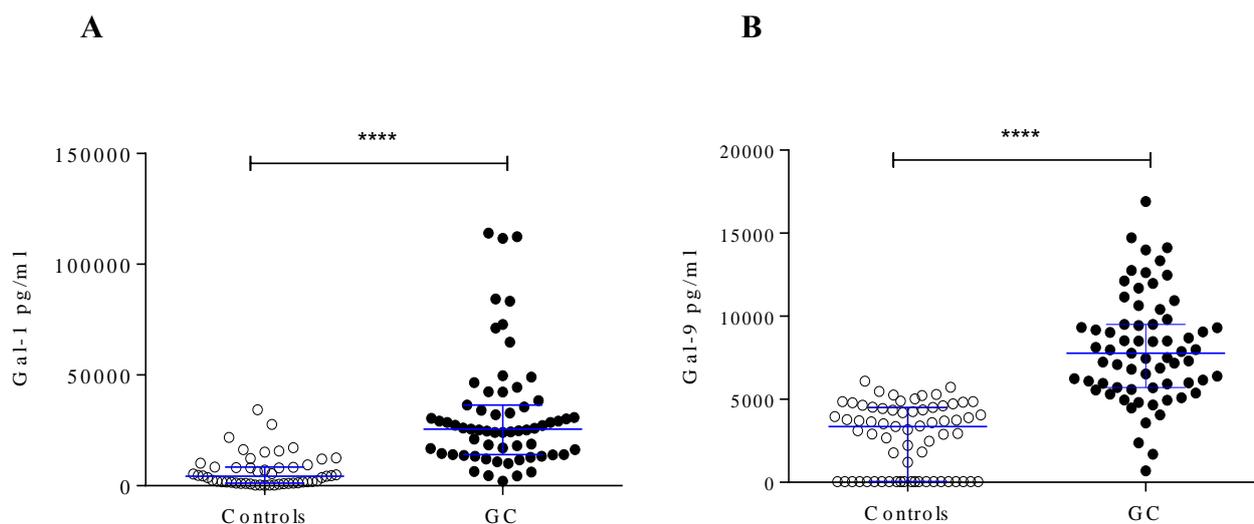
For Gal-9, 67 GC diagnosed patients were evaluated (21 female, 46 male; mean age 61.0,  $\pm$  28-82). 67 healthy subjects (23 female, 44 male; mean age 60.0 years,  $\pm$  28-87) were included as controls. As for Gal-1, in this analysis patients and controls were also paired by gender ( $p = 0.7129$ ) and age ( $p = 0.5588$ ). The clinical-demographic characteristics of the patients are described in Table 1.

**Table 1.** Clinical-demographic characteristics of the GC patients.

<b>Characteristics</b>	<b>No of patients (%) = 69</b>
<b>Age (mean, range)</b>	61.3, 28 – 82
<b>Gender</b>	
Female	21 (30.4)
Male	48 (69.6)
<b>Race</b>	
Black	1 (2)
White	8 (15.7)
Brown	42 (82.3)
<b>Smoking</b>	
Yes	8 (12.1)
No	28 (42.4)
Ex	30 (45.5)
<b>Alcoholism</b>	
Yes	11 (17.5)
No	26 (41.3)
Ex	26 (41.3)

Gal-1 and Gal-9 circulating levels were significantly higher in GC patients than in the control subjects. The median quantifications for Gal-1 were GC patients = 25507 pg/ml; 2070 - 114040 pg/ml and controls = 4290 pg/ml; 156.3 - 34265 pg/ml, with  $p < 0.0001$  (Figure 1A). Already the median expression of Gal-9 were GC patients = 7780 pg/ml; 697.2 - 16906 pg/ml and controls = 3365 pg/ml; 46.88 - 6097 pg/ml, with  $p < 0.0001$  (Figure 1B). Gal-1 and Gal-9 levels were similar in serum and plasma samples from patients with GC (supplementary file).

**Figure 1.** Concentrations of circulating Galectina-1 (Gal-1) in samples from control group and patients with gastric cancer (GC). \*\*\*\* indicates  $p < 0.0001$ . Line at blue: median with interquartile range (A), and concentrations of circulating Galectin-9 (Gal-9) in samples from control group and patients with gastric cancer (GC). \*\*\*\* indicates  $p < 0.0001$ . Line at blue: median with interquartile range (B).



### Circulating Gal-1 and Gal-9 is associated with clinical-pathological parameter in GC patients

We investigated whether circulating levels of Gal-1 and Gal-9 were associated with clinical-pathological parameters. There was a significant association between angiolymphatic invasion and Gal-1 levels ( $p = 0.0496$ ). Nonetheless, there was no association or correlation with the other parameters analyzed (gender, age, smoking, alcoholism, tumor location, staging (TNM), histological grade, initial treatment, type of surgery, chemotherapy, radiotherapy, and node ratio) (supplementary file).

In counterpart, Gal-9 levels were higher in male patients ( $p = 0.0033$ ) than female ones. An association was also demonstrated with patients aged over 60 years ( $p = 0.0158$ ) compared to younger patients. Gal-9 was also higher in patients diagnosed with well-differentiated tumors ( $p = 0.0013$ ) and those who underwent a partial gastrectomy ( $p =$

0.0497) in comparison to the respective opposite situations. The other analyzed parameters (smoking, alcohol consumption, tumor location, staging (TNM), initial treatment, chemotherapy, radiotherapy, angiolymphatic invasion and radio node) showed no statistically significant difference (Table 2).

**Table 2.** Associations and correlations between circulating levels of Galectin-9 (Gal-9) and clinical-pathological parameters in 67 patients with gastric cancer (GC).

<b>Gender</b> <sup>1</sup>			
Female	21 (31.3)	6524 (697.2 - 14718)	<b>0.0033</b> <sup>a</sup>
Male	46 (68.7)	8519 (1690 - 16906)	
<b>Age (years)</b> <sup>2</sup>			
< 60	25 (37.9)	6805 (697.2 - 12118)	<b>0.0158</b> <sup>a</sup>
≥ 60	41 (62.1)	8511 (1690 - 16906)	
<b>Smoking</b> <sup>3</sup>			
Yes	7 (10.9)	7174 (1690 - 9511)	0.6682 <sup>b</sup>
No	27 (42.2)	7511 (2381 - 14118)	
Ex	30 (46.9)	7933 (697.2 - 16906)	
<b>Alcoholism</b> <sup>4</sup>			
Yes	11 (17.7)	8124 (5711 - 12755)	0.9521 <sup>b</sup>
No	26 (41.9)	7749 (2381 - 16906)	
Ex	25 (40.3)	7880 (697.2 - 14718)	
<b>Tumor Location</b> <sup>5</sup>			
Antrum	28 (58.3)	8227 (697.2 - 14118)	0.7681 <sup>b</sup>
Body	18 (37.5)	8864 (4051 - 16906)	
Antrum/Body	2 (4.2)	7061 (5999 - 8124)	
<b>Staging (TNM)</b> <sup>6</sup>			
I	5 (20.8)	9324 (3574 - 12480)	0.8359 <sup>b</sup>
II	5 (20.8)	9174 (5305 - 14718)	
III	8 (33.3)	7055 (5999 - 12630)	
IV	6 (25)	8483 (5918 - 13346)	
<b>Histological Grade</b> <sup>7</sup>			
GI	15 (23.8)	9174 (6805 - 14118)	<b>0.0013</b> <sup>b</sup>
GII	15 (23.8)	7880 (4479 - 12630)	
GIII	33 (52.4)	6236 (697.2 - 16906)	
<b>Initial Treatment</b> <sup>8</sup>			
Surgery	41 (83.7)	7982 (697.2 - 14118)	0.9678 <sup>a</sup>
Chemotherapy	8 (16.3)	7646 (4479 - 14718)	
<b>Type of Surgery</b> <sup>9</sup>			
Gastrectomy Partial	28 (65.1)	8612 (3574 - 14718)	<b>0.0497</b> <sup>a</sup>
Gastrectomy Total	15 (34.9)	6393 (697.2 - 12755)	
<b>Chemotherapy</b> <sup>10</sup>			
Yes	31 (75.6)	8468 (2381 - 14718)	0.6472 <sup>a</sup>
No	10 (24.4)	9102 (3574 - 12755)	
<b>Radiotherapy</b> <sup>11</sup>			
Yes	4 (19)	7708 (5305 - 12630)	0.7515 <sup>a</sup>
No	17 (81)	9030 (3574 - 14718)	

<b>Angiolymphatic Invasion</b> <sup>12</sup>			
Yes	6 (40)	7055 (5918 - 12630)	> 0.9999 <sup>a</sup>
No	9 (60)	7986 (3574 - 12480)	
<b>Node Ratio</b> <sup>13</sup>	21 (100)	-	0.7423 <sup>c</sup> <i>r</i> = -0.07633

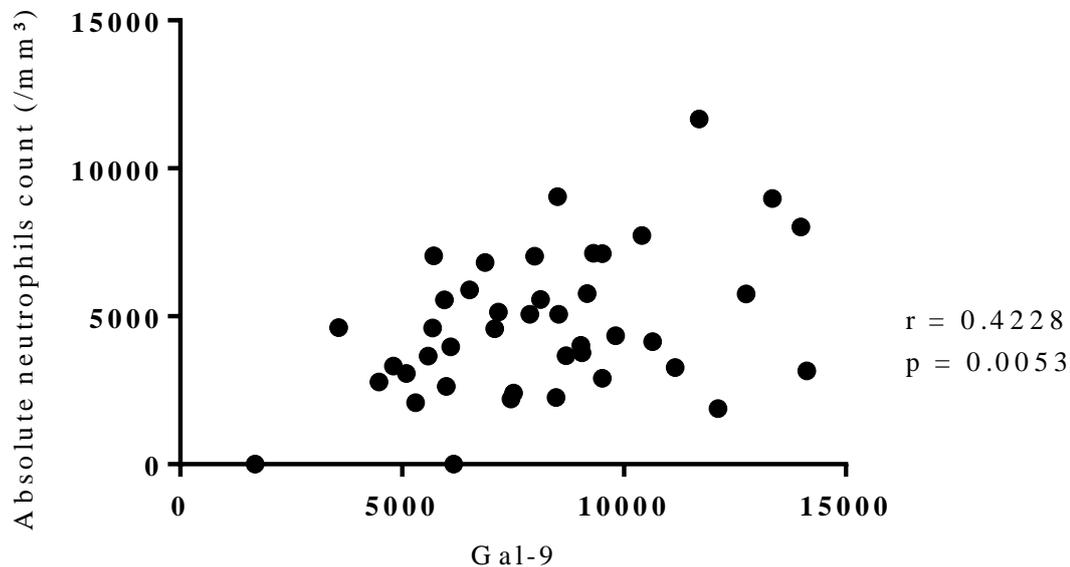
---

a) Mann-Whitney, b) Kruskal-Wallis, c) Pearson's.

### **Gal-9 is correlated to the number of neutrophils in GC patients**

Circulating Gal-1 and Gal-9 were also investigated about to hematological parameters. Correlations regarding absolute values of hemoglobin, hematocrit, leukocytes, neutrophils, lymphocytes, platelets, neutrophil/lymphocyte index, and circulating levels of Gal-1 were not statistically significant ( $p > 0.05$ ) (supplementary file). Nonetheless, Pearson's analysis demonstrated a moderate positive correlation between Gal-9 and the absolute number of neutrophils ( $r = 0.4228$ ,  $p = 0.0053$ ) shown in Figure 2. Additional analyzes regarding the percentage of hematocrit and leukocyte, lymphocyte, and platelet concentrations showed no significant correlation ( $p < 0.05$ ) (supplementary file).

**Figure 2.** Correlation between circulating levels of Galectin-9 (Gal-9) and absolute neutrophils in patients with gastric cancer (GC).



**LGALS1 and LGALS9 mRNA expression from the validation cohort were not associated with clinical-pathological parameters in patients with GC**

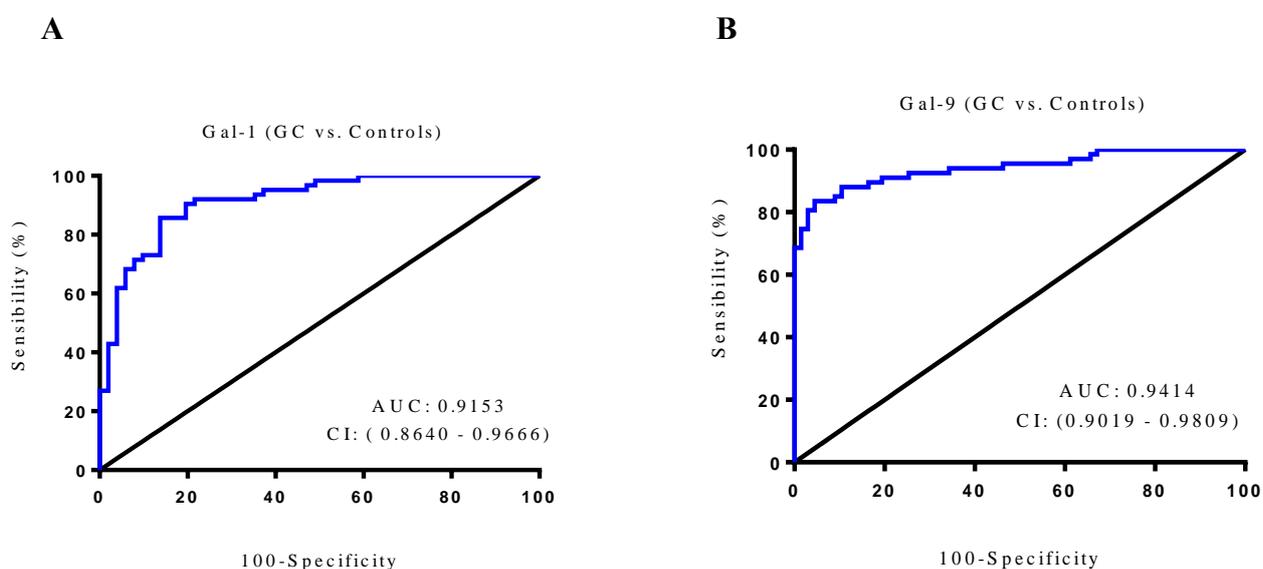
To investigate the association between LGALS1(Galectin-1) and LGALS9 (Galectin-9) mRNA and the clinical-pathological parameters, we evaluated the information on the average of mRNA expression from 415 samples deposited in The Cancer Genome Atlas (TCGA), Firehose Legacy database. There was no statistically significant correlation between LGALS1 and LGALS9 mRNA expression and the parameters analyzed (age, gender, surgical staging, nodal invasion, histological grade, Lauren classification, radiotherapy and *H. Pylori* infection) ( $p < 0.05$ ) (supplementary file).

### Circulating levels of Gal-1 and Gal-9 discriminate GC patients from healthy subjects

To assess the diagnostic value of circulating Gal-1 and Gal-9 in patients with GC, we evaluated some measures of accuracy. As for Gal-1, the AUC of the ROC curve was 0.9153 (CI: 0.8640 - 0.9666) ( $p < 0.0001$ ) (Figure 3A). The cut-off point of 22935 pg/ml corresponded to a sensitivity of 61.90%, specificity of 96.08%, and a positive likelihood ratio (LR+) of 15.79. The positive likelihood ratio value indicates a 15.79% increase in the chance of this malignancy if the test is positive.

For Gal-9, the AUC of the ROC curve was 0.9414 (0.9019 - 0.9809) ( $p < 0.0001$ ) (Figure 3B). The cut-off point of 5517 pg/ml corresponded to a sensitivity of 80.60%, a specificity of 97.01%, and a positive likelihood ratio (LR+) of 27.00. The positive likelihood ratio value indicates a 27.00% increase in the chance of this malignancy if the test is positive. Thus, both indicate excellent diagnostic performance.

**Figure 3.** Receiver operating characteristic (ROC) curve demonstrating the sensitivity and specificity of circulating levels of Gal-1 to discriminate patients with gastric cancer (GC) from control group (A). Receiver operating characteristic (ROC) curve demonstrating the sensitivity and specificity of circulating levels of Gal-9 to discriminate patients with gastric cancer (GC) from control group (B). AUC: area under the curve. CI: confidence interval.



## DISCUSSION

Our results demonstrate, that GC patients have high circulating levels of Gal-1 and precision measures were capable of discriminating patients diagnosed with GC from healthy individuals. In this regard, the identification of serum tumor Gal-1 in the diagnosis of GC is more favorable than other approaches (FENG et al., 2017). To date, the role of Gal-1 in the GC is not yet fully elucidated, but literature has reported that Gal-1 makes a crucial contribution to its pathogenesis (CHONG et al., 2016; YOU et al., 2018, YOU et al., 2019), promoting the inflammatory process and stimulating VEGF expression (ROSSI et al., 2014; TANG et al., 2016).

Bacigalupo and collaborators (2017) described that Gal-1 is drastically regulated upwards in some tumors of the gastrointestinal tract, such as gastric cancer, colorectal cancer, pancreatic ductal adenocarcinoma and hepatocellular carcinoma. In these tumors, Gal-1 favors development, aggressiveness, metastasis, immunosuppression and tumor angiogenesis (BACIGALUPO; CARABIAS; TRONCOSO, 2017). According to You et al. (2019) Gal-1 upregulation promotes GC progression through the formation of vasculogenic mimicry (VM), activating the epithelial-mesenchymal transition (EMT) (YOU et al., 2019).

As for Gal-9, in the present study, we demonstrated that high levels of Gal-9 in the peripheral blood of patients with GC are associated with gender, age, and histological grade, as well as correlated with the absolute number of neutrophils. Furthermore, we found promising discriminatory values for the GC.

Thus, our data provide prognostic information, especially by revealing an association of circulating levels of Gal-9 with well-differentiated histological grade about moderately and poorly differentiated tumors. Apparently, the increase in Gal-9 in the less aggressive cellular profile reflects a favorable prognosis.

Additionally, we observed a positive correlation between circulating levels of Gal-9 and the absolute amount of patient neutrophils. In line with this finding, Avtenyuk and collaborators (2022) reported that Gal-9 was able to trigger neutrophil-mediated anticancer immune responses (AVTENYUK et al., 2022).

In agreement with our reports of increased Gal-9 in patients with GC, Jiang and colleagues demonstrated an increase in tissue expression of Gal-9 in GC compared to normal mucosa (JIANG et al., 2013). In contrast, Yang and colleagues reported a significant reduction in Gal-9 mRNA expression in GC tissues (YANG et al., 2014b). In

this context, Gal-9 seems to suppress proliferation by inducing apoptosis in human gastric cancer cells (TAKANO et al., 2016). However, the available data for GC is still incipient and sometimes divergent.

In the analysis of the validation cohort, we did not observe a significant association between the clinical and pathological characteristics and the expression data of the LGALS1 mRNA, similar to the data obtained in the analysis of the circulating levels of this protein, except for the angiolymphatic invasion, which was associated only with protein expression.

Similarly, the expression of Gal-9 mRNA also extracted from the validation cohort showed no statistically significant association with the clinical-pathological parameters analyzed. In this context, the non-statistical significance can be related to the difference in the sample number of the cohorts, as well as the difference in the nature of the analyzed samples. In our study, we investigated the protein expression in the patient's serum and plasma while the validation cohort analyzed the mRNA expression.

The antigens CEA, CA19-9, and CA72-4 were often used to assist in the diagnosis and follow-up of GC, as well as in the diagnosis of liver, colorectal, and pancreatic cancers. In addition, some benign gastric diseases also have altered levels of CEA and CA19-9, which makes them limiting. However, in stomach cancer, these markers are best used as prognostic indicators to predict the effectiveness of chemotherapy and in post-surgical follow-up (LIANG et al., 2016; YCHOU et al., 2000).

In front of the questionable sensibility and specificity of the conventional serum markers, Liang and colleagues assessed the clinical significance of the tumor markers used for GC. As expected, the molecules showed poor AUC, sensitivity and specificity CEA (0.712, 20.10%, 94.70%), CA19.9 (0.585, 21.40%, 96.20%), and CA72.4 (0.722, 27.60%, 85.10%) (LIANG et al., 2016). Another study, also using normal cutoff values, demonstrated sensitivity and specificity of (CEA = 25.5%, 97.9%), (CA19-9 = 38.7%, 92.6%), (CA72-4 = 33.0%, 94.0%) (YANG et al., 2014a). In relation to these markers, our study demonstrated that both Gal-1 and Gal-9 perform better in predicting the occurrence of GC.

Similar to our study, circulating levels of Gal-9 in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) were statistically higher compared to healthy controls (SEIFERT et al., 2020; TAVARES et al., 2018). According to Seifert et al., Gal-9 was able to discriminate PDAC from healthy individuals (AUC = 0.776) (SEIFERT et al.,

2020). However, the AUC plotted for the GC was numerically higher (AUC = 0.9414), and our data express greater diagnostic assertiveness.

We emphasize that our study has some limitations to be considered. To increase the statistical reliability of the results obtained, it is necessary to increase the sample size. In addition, there is a need to monitor the different tumor stages of these patients to demonstrate the patterns of Gal-1 and Gal-9 expression during the progression of this malignancy. As well as to evaluate the performance of Gal-1 and Gal-9 associated with conventional markers, which would make it possible to create a diagnostic panel for the GC.

However, our data are foreshadowing and connote important findings capable of supporting future studies on the clinical value of Gal-1 and Gal-9 as minimally invasive biomarker for GC.

## **CONCLUSION**

Our data show that high levels so much Gal-1 how much Gal-9 present efficient variables to discriminate patients with gastric adenocarcinoma from healthy individuals. Furthermore, Gal-9 is a potential early diagnostic and prognostic biomarker for this malignancy. These data may stimulate further investigations to designate these molecules as biological markers.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

We thank the volunteers agreed to participate in the study. We are also grateful to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and the Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) for financial support.

**REFERENCES**

- ABDI, E. et al. Risk factors predisposing to cardia gastric adenocarcinoma: Insights and new perspectives. **Cancer Medicine**, v. 8, n. 13, p. 6114–6126, 2019.
- AJANI, J. A. et al. Gastric adenocarcinoma. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, 2017.
- AVTENYUK, N. U. et al. Galectin-9 Triggers Neutrophil-Mediated Anticancer Immunity. **Biomedicines**, v. 10, n. 1, 2022.
- BACIGALUPO, M. L.; CARABIAS, P.; TRONCOSO, M. F. Contribution of galectin-1, a glycan-binding protein, to gastrointestinal tumor progression. **World Journal of Gastroenterology**, v. 23, n. 29, p. 5266–5281, 2017.
- BALAKRISHNAN, M. et al. Changing Trends in Stomach Cancer Throughout the World. **Current Gastroenterology Reports** volume, 2017.
- CERAMI, E. et al. The cBio Cancer Genomics Portal: An open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. **Cancer Discovery**, v. 2, n. 5, p. 401–404, 2012.
- CHEVALIER, M. T.; PANDIT, A.; MARTIN-SALDA, S. Biomaterials Therapeutic potential of targeting galectins – A biomaterials-focused perspective. **Biomaterials**, v. 286, n. December 2021, 2022.
- CHONG, Y. et al. Galectin-1 induces invasion and the epithelial-mesenchymal transition in human gastric cancer cells via non-canonical activation of the hedgehog signaling pathway. **Oncotarget**, v. 7, n. 50, p. 83611–83626, 2016.
- DAPAT, I. C. et al. Secretion of galectin-9 as a DAMP during dengue virus infection in THP-1 cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 8, 2017.
- FENG, F. et al. Diagnostic and prognostic value of CEA, CA19-9, AFP and CA125 for early gastric cancer. **BMC Cancer**, v. 17, n. 1, p. 1–6, 2017.
- GAO, J. et al. Integrative Analysis of Complex Cancer Genomics and Clinical Profiles Using the cBioPortal. **Science Signaling**, v. 6, n. 269, p. 1–20, 2013.
- GIOVANNONE, N. et al. Galectin-Glycan Interactions as Regulators of B Cell Immunity. **Frontiers in immunology**, v. 9, n. December, p. 2839, 2018.
- GOUD, N. S.; BHATTACHARYA, A. Human Galectin-1 in Multiple Cancers: A Privileged Molecular Target in Oncology. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 15, 2021.

- JIANG, J. et al. Decreased Galectin-9 and increased Tim-3 expression are related to poor prognosis in gastric cancer. **PLoS ONE**, v. 8, n. 12, 2013.
- LIANG, Y. et al. Clinical significance and diagnostic value of serum CEA, CA19-9 and CA72-4 in patients with gastric cancer. **Oncotarget**, v. 7, n. 31, p. 49565–49573, 2016.
- LONG, B. et al. Clinical characteristics and prognostic significance of galectins for patients with gastric cancer: A meta-analysis. **International Journal of Surgery**, v. 56, p. 242–249, 2018.
- MACHLOWSKA, J. et al. Gastric cancer: Epidemiology, risk factors, classification, genomic characteristics and treatment strategies. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 11, 2020.
- MANERO-RUPÉREZ, N. et al. The Galectin Family as Molecular Targets: Hopes for Defeating Pancreatic Cancer. **Cells**, v. 9, n. 3, p. 689, 2020.
- MOAR, P.; TANDON, R. Galectin-9 as a biomarker of disease severity. **Cellular Immunology**, v. 361, n. January, p. 104287, 2021.
- MOTAMEDI, M. et al. Galectin-9 Expression Defines a Subpopulation of NK Cells with Impaired Cytotoxic Effector Molecules but Enhanced IFN- $\gamma$  Production, Dichotomous to TIGIT, in HIV-1 Infection. **ImmunoHorizons**, v. 3, n. 11, p. 531–546, 2019.
- NECULA, L. et al. Recent advances in gastric cancer early diagnosis. **World Journal of Gastroenterology**, v. 25, n. 17, p. 2029–2044, 2019.
- PETRYSZYN, P.; CHAPELLE, N.; MATYSIAK-BUDNIK, T. Gastric Cancer: Where Are We Heading? **Digestive Diseases**, v. 38, n. 4, p. 280–285, 2020.
- RAPOPORT, E. M.; BOVIN, N. V. Specificity of human galectins on cell surfaces. **Biochemistry (Moscow)**, v. 80, n. 7, p. 846–856, 2015.
- ROSSI, A. F. T. et al. Deregulation of annexin-A1 and galectin-1 expression in precancerous gastric lesions: Intestinal metaplasia and gastric ulcer. **Mediators of Inflammation**, v. 2014, 2014.
- SEIFERT, A. M. et al. Detection of pancreatic ductal adenocarcinoma with galectin-9 serum levels. **Oncogene**, v. 39, n. 15, p. 3102–3113, 2020.
- SHIMADA, H. et al. Clinical significance of serum tumor markers for gastric cancer: A systematic review of literature by the Task Force of the Japanese Gastric Cancer Association. **Gastric Cancer**, v. 17, n. 1, p. 26–33, 2014.
- TADOKORO, T. et al. Induction of apoptosis by Galectin-9 in liver metastatic cancer cells: In vitro study. **International Journal of Oncology**, v. 51, n. 2, p. 607–614, 2017.

- TAKANO, J. et al. Galectin-9 suppresses the proliferation of gastric cancer cells in vitro. **Oncology Reports**, v. 35, n. 2, p. 851–860, 2016.
- TANG, D. et al. Cancer-associated fibroblasts promote angiogenesis in gastric cancer through galectin-1 expression. **Tumor Biology**, v. 37, n. 2, p. 1889–1899, 2016.
- TANG, X. H. et al. Exosome-derived noncoding RNAs in gastric cancer: functions and clinical applications. **Molecular Cancer**, v. 20, n. 1, p. 1–15, 2021.
- TAVARES, L. B. et al. Patients With Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Have High Serum Galectin-9 Levels: A Sweet Molecule to Keep an Eye On. **Pancreas**, v. 47, n. 9, p. 59–60, 2018.
- THIJSEN, V. L. et al. Galectin expression in cancer diagnosis and prognosis: A systematic review. **Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer**, v. 1855, n. 2, p. 235–247, 2015.
- WDOWIAK, K. et al. Galectin targeted therapy in oncology: Current knowledge and perspectives. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 1, p. 1–21, 2018.
- WIERSMA, V. R. et al. Therapeutic potential of Galectin-9 in human disease. **Medicinal Research Review**, p. 25, 2011.
- WU, D. et al. Serum biomarker panels for the diagnosis of gastric cancer. **Cancer Medicine**, v. 8, n. 4, p. 1576–1583, 2019.
- YANG, A. P. et al. CA72-4 combined with CEA, CA125 and CA19-9 improves the sensitivity for the early diagnosis of gastric cancer. **Clinica Chimica Acta**, v. 437, p. 183–186, 2014a.
- YANG, J. et al. Role of downregulation of galectin-9 in the tumorigenesis of gastric cancer. **International Journal of Oncology**, v. 45, n. 3, p. 1313–1320, 2014b.
- YANG, R. et al. Galectin-9 interacts with PD-1 and TIM-3 to regulate T cell death and is a target for cancer immunotherapy. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, 2021.
- YCHOU, M. et al. Clinical significance and prognostic value of CA72-4 compared with CEA and CA19-9 in patients with gastric cancer. **Disease Markers**, v. 16, n. 3–4, p. 105–110, 2000.
- YOU, X. et al. Galectin-1 promotes metastasis in gastric cancer through a sphingosine-1-phosphate receptor 1-dependent mechanism. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 51, n. 1, p. 11–30, 2018.
- YOU, X. et al. Galectin-1 promotes vasculogenic mimicry in gastric cancer by upregulating EMT signaling. **Journal of Cancer**, v. 10, n. 25, p. 6286–6297, 2019.
- YOU, X. et al. Fibroblastic galectin-1-fostered invasion and metastasis are mediated by

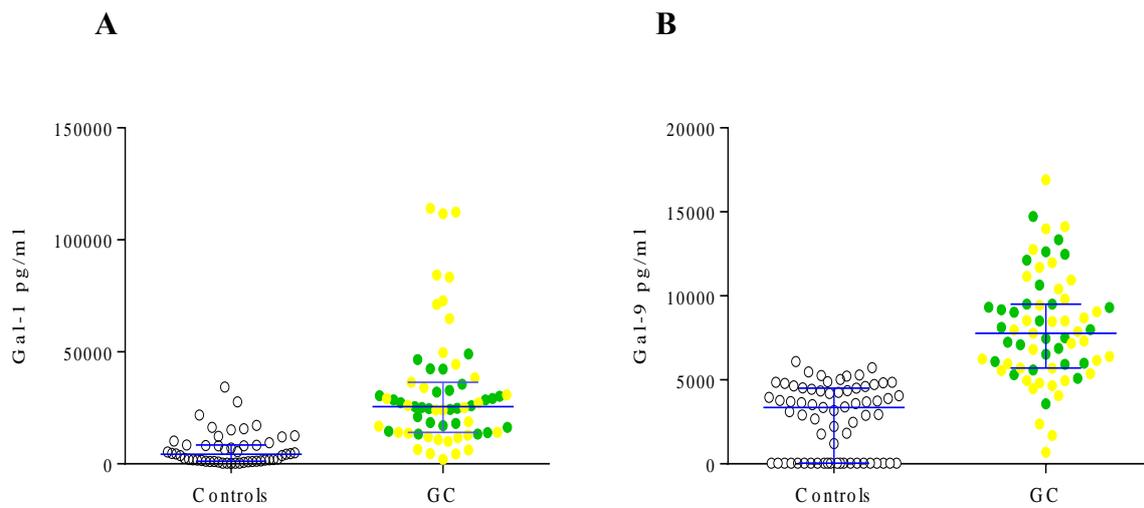
TGF- $\beta$ 1-induced epithelial-mesenchymal transition in gastric cancer. **Aging**, v. 13, n. 14, p. 18464–18481, 2021.

YUSEFI, A. R. et al. Risk factors for gastric cancer: A systematic review. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 19, n. 3, p. 591–603, 2018.

ZHOU, B. et al. Plasma proteomics-based identification of novel biomarkers in early gastric cancer. **Clinical Biochemistry**, v. 76, p. 5–10, 2020.

## Supplementary Materials

**Supplementary Figure 1.** There was no significant difference between the medians of Gal-1 in serum (yellow) and plasma (green) samples from patients with GC (A). There was no significant difference between the medians of Gal-9 in serum (yellow) and plasma (green) samples from patients with GC (B). Control = healthy subjects, GC = gastric cancer.



**Supplementary Table 1.** Associations and correlations between circulating levels of Galectin-1 (Gal-1) and clinical-pathological parameters in 67 patients with gastric cancer (GC).

Parameter	No. of patients (%)	Gal-1 Concentration (pg/ml)	<i>P</i> Value
<b>Gender</b> <sup>1</sup>			
Female	19 (30.2)	25240 (2070 - 111640)	0.7132 <sup>a</sup>
Male	44 (69.8)	25973 (4460 - 114040)	
<b>Age (years)</b> <sup>2</sup>			
< 60	21 (33.9)	28573 (6130 - 111640)	0.5425 <sup>a</sup>
≥ 60	41 (66.1)	24840 (2070 - 114040)	
<b>Smoking</b> <sup>3</sup>			
Yes	8 (13.3)	16240 (2070 - 49640)	0.3083 <sup>b</sup>
No	26 (43.3)	25707 (4505 - 112440)	
Ex	26 (43.3)	27307 (6130 - 114040)	
<b>Alcoholism</b> <sup>4</sup>			
Yes	11 (19.3)	29240 (10840 - 114040)	0.8176 <sup>b</sup>
No	23 (40.3)	24840 (2070 - 111640)	
Ex	23 (40.3)	25907(4460 - 112440)	
<b>Tumor Location</b> <sup>5</sup>			
Antrum	27 (60)	25240 (4505 - 114040)	0.3501 <sup>b</sup>
Body	16 (35.6)	24773 (11640 - 111640)	
Body/Antrum	2 (4.4)	36973 (27373 - 46573)	
<b>Staging (TNM)</b> <sup>6</sup>			
I	5 (20.8)	25240 (13907 - 32040)	0.0964 <sup>b</sup>
II	5 (20.8)	24307 (14573 - 24840)	
III	8 (33.3)	29507 (13373 - 42307)	
IV	6 (25)	19573 (13373 - 29240)	
<b>Histological Grade</b> <sup>7</sup>			
GI	15 (25.9)	24040 (6440 - 111640)	0.9907 <sup>b</sup>
GII	12 (20.7)	26707 (4505 - 72840)	
GIII	31 (53.4)	25907 (4460 - 84280)	
<b>Initial Treatment</b> <sup>8</sup>			
Surgery	36 (81.8)	25973 (6130 - 114040)	0.9823 <sup>a</sup>
Chemotherapy	8 (18.2)	26907 (4505 - 49640)	
<b>Type of Surgery</b> <sup>9</sup>			
Gastrectomy			0.3948 <sup>a</sup>
Partial	27 (67.5)	26040 (4505 - 83314)	
Total	13 (32.5)	28573 (6130 - 114040)	
<b>Chemotherapy</b> <sup>10</sup>			
Yes	26 (72.2)	26573 (4505 - 83314)	0.6326 <sup>a</sup>
No	10 (27.8)	24773 (13373 - 114040)	
<b>Radiotherapy</b> <sup>11</sup>			

Yes	4 (19)	23507 (13373 - 30173)	0.5300 <sup>a</sup>
No	17 (81)	25507 (13907 - 46573)	
<b>Angiolymphatic Invasion</b> <sup>12</sup>			
Yes	6 (40)	28907 (25907 - 32840)	<b>0.0496</b> <sup>a</sup>
No	9 (60)	24307 (13373 - 32040)	
<b>Node Ratio</b> <sup>13</sup>	21 (100)	-	0.3745 <sup>c</sup> <i>r</i> = 0.2042

a) Mann-Whitney, b) Kruskal-Wallis, c) Pearson's.

**Supplementary Table 2.** Correlations between circulating levels of Galectin-1 (Gal-1) and hematological parameters in patients with gastric cancer (GC).

Parameter	Correlation coefficient ( <i>r</i> )	p-value
<b>Hemoglobin (g/dL)</b> <sup>1</sup>	-0.2494	0.0807
<b>Hematocrit (%)</b> <sup>2</sup>	-0.4163	0.0965
<b>Leukocytes (/mm<sup>3</sup>)</b> <sup>3</sup>	0.05956	0.6876
<b>Neutrophils (/mm<sup>3</sup>)</b> <sup>4</sup>	0.1662	0.2927
<b>Lymphocytes (/mm<sup>3</sup>)</b> <sup>5</sup>	-0.2867	0.0692
<b>Platelets (/mm<sup>3</sup>)</b> <sup>6</sup>	0.08046	0.5993

1) Analyzed in 50 patients, 2) Analyzed in 17 patients, 3) Analyzed in 48 patients, 4) Analyzed in 42 patients, 5) Analyzed in 41 patients, 6) Analyzed in 45 patients.

**Supplementary Table 3.** Correlations between serum and plasma Gal-9 levels and hematological parameters in the GC.

<b>Parameter</b>	<b>Correlation coefficient (r)</b>	<b>p-value</b>
<b>Hemoglobin (g/dL)</b> <sup>1</sup>	0.05090	0.7201
<b>Hematocrit (%)</b> <sup>2</sup>	0.06258	0.8114
<b>Leukocytes (/mm<sup>3</sup>)</b> <sup>3</sup>	-0.04805	0.7404
<b>Lymphocytes (/mm<sup>3</sup>)</b> <sup>4</sup>	0.09119	0.5707
<b>Platelets (/mm<sup>3</sup>)</b> <sup>5</sup>	0.1208	0.4188

1) Analyzed in 52 patients, 2) Analyzed in 17 patients, 3) Analyzed in 50 patients, 4) Analyzed in 41 patients, 5) Analyzed in 47 patients.

**Supplementary Table 4.** Association between the expression value of (LGALS1) mRNA with the main clinical-pathological characteristics of patients with gastric cancer (GC).

<b>TCGA FIREHOSE LGALS1</b>			
<b>N = 415</b>			
<b>Clinical data</b>	<b>LGALS1 (+)</b>	<b>LGALS1 (-)</b>	<b>P</b>
	<b>n (%)</b>	<b>n (%)</b>	<b>Value</b>
<b>Age (years) <sup>1</sup></b>			
<60	75 (18.1)	47 (11.3)	0.6609
≥60	172 (41.4)	121 (29.2)	
<b>Gender <sup>2</sup></b>			
Female	90 (21.7)	57 (13.7)	0.6759
Male	157 (37.8)	111 (26.7)	
<b>Surgical Staging (TNM) <sup>3</sup></b>			
(I and II)	88 (22.6)	92 (23.6)	> 0.9999
(III and IV)	102 (26.1)	108 (27.7)	
<b>Nodal invasion <sup>4</sup></b>			
0	63 (16.9)	43 (11.6)	0.8154
>1	161 (43.4)	104 (28)	
<b>Histological Grade <sup>5</sup></b>			
GI + GII	90 (22.2)	70 (17.2)	0.2550
GIII	153 (37.7)	93 (22.9)	
<b>Lauren Classification <sup>6</sup></b>			
INTESTINAL	102 (41.6)	74 (30.2)	0.4042
DIFFUSE	44 (17.9)	25 (10.2)	
<b>Radiotherapy <sup>7</sup></b>			
YES	20 (9.7)	28 (13.7)	0.8678
NO	63 (30.7)	94 (45.9)	
<b>H. Pylori Infection <sup>8</sup></b>			
YES	8 (4.5)	12 (6.8)	0.6260
NO	54 (30.5)	103 (58.2)	

**Supplementary Table 5.** Association between the expression value of (LGALS9) mRNA with the main clinical-pathological characteristics of patients with gastric cancer (GC).

<b>TCGA FIREHOSE LGALS9</b>			
<b>N = 415</b>			
<b>Clinical data</b>	<b>LGALS9 (+)</b>	<b>LGALS9 (-)</b>	<b>P Value</b>
	<b>n (%)</b>	<b>n (%)</b>	
<b>Age (years) <sup>1</sup></b>			
<60	75 (18.1)	47 (11.3)	0.6609
≥60	172 (41.4)	121 (29.2)	
<b>Gender <sup>2</sup></b>			
Female	90 (21.7)	57 (13.7)	0.6759
Male	157 (37.8)	111 (26.7)	
<b>Surgical Staging (TNM) <sup>3</sup></b>			
(I and II)	87 (24.8)	54 (15.3)	0.50811
(III and IV)	122 (34.8)	88 (25.1)	
<b>Nodal invasion <sup>4</sup></b>			
0	90 (22.2)	70 (17.2)	0.7567
>1	153 (37.7)	93 (22.9)	
<b>Histological Grade <sup>5</sup></b>			
GI + GII	90 (22.2)	70 (17.2)	0.2550
GIII	153 (37.7)	93 (22.9)	
<b>Lauren Classification <sup>6</sup></b>			
INTESTINAL	102 (41.6)	74 (30.2)	0.4042
DIFFUSE	44 (18)	25 (10.2)	
<b>Radiotherapy <sup>7</sup></b>			
YES	26 (12.7)	22 (10.7)	0.7393
NO	91 (44.4)	66 (32.2)	
<b>H. Pylori Infection <sup>8</sup></b>			
YES	13 (7.3)	7 (4)	0.6369
NO	92 (52)	65 (36.7)	

## 5 ARTIGO 2 - EVALUATION OF GALECTIN-4 CIRCULATION LEVELS IN PATIENTS WITH GASTRIC ADENOCARCINOMA

Maria de Fátima Deodato de Souza<sup>1</sup>; Antônio Felix da Silva Filho<sup>2</sup>; Michelly Cristiny Pereira<sup>1</sup>; Luiza Rayanna Amorim de Lima<sup>3</sup>; Maira Galdino da Rocha Pitta<sup>1</sup>; Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo<sup>1</sup>.

1. Research Center for Therapeutic Innovation Suely Galdino - NUPIT SG, Federal University of Pernambuco, Recife - PE- Brazil.
2. Department of Dentistry, University of Pernambuco (UPE) - Arcoverde *Campus*, PE, Brazil.
3. Postgraduate Program in Health and Social and Environmental Development, University of Pernambuco Garanhuns *Campus*, PE, Brazil.

Correspondence: Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo

Research Center for Therapeutic Innovation Suely Galdino (NUPIT-SG), Federal University of Pernambuco, Av. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, Recife, PE 50670-901, Brazil. E-mail: Moacyr.rego@ufpe.br

**CONFLICT OF INTEREST:** None.

### **To the Editor:**

Gastric cancer (GC) is one of the leading causes of cancer-related death worldwide. Gastric adenocarcinoma comprises more than 90% of the malignant tumors that affect the stomach (1). The serum tumor markers, including carcinoembryonic antigens CEA, carbohydrate antigen CA19-9 and CA72-4 have not been used in the clinical practice, mainly because of their low of sensitivity and specificity (2).

Galectin-4 (Gal-4) is a tandem repeat member of  $\beta$ -galactoside binding proteins. As for its functionality, *in vitro* intracellular Gal-4 regulates cell proliferation, apoptosis and differentiation, while extracellular Gal-4 mediates adhesion. In addition to  $\beta$ -galactosides, this galectin also binds to antigens from human blood groups, glycoproteins, mucins such as the MUC1 membrane, glycosphingolipids and sulfated cholesterol. Thus,

affinity for these ligands can also give Gal-4 key roles in biochemical regulation and tumor development and progression (3).

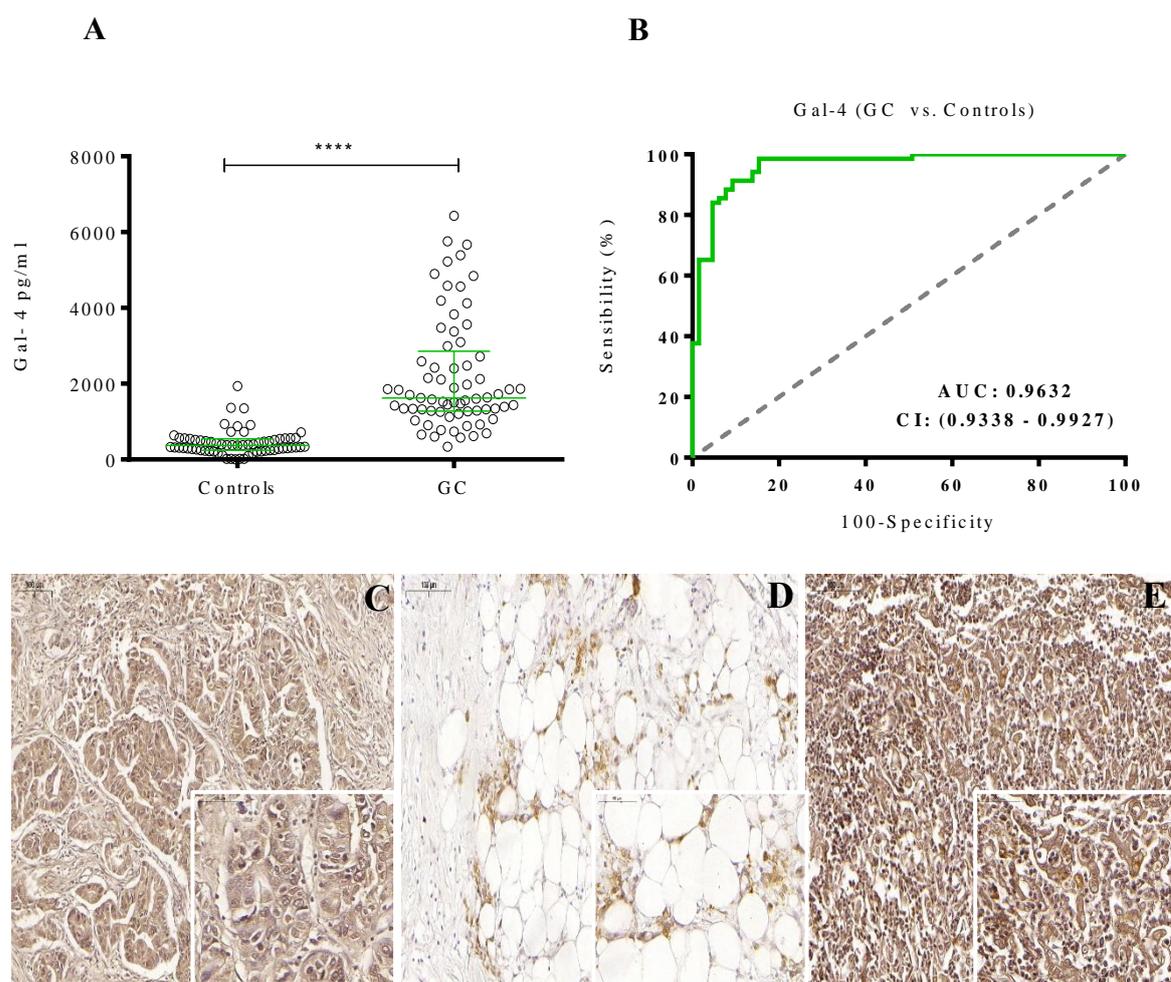
Therefore, the objective of the study is to quantify the circulating levels of Gal-4 and to determine the sensibility and specificity in order to distinguishing the GC from healthy subjects.

Serum and plasma samples from patients with confirmed gastric adenocarcinoma were achieved from Clinicas Hospital, Federal University of Pernambuco (HC/UFPE), and the Society of Pernambuco Against Cancer (SPCC), Brazil. The study was approved by the research ethics committee. The circulating levels of galectin-4 were measured by ELISA, and the expression of Gal-4 in 25 primary gastric adenocarcinoma tissues were assessed by immunohistochemistry.

Patients with GC (69) and healthy subjects (65) were paired by gender and age. Gal-4 circulating levels were significantly higher in patients with GC (1622 pg/ml; 339.6 – 6430 pg/ml), than in control group (369.8 pg/ml; 4.500 – 1940 pg/ml) ( $p < 0.0001$ ) (Fig. 1A). Association analyzes regarding gender, age, smoking, alcoholism, tumor location, staging (TNM), histological grade, initial treatment, surgery modality, chemotherapy, radiotherapy, angiolymphatic invasion, and node ratio with Gal-4 plasma levels were not statistically significant ( $p > 0.05$ ) (Data not shown). Pearson's analysis showed no statistically significant correlation of Gal-4 levels in relation to the hematological parameters in patients with GC (Data not shown).

The area under the curve (AUC) from receiver-operating characteristic (ROC) analysis was 0.9632 (CI: 0.9338 to 0.9927) ( $p < 0.0001$ ) for Gal-4 in discrimination of GC from control group (Fig. 1B). The cutoff point of 572.3 pg/ml corresponded to sensitivity, specificity and positive likelihood ratio (LR+) values of 98.55%, 84.62%, 6.406 respectively. Additionally, we investigated the tissue expression of Gal-4 by immunohistochemistry. Histologically, Gal-4 staining was positive in 19 (76%) analyzed cases and 6 (24%) cases were negative. Furthermore, we evidenced immunostaining of Gal-4 in microenvironmental cells (Figure 1C, 1D and 1E).

**Figure 1.** Comparison of the circulating Gal-4 levels between patients with gastric cancer (GC) and control group. \*\*\*\* indicates  $p < 0.0001$  (A), Receiver operating characteristic (ROC) curve for Gal- 4 validity for distinguishing GC (B), Photomicrograph evidencing Galectin-4 immunostaining in well-differentiated gastric adenocarcinoma tissue (C), Galectin-4 immunostaining in tumor cells invading adipose tissue (D), and Galectin-4 immunostaining in poorly differentiated gastric adenocarcinoma tissue (E). Scale bar: 100/50  $\mu\text{m}$ .



Corroborating with our data, Arnaout and Ibrahim (2017) found that gastric cancer patients high levels of Gal-4 in relation to healthy individuals. In addition, they indicated that the serum from this galectin has AUC (0.924), sensitivity (100%) and specificity (40%) associated with a cutoff value equal to or greater than 0.42 ng/ml. This is a cross-sectional cohort study with 25 patients diagnosed with gastric adenocarcinoma of Egyptian origin (4). However, our sample number was considerably larger, giving greater

assertiveness. In addition, we selected a cut-off point that corresponded to a percentage of sensitivity and specificity with better accuracy performance.

A study on the clinical significance and diagnostic value of the tumor serum markers used for the diagnosis of GC reported that, using conventional cut-off values, the markers CEA, CA19.9 and CA72.4 had an AUC, sensitivity and specificity of (0.712, 20.10%, 94.70%), (0.585, 21.40%, 96.20%), (0.722, 27.60%, 85.10%), respectively (5). These parameters have lower values than those found in our study.

We emphasize the need for an additional prospective study in order to assess whether circulating levels of Gal-4 reflect the tumor's response to therapeutic interventions. In addition, our study has a limited sample size, compared to studies with markers that are widely used in clinical practice. Despite these limitations, our data are harbingers and connote a possible association of Gal-4 with other tumor serum markers to give rise to a diagnostic panel for GC. Thus, a scenario for further investigations arises in order to complement our findings.

**ACKNOWLEDGMENTS:** We thank the patients agreed to participate in the study. We are also grateful to the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and the Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) for financial support.

## REFERENCES

1. Deng Y, Ding X, Song Q, Zhao G, Han L, Ding B, et al. Alterations in mucosa-associated microbiota in the stomach of patients with gastric cancer. *Cell Oncol.* 2021;44(3):701–14.
2. Ye DM, Xu G, Ma W, Li Y, Luo W, Xiao Y, et al. Significant function and research progress of biomarkers in gastric cancer (Review). *Oncol Lett.* 2020;19(1):17–29.
3. Cao ZQ, Guo XL. The role of galectin-4 in physiology and diseases. *Protein Cell.* 2016;7(5):314–24.
4. Arnaout AH, Ibrahim LM. Serum Galectin-4 (Gal-4) in Patients With Gastric

- Adenocarcinoma: Active Player in the Field. *Int J Adv Res.* 2017;5(2):1162–7.
5. Liang Y, Wang W, Fang C, Sharvesh Raj S, Hu WM, Li QW, et al. Clinical significance and diagnostic value of serum CEA, CA19-9 and CA72-4 in patients with gastric cancer. *Oncotarget.* 2016;7(31):49565–73.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Nossos dados demonstraram que os níveis circulantes de Gal-1, Gal-4 e Gal-9 estão aumentados nos pacientes com adenocarcinoma gástrico comparado a controles saudáveis;
- Os níveis circulantes de Gal-1 foram associados a invasão angiolímfática nos pacientes analisados;
- Os níveis circulantes de Gal-4 não apresentaram associações ou correlações significativas com os parâmetros clínico-patológicos analisados (Gênero, idade tabagismo, alcoolismo, localização do tumor, estágio (TNM), grau histológico, tratamento inicial, tipo de cirurgia, quimioterapia, radioterapia, invasão angiolímfática e node ratio);
- Adicionalmente, a análise por imuno-histoquímica revelou que pacientes com adenocarcinoma gástrico apresentam um aumento na expressão tecidual de Gal-4, com imunomarcção frequentemente observada em células do microambiente tumoral;
- Os níveis circulantes de Gal-9 foram associados a parâmetros clínico-patológicos (Gênero, idade, grau histológico e tipo de cirurgia). Além disso, Gal-9 foi correlacionada ao número absoluto de neutrófilos na população de estudo. Esses dados podem alavancar novas investigações a fim de elucidar o papel clínico dessa proteína no prognóstico de pacientes com adenocarcinoma gástrico;
- Na análise *in silico*, a expressão do mRNA de LGALS1 e LGALS9 não apresentaram associação significativa aos parâmetros clínico-patológicos analisados (Gênero, idade, estadiamento cirúrgico, invasão nodal, grau histológico, classificação de Lauren, radioterapia e infecção por *H. pylori*);
- Ademais, os resultados obtidos sugerem uma possível utilização dessas moléculas como biomarcadores de diagnóstico, uma vez que apresentaram bons parâmetros de acurácia capazes de discriminar pacientes com adenocarcinoma gástrico de controles saudáveis.

## REFERÊNCIAS

- AJANI, J. A. et al. Gastric adenocarcinoma. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, 2017.
- AJANI, J. A. et al. Gastric Cancer, Version 2.2022. **JNCCN Journal of the National Comprehensive Cancer Network**, v. 20, n. 2, p. 167–192, 2022.
- ALESSANDRINI, L. et al. Proposed molecular and miRNA classification of gastric cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 6, 2018.
- ARNAOUT, A. H.; IBRAHIM, L. M. Serum Galectin-4 (Gal-4) in Patients With Gastric Adenocarcinoma: Active Player in the Field. **International Journal of Advanced Research**, v. 5, n. 2, p. 1162–1167, 2017.
- ASHRAF, N.; HOFFE, S.; KIM, R. Oncologist Adjuvant Treatment for Gastric Cancer : Chemotherapy. **The oncologist**, v. 18, p. 1013–1021, 2013.
- ASTORGUES-XERRI, L. et al. Unraveling galectin-1 as a novel therapeutic target for cancer. **Cancer Treatment Reviews**, v. 40, n. 2, p. 307–319, 2014.
- AVTENYUK, N. U. et al. Galectin-9 Triggers Neutrophil-Mediated Anticancer Immunity. **Biomedicines**, v. 10, n. 1, 2022.
- BACIGALUPO, M. L. et al. Hierarchical and selective roles of galectins in hepatocarcinogenesis , liver fibrosis and inflammation of hepatocellular carcinoma. v. 19, n. 47, p. 8831–8849, 2013.
- BACIGALUPO, M. L.; CARABIAS, P.; TRONCOSO, M. F. Contribution of galectin-1, a glycan-binding protein, to gastrointestinal tumor progression. **World J Gastroenterol**, v. 23, n. 29, p. 5266–5281, 2017a.
- BACIGALUPO, M. L.; CARABIAS, P.; TRONCOSO, M. F. Contribution of galectin-1, a glycan-binding protein, to gastrointestinal tumor progression. **World Journal of Gastroenterology**, v. 23, n. 29, p. 5266–5281, 2017b.
- BALAKRISHNAN, M. et al. Changing Trends in Stomach Cancer Throughout the World. **Current Gastroenterology Reports volume**, 2017.
- BALAN, V.; NANGIA-MAKKER, P.; RAZ, A. Galectins as cancer biomarkers.

**Cancers**, v. 2, n. 2, p. 592–610, 2010.

BARRIENTOS, G. et al. Involvement of galectin-1 in reproduction: Past, present and future. **Human Reproduction Update**, v. 20, n. 2, p. 175–193, 2014.

BATZKE, K. et al. TrkB-target galectin-1 impairs immune activation and radiation responses in neuroblastoma: Implications for tumour therapy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 3, p. 1–9, 2018.

BERLTH, F. et al. Pathohistological classification systems in gastric cancer : Diagnostic relevance and prognostic value. **World J Gastroenterol**, v. 20, n. 19, p. 5679–5684, 2014.

BIJLSMA, M. F. et al. Molecular subtypes in cancers of the gastrointestinal tract. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 14, n. 6, p. 333–342, 2017.

BORGES, L. S. R. Diagnostic Accuracy Measures in Cardiovascular Research. **International Journal of Cardiovascular Sciences**, v. 29, n. 3, p. 218–222, 2016.

BORNSCHEIN, J.; MALFERTHEINER, P. Gastric carcinogenesis. **Langenbeck's Archives of Surgery**, v. 396, n. 6, p. 729–742, 2011.

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.

BRINCHMANN, M. F.; PATEL, D. M.; IVERSEN, M. H. The Role of Galectins as Modulators of Metabolism and Inflammation. **Mediators of Inflammation**, v. 2018, p. 1–11, 2018.

CAO, Z. Q.; GUO, X. L. The role of galectin-4 in physiology and diseases. **Protein and Cell**, v. 7, n. 5, p. 314–324, 2016.

CARTER, J. V. et al. ROC-ing along: Evaluation and interpretation of receiver operating characteristic curves. **Surgery (United States)**, v. 159, n. 6, p. 1638–1645, 2016.

CATALANO, V. et al. Gastric cancer. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 71, n. 2, p. 127–164, 2009.

- CHAN, Y. C. et al. Dissecting the structure–Activity relationship of galectin–Ligand interactions. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 2, p. 1–20, 2018.
- CHANG, W. A. et al. Role of galectins in lung cancer (Review). **Oncology Letters**, v. 14, n. 5, p. 5077–5084, 2017.
- CHARALAMPAKIS, N. et al. Medical management of gastric cancer: a 2017 update. **Cancer Medicine**, v. 7, n. 1, p. 123–133, 2018.
- CHEN, C. et al. Value of combined detection of serum CEA, CA72-4, CA19-9, CA15-3 and CA12-5 in the diagnosis of gastric cancer. **Annals of Clinical and Laboratory Science**, v. 47, n. 3, p. 260–263, 2017a.
- CHEN, C. et al. Overexpression of galectin-4 promotes cell growth of hepatocellular carcinoma cells in vitro and in vivo. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v. 10, n. 10, p. 10233–10242, 2017b.
- CHEN, H. et al. Appraising circular RNAs as novel biomarkers for the diagnosis and prognosis of gastric cancer: A pair-wise meta-analysis. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, n. January, p. 1–13, 2020.
- CHEN, J. et al. High expressions of galectin-1 and VEGF are associated with poor prognosis in gastric cancer patients. **Tumor Biology**, v. 35, n. 3, p. 2513–2519, 2014.
- CHEN, X. et al. Epstein – Barr Virus Infection and Gastric Cancer. **Medicine**, v. 94, n. 20, p. 1–9, 2015.
- CHENG, X. J.; LIN, J. C.; TU, S. P. Etiology and Prevention of Gastric Cancer. **Gastrointestinal Tumors**, v. 3, n. 1, p. 25–36, 2016.
- CHIA, N. Y.; TAN, P. Molecular Classification of Gastric Cancer. **Annals of Oncology**, p. 1–27, 2016.
- CHOI, S. IL et al. Prognostic value of tumoral expression of galectin-9 in gastric cancer. **Turkish Journal of Gastroenterology**, v. 28, n. 3, p. 166–170, 2017.
- CHOI, Y. J.; KIM, N. Gastric cancer and family history. **Korean Journal of Internal Medicine**, v. 31, n. 6, p. 1042–1053, 2016.
- CHONG, Y. et al. Galectin-1 induces invasion and the epithelial-mesenchymal

transition in human gastric cancer cells via non-canonical activation of the hedgehog signaling pathway. **Oncotarget**, v. 7, n. 50, p. 83611–83626, 2016.

CHOU, F. C. et al. Role of galectins in tumors and in clinical immunotherapy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 2, 2018.

CLAVEL, J. Progress in the epidemiological understanding of gene-environment interactions in major diseases: cancer. **Comptes Rendus - Biologies**, v. 330, n. 4, p. 306–317, 2007.

COHEN, J. F. et al. STARD 2015 guidelines for reporting diagnostic accuracy studies: Explanation and elaboration. **BMJ Open**, v. 6, n. 11, p. 1–17, 2016.

CORREA, P. Gastric Cancer. Overview. **Gastroenterology Clinics of North America**, v. 42, n. 2, p. 211–217, 2013.

COUSIN, J. M.; CLONINGER, M. J. Glycodendrimers: Tools to explore multivalent galectin-1 interactions. **Beilstein Journal of Organic Chemistry**, v. 11, p. 739–747, 2015.

COUSIN, J. M.; CLONINGER, M. J. The role of galectin-1 in cancer progression, and synthetic multivalent systems for the study of Galectin-1. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 9, 2016.

COUTZAC, C. et al. Immunotherapy in advanced gastric cancer, is it the future? **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 133, n. September 2018, p. 25–32, 2019.

CUI, C. et al. The roles of PD-1/PD-L1 and its signalling pathway in gastrointestinal tract cancers. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 46, n. 1, p. 3–10, 2019.

DE VITA, F. et al. Neo-adjuvant and adjuvant chemotherapy of gastric cancer. **Annals of Oncology**, v. 18, n. SUPPL. 6, p. vi120–vi123, 2007.

DEGIULI, M. et al. Gastric cancer: Current status of lymph node dissection. **World Journal of Gastroenterology**, v. 22, n. 10, p. 2875–2893, 2016.

DEN HOED, C. M.; KUIPERS, E. J. Gastric Cancer: How Can We Reduce the

Incidence of this Disease? **Current Gastroenterology Reports**, v. 18, n. 7, p. 1–8, 2016.

DENG, Y. et al. Alterations in mucosa-associated microbiota in the stomach of patients with gastric cancer. **Cellular Oncology**, v. 44, n. 3, p. 701–714, 2021.

DICKEN, B. J. et al. Gastric adenocarcinoma: Review and considerations for future directions. **Annals of Surgery**, v. 241, n. 1, p. 27–39, 2005.

DINGS, R. P. M. Galectins as Molecular Targets for Therapeutic Intervention. **International Journal of Molecular Sciences**, p. 1–22, 2018.

DUARTE, H. O. et al. Gastric cancer: Basic aspects. **Helicobacter**, v. 23, p. 2–7, 2018.

EUSEBI, P. Diagnostic accuracy measures. **Cerebrovascular Diseases**, v. 36, n. 4, p. 267–272, 2013.

FANG, T. et al. Diagnostic Sensitivity of NLR and PLR in Early Diagnosis of Gastric Cancer. v. 2020, 2020.

FIGUEIREDO, C.; GARCIA-GONZALEZ, M. A.; MACHADO, J. C. Molecular Pathogenesis of Gastric Cancer. **Helicobacter**, v. 18, n. S1, p. 28–33, 2013.

FLORKOWSK, C. M. Sensitivity, Specificity, Receiver-Operating Characteristic (ROC) Curves and Likelihood Ratios: Communicating the Performance of Diagnostic Tests. **The Clinical Biochemist Reviews**, v. 29, p. 83–87, 2008.

FUGAZZOLA, P. et al. Advanced gastric cancer: The value of surgery. **Acta Biomedica**, v. 89, n. 12, p. 110–116, 2018.

FUJIHARA, S. et al. Galectin-9 in cancer therapy. **Recent Patents on Endocrine, Metabolic & Immune Drug Discovery**, v.7, p. 130-137, 2013.

FUJITA, K. et al. Cancer therapy due to apoptosis: Galectin-9. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 1, p. 1–15, 2017.

GAO, J. P. et al. Tumor heterogeneity of gastric cancer: From the perspective of tumor-initiating cell. **World Journal of Gastroenterology**, v. 24, n. 24, p. 2567–2581, 2018.

GIOVANNONE, N. et al. Galectin-Glycan Interactions as Regulators of B Cell

Immunity. **Frontiers in immunology**, v. 9, n. December, p. 2839, 2018.

GRUSON, D.; KO, G. Galectins testing : New promises for the diagnosis and risk stratification of chronic diseases ? **Clinical Biochemistry**, v. 45, n. 10–11, p. 719–726, 2012.

HAMILTON, S. R.; AALTONEN, L. A. The new World Health Organization classification of lung tumours. **Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System. International Agency for Research on Cancer (IARC) Pathology**, v. 18, n. 6, p. 1059–1068, 2001.

HO, S. W. T.; TAN, P. Dissection of gastric cancer heterogeneity for precision oncology. **Cancer Science**, v. 110, n. 11, p. 3405–3414, 2019.

HOKAMA, A.; MIZOGUCHI, E.; MIZOGUCHI, A. Roles of galectins in inflammatory bowel disease. **World Journal of Gastroenterology**, v. 14, n. 33, p. 5133–5137, 2008.

HONG, S. H. et al. Galectin-4 interaction with CD14 triggers the differentiation of monocytes into macrophage-like cells via the MAPK signaling pathway. **Immune Network**, v. 19, n. 3, 2019.

HUFLEJT, M. E.; LEFFLER, H. Galectin-4 in normal tissues and cancer. **Glycoconjugate Journal**, v. 20, n. 4, p. 247–255, 2003.

ISHAQ, S.; NUNN, L. Helicobacter pylori and gastric cancer: A state of the art review. **Gastroenterology and Hepatology from Bed to Bench**, v. 8, n. 6, p. S6–S14, 2015.

JIANG, J. et al. Decreased Galectin-9 and increased Tim-3 expression are related to poor prognosis in gastric cancer. **PLoS ONE**, v. 8, n. 12, 2013.

JOHANNES, L.; JACOB, R.; LEFFLER, H. Galectins at a glance. **Journal of Cell Science**, v. 131, n. 9, p. 1–9, 2018.

JOHN, S.; MISHRA, R. Galectin-9: From cell biology to complex disease dynamics. **Journal of Biosciences**, v. 41, n. 3, p. 507–534, 2016.

KARIMI, P. et al. Gastric Cancer: Descriptive Epidemiology, Risk Factors, Screening, and Prevention. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 23, n. 5, p. 700–713, 2014.

- KAUR, M. et al. Roles of galectin-7 in cancer. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 17, n. 2, p. 455–461, 2016.
- KIM, H. J. et al. High galectin-1 expression correlates with poor prognosis and is involved in epithelial ovarian cancer proliferation and invasion. **European Journal of Cancer**, v. 48, n. 12, p. 1914–1921, 2012.
- KIM, S. W.; PARK, K. C.; JEON, S. M. Abrogation of galectin-4 expression promotes tumorigenesis in colorectal cancer. p. 169–178, 2013.
- KIM, T. H.; SHIVDASANI, R. A. Stomach development, stem cells and disease. **Development (Cambridge)**, v. 143, n. 4, p. 554–565, 2016.
- KREJS, G. J. Gastric cancer: Epidemiology and risk factors. **Digestive Diseases**, v. 28, n. 4–5, p. 600–603, 2010.
- LAU, H. C. H. et al. Organoid models of gastrointestinal cancers in basic and translational research. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 17, n. 4, p. 203–222, 2020.
- LAYKE, J. C.; LOPEZ, P. P. Gastric Cancer: Diagnosis and Treatment Options. 2004.
- LEBER, M. F.; EFFERTH, T. Molecular principles of cancer invasion and metastasis (Review). **International Journal of Oncology**, v. 34, p. 881–895, 2009.
- LIANG, Y. et al. Clinical significance and diagnostic value of serum CEA, CA19-9 and CA72-4 in patients with gastric cancer. **Oncotarget**, v. 7, n. 31, p. 49565–49573, 2016.
- LIM, B. et al. Genomic and epigenomic heterogeneity in molecular subtypes of gastric cancer. **World Journal of Gastroenterology**, v. 22, n. 3, p. 1190–1201, 2016.
- LIU, H. S.; XIAO, H. S. MicroRNAs as potential biomarkers for gastric cancer. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 34, p. 12007–12017, 2014.
- LUO, J.; SOLIMINI, N. L.; ELLEDGE, AND S. J. Principles of Cancer Therapy: Oncogene and Non-oncogene Addiction. **CELL**, v. 136, p. 823–837, 2009.
- LUU, C. et al. Does histology really influence gastric cancer prognosis? **Gastroenterology**, v. 152, n. 5, p. S1217, 2017.

- MA, J. et al. Lauren classification and individualized chemotherapy in gastric cancer ( Review ). **Oncology Letters**, n. 5, p. 2959–2964, 2016.
- MACONI, G. et al. Role of symptoms in diagnosis and outcome of gastric cancer. **World Journal of Gastroenterology**, v. 14, n. 8, p. 1149–1155, 2008.
- MANERO-RUPÉREZ, N. et al. The Galectin Family as Molecular Targets: Hopes for Defeating Pancreatic Cancer. **Cells**, v. 9, n. 3, p. 689, 2020.
- MARQUÉS-LESPIER, J. M.; GONZÁLEZ-PONS, M.; CRUZ-CORREA, M. Current Perspectives on Gastric Cancer. **Gastroenterology Clinics of North America**, v. 45, n. 3, p. 413–428, 2016.
- MARRELLI, D. et al. Clinical impact of molecular classifications in gastric cancer. **Updates in Surgery**, v. 70, n. 2, p. 225–232, 2018.
- MARTÍNEZ-BOSCH, N. et al. Galectins in prostate and bladder cancer: tumorigenic roles and clinical opportunities. **Nature Reviews Urology**, v. 16, n. 7, p. 433–445, 2019.
- MATSUOKA, T.; YASHIRO, M. Biomarkers of gastric cancer: Current topics and future perspective. **World Journal of Gastroenterology**, v. 24, n. 26, p. 2818–2832, 2018.
- MEGGYES, M. et al. Influence of galectin-9 treatment on the phenotype and function of nk-92mi cells in the presence of different serum supplements. **Biomolecules**, v. 11, n. 8, 2021.
- MIHMANLI, M. et al. Recent developments and innovations in gastric cancer. **World Journal of Gastroenterology**, v. 22, n. 17, p. 4307–4320, 2016.
- MIZOGUCHI, E.; MIZOGUCHI, A. Is the Sugar Always Sweet in Intestinal Inflammation ? **Immunologic Research**, v. 37, p. 47–60, 2007.
- MOAR, P.; TANDON, R. Galectin-9 as a biomarker of disease severity. **Cellular Immunology**, v. 361, n. January, p. 104287, 2021.
- MODENUTTI, C. P. et al. The Structural Biology of Galectin-Ligand Recognition: Current Advances in Modeling Tools, Protein Engineering, and Inhibitor Design.

**Frontiers in Chemistry**, v. 7, n. December, 2019.

MOTAMEDI, M. et al. Galectin-9 Expression Defines a Subpopulation of NK Cells with Impaired Cytotoxic Effector Molecules but Enhanced IFN- $\gamma$  Production, Dichotomous to TIGIT, in HIV-1 Infection. **ImmunoHorizons**, v. 3, n. 11, p. 531–546, 2019.

NABI, I. R.; SHANKAR, J.; DENNIS, J. W. The galectin lattice at a glance. **Journal of Cell Science**, v. 128, n. 13, p. 2213–2219, 2015.

NECULA, L. et al. Recent advances in gastric cancer early diagnosis. **World Journal of Gastroenterology**, v. 25, n. 17, p. 2029–2044, 2019.

NUNOBE, S. et al. Minimally invasive surgery for stomach cancer. **Japanese Journal of Clinical Oncology**, v. 46, n. 5, p. 395–398, 2016.

ORDITURA, M. et al. Treatment of gastric cancer. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 7, p. 1635–1649, 2014.

OTT, K. et al. Gastric cancer: Surgery in 2011. **Langenbeck's Archives of Surgery**, v. 396, n. 6, p. 743–758, 2011.

OUE, N. et al. Molecular carcinogenesis of gastric cancer: Lauren classification, mucin phenotype expression, and cancer stem cells. **International Journal of Clinical Oncology**, v. 24, n. 7, p. 771–778, 2019.

PACLIK, D. et al. Galectin-4 controls intestinal inflammation by selective regulation of peripheral and mucosal T cell apoptosis and cell cycle. **PLoS ONE**, v. 3, n. 7, p. 1–11, 2008.

PERNOT, S. et al. Infiltrating and peripheral immune cell analysis in advanced gastric cancer according to the Lauren classification and its prognostic significance. **Gastric Cancer**, v. 23, n. 1, p. 73–81, 2020.

PETRYSZYN, P.; CHAPELLE, N.; MATYSIAK-BUDNIK, T. Gastric cancer: Where are we heading? **Digestive Diseases**, p. 1–6, 2020.

RABINOVICH, G. A. Galectin-1 as a potential cancer target. **British Journal of Cancer**, v. 92, n. 7, p. 1188–1192, 2005.

- RAJDEV, L. Treatment options for surgically resectable gastric cancer. **Current Treatment Options in Oncology**, v. 11, n. 1–2, p. 14–23, 2010.
- RAPOPORT, E. M.; BOVIN, N. V. Specificity of human galectins on cell surfaces. **Biochemistry (Moscow)**, v. 80, n. 7, p. 846–856, 2015.
- RAWLA, P.; BARSOUK, A. Epidemiology of gastric cancer: Global trends, risk factors and prevention. **Przegląd Gastroenterologiczny**, v. 14, n. 1, p. 26–38, 2019.
- REDDAVID, R. et al. Neoadjuvant chemotherapy for gastric cancer. Is it a must or a fake? **World Journal of Gastroenterology**, v. 24, n. 2, p. 274–289, 2018.
- RUSTIGUEL, J. K. et al. Full-length model of the human galectin-4 and insights into dynamics of inter-domain communication. **Scientific Reports**, v. 6, n. May, p. 1–13, 2016.
- RYU, H. et al. C-C motif chemokine receptors in gastric cancer (Review) HYEWON. **MOLECULAR AND CLINICAL ONCOLOGY**, v. 8, p. 3–8, 2017.
- SALAMANNA, F. et al. Role and translational implication of galectins in arthritis pathophysiology and treatment: A systematic literature review. **Journal of Cellular Physiology**, v. 234, n. 2, p. 1588–1605, 2019.
- SALATINO, M. et al. Galectin-1 as a potential therapeutic target in autoimmune disorders and cancer. **Expert Opinion on Biological Therapy**, v. 8, n. 1, p. 45–57, 2008.
- SEDDA, S. et al. Proteinase activated-receptors-associated signaling in the control of gastric cancer. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 34, p. 11977–11984, 2014.
- SHIH, T. et al. Targeting Galectin-1 impairs castration-resistant prostate cancer progression and invasion. **Clinical Cancer Research**, v. 24, n. 17, p. 4319–4331, 2018.
- SITARZ, R. et al. Gastric cancer : epidemiology , prevention , classification , and treatment. **Cancer Management and Research**, v. 10, p. 239–248, 2018.
- SMYTH, E. C. et al. Gastric cancer: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. **Annals of Oncology**, v. 27, n. August 2016, p. v38–v49,

2016.

SON, S. Y.; KIM, H. H. Minimally invasive surgery in gastric cancer. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 39, p. 14132–14141, 2014.

SONG, Z. et al. Progress in the treatment of advanced gastric cancer. **Tumor Biology**, v. 39, n. 7, 2017.

SONG, Z.; ZHOU, L. Helicobacter pylori and gastric cancer. **Phytopharmaceuticals in Cancer Chemoprevention**, v. 128, n. 22, p. 3101–5, 2015.

STRONG, V. E. Progress in gastric cancer. **Updates in Surgery**, v. 70, n. 2, p. 157–159, 2018.

SUN, Q. et al. Prognostic and diagnostic significance of galectins in pancreatic cancer : a systematic review and meta - analysis. **Cancer Cell International**, p. 1–14, 2019.

THAN, N. G. et al. Galectins: Double-edged swords in the cross-roads of pregnancy complications and female reproductive tract inflammation and neoplasia. **Journal of Pathology and Translational Medicine**, v. 49, n. 3, p. 181–208, 2015.

THIJSEN, V. L. et al. Galectin expression in cancer diagnosis and prognosis: A systematic review. **Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer**, v. 1855, n. 2, p. 235–247, 2015.

THRUMURTHY, S. G. et al. The diagnosis and management of gastric cancer. **Bmj**, v. 347, n. nov04 1, p. f6367–f6367, 2013.

TIMOSHENKO, A. V. Towards molecular mechanisms regulating the expression of galectins in cancer cells under microenvironmental stress conditions. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 72, n. 22, p. 4327–4340, 2015.

TONETO, M. G. Estado atual do tratamento cirúrgico do adenocarcinoma gástrico avançado. **Rev AMRIGS**, v. 56, n. 1, p. 81–86, 2012.

TRONCOSO, M. F. et al. Integrating structure and function of ‘tandem-repeat’ galectins. **Frontiers in Bioscience**, p. 864–887, 2012.

TSAI, M.-C. et al. Health disparities are associated with gastric cancer mortality-to-incidence ratios in 57 countries. **World Journal of Gastroenterology**, v. 23, n. 44, p.

7881–7887, 2017.

VAN DER HOEVEN, N. W. et al. The emerging role of galectins in cardiovascular disease. **Vascular Pharmacology**, v. 81, p. 31–41, 2016.

VASTA, G. R. et al. Functions of galectins as 'self/non-self'-recognition and effector factors. **Pathogens and Disease**, v. 75, n. 5, p. 1–12, 2017.

VENERITO, M. et al. Review: Gastric cancer—Clinical aspects. **Helicobacter**, v. 24, n. S1, p. 1–5, 2019.

VRADELIS, S. et al. Quality control in upper gastrointestinal endoscopy: Detection rates of gastric cancer in Oxford 2005–2008. **Postgraduate Medical Journal**, v. 87, n. 1027, p. 335–339, 2011.

WANG, Q.; LIU, G.; HU, C. Molecular Classification of Gastric Adenocarcinoma. **Gastroenterol Res.**, v. 12, n. 6, p. 275–282, 2019.

WDOWIAK, K. et al. Galectin targeted therapy in oncology: Current knowledge and perspectives. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 1, p. 1–21, 2018.

WIERSMA, V. R. et al. Therapeutic potential of Galectin-9 in human disease. **Medicinal Research Review**, p. 25, 2011.

YANG, A. P. et al. CA72-4 combined with CEA, CA125 and CA19-9 improves the sensitivity for the early diagnosis of gastric cancer. **Clinica Chimica Acta**, v. 437, p. 183–186, 2014a.

YANG, J. et al. Role of downregulation of galectin-9 in the tumorigenesis of gastric cancer. **International Journal of Oncology**, v. 45, n. 3, p. 1313–1320, 2014b.

YANG, R. Y.; RABINOVICH, G. A.; LIU, F. T. Galectins: Structure, function and therapeutic potential. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 10, n. 17, p. 1–24, 2008.

YAO, Q. et al. A comprehensive assessment of the racial and ethnic disparities in the incidence of gastric cancer in the United States, 1992–2014. **Cancer Research and Treatment**, v. 51, n. 2, p. 519–529, 2019.

YASINSKA, I. M. et al. The TIM-3-galectin-9 pathway and its regulatory mechanisms

in human breast cancer. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. JULY, p. 1–13, 2019.

YE, D. M. et al. Significant function and research progress of biomarkers in gastric cancer (Review). **Oncology Letters**, v. 19, n. 1, p. 17–29, 2020.

YOON, H.; KIM, N. Diagnosis and management of high risk group for gastric cancer. **Gut and Liver**, v. 9, n. 1, p. 5–17, 2015.

YOU, X. et al. Galectin-1 promotes metastasis in gastric cancer through a sphingosine-1-phosphate receptor 1-dependent mechanism. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 51, n. 1, p. 11–30, 2018.

YOU, X. et al. Galectin-1 promotes vasculogenic mimicry in gastric cancer by upregulating EMT signaling. **Journal of Cancer**, v. 10, n. 25, p. 6286–6297, 2019.

YU, J.; ZHANG, S.; ZHAO, B. Differences and correlation of serum CEA, CA19-9 and CA72-4 in gastric cancer. **Molecular and Clinical Oncology**, v. 4, n. 3, p. 441–449, 2016.

ZALI, H.; REZAEI-TAVIRANI, M.; AZODI, M. Gastric cancer: Prevention, risk factors and treatment. **Gastroenterology and Hepatology from Bed to Bench**, v. 4, n. 4, p. 175–185, 2011.

ZHOU, B. et al. Plasma proteomics-based identification of novel biomarkers in early gastric cancer. **Clinical Biochemistry**, v. 76, p. 5–10, 2020.

## APÊNDICE A - QUESTIONÁRIO DE PESQUISA

QUESTIONÁRIO DE PESQUISA						
Mestranda: Maria de Fátima Deodato de Souza						
CÂNCER GÁSTRICO			FICHA DE REGISTRO Nº: <input type="text"/>			
<input type="text"/>						
Nome do Paciente:						
Sexo	Masc <input type="checkbox"/>	Fem <input type="checkbox"/>				Data de Entrada:
Naturalidade:	<input type="text"/>	<input type="text"/>				Data de Nascimento:
Residência (cidade e estado):					Data da Cirurgia:	
Escolaridade						
COR: Branca <input type="checkbox"/> Parda <input type="checkbox"/> Negra <input type="checkbox"/>						
TRABALHO: empregado <input type="checkbox"/> desempregado <input type="checkbox"/> licença de saúde <input type="checkbox"/>						
apostado <input type="checkbox"/> trabalho doméstico <input type="checkbox"/> outros <input type="checkbox"/>						
Analfabeto <input type="checkbox"/>	Básico <input type="checkbox"/>	Médio <input type="checkbox"/>	Superior <input type="checkbox"/>	Completo <input type="checkbox"/>	Incompleto <input type="checkbox"/>	
Tabagismo	Sim <input type="checkbox"/>	Não <input type="checkbox"/>	Ex <input type="checkbox"/>	Tipo/Dose:		
Etilismo	Sim <input type="checkbox"/>	Não <input type="checkbox"/>	Ex <input type="checkbox"/>	Tipo/Dose:		
IMC						
INFORMAÇÃO SOBRE A DOENÇA E TRATAMENTO						
Outros Tumores	Sim <input type="checkbox"/>	Não <input type="checkbox"/>				Qual:

## Outras Informações – Comorbidades

Diabetes – S / N

Hipertensão – S / N

Doenças Auto-imunes – S / N

Infecções Crônicas – S / N

Uso de medicações – S / N : quais:

Passado cirúrgico – S / N

<b>Descrição da Lesão:</b>					<b>cTNM:</b>
					<b>cEstádio:</b>
<b>Localização</b>	FUNDO <input type="checkbox"/>	CORPO <input type="checkbox"/>	ANTRO <input type="checkbox"/>	PILORO <input type="checkbox"/>	<b>Qual:</b>
	LINFONODOS <input type="checkbox"/>	OUTROS <input type="checkbox"/>			
<b>Tratamento Inicial</b>		<b>Tratamento Adjuvante (Pós)</b>			<b>Data do tratamento inicial:</b>

**INFORMAÇÕES SOBRE PACIENTES COM INDICAÇÃO DE CIRURGIA**

<b>Tipo de Cirurgia</b>				<b>TNM-ESTADIAMENTO:</b>
<b>Margens Livres</b>	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	<b>Linfadenectomia</b>	Número de Linfonodos	<b>Número de linfonodos:</b>
<b>Tratamento adjuvante</b>	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não			

**RESPOSTA TERAPÊUTICA – Para pacientes com adenocarcinomas metastático**

**Recidiva**

**Resposta estável**

**Parcial**  **completa**  **Progressão**

**HISTOPATOLOGIA**

**Nº Cirurgia:**

**OUTRAS INFORMAÇÕES**

**APÊNDICE B- TERMO DE CONCENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO  
(TCLE/HC)**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
NÚCLEO DE PESQUISA EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA SUELY  
GALDINO  
LABORATÓRIO DE IMUNOMODULAÇÃO E NOVAS ABORDAGENS  
TERAPÊUTICAS**



**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO  
(PARA MAIORES DE 18 ANOS OU EMANCIPADOS)**

Convidamos o (a) Sr. (a) para participar como voluntário (a) da pesquisa “Avaliação funcional e clínica do perfil das galectinas em tumores primários do trato gastrointestinal”, que está sob a responsabilidade da pesquisadora Maria de Fátima Deodato de Souza, e-mail: deodatomariadefatima@gmail.com, fone: (81) 99642-3350, Endereço: Rua Estanislau Gomes do Prado, Nº 56, Salgadinho – PE, CEP: 55675-000. Também participam desta pesquisa os pesquisadores: Profa. Dra. Michelly Cristiny Pereira (Telefone: (81) 99827-4256, e-mail: michelly2305@yahoo.com.br) e a Profa. Dra. Luiza Rayanna Amorim de Lima (Telefone: (81) 98716-4586, e-mail: luizarayanna@gmail.com), e está sob a orientação do Prof. Dr. Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo (Telefone: (81) 99794-3799, e-mail: moacyr.rego@gmail.com).

Todas as suas dúvidas podem ser esclarecidas com o responsável por esta pesquisa. Apenas quando todos os esclarecimentos forem dados e você concorde com a realização do estudo, pedimos que rubrique as folhas e assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma via lhe será entregue e a outra ficará com o pesquisador responsável.

Você estará livre para decidir participar ou recusar-se. Caso não aceite participar, não haverá nenhum problema, desistir é um direito seu, bem como será possível retirar o consentimento em qualquer fase da pesquisa, também sem nenhuma penalidade.

**INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:**

- Os tumores do trato gastrointestinal configuram uma grande parcela dos tumores em humanos, apresentando elevada incidência e alta mortalidade. Apesar dos avanços nas últimas décadas no campo da biologia molecular, as abordagens para diagnóstico precoce e acompanhamento ainda permanecem limitadas. Dessa forma, nosso objetivo é analisar comparativamente o perfil das galectinas em

tumores do trato gastrointestinal visando sua utilização como biomarcador clínico ou alvo terapêutico.

- Nesta pesquisa só serão realizados testes com as células presentes no seu sangue que é coletado da sua veia como uma coleta de sangue para exames laboratoriais. Caso concorde, você participará desta pesquisa apenas uma vez com a coleta de sangue. O sangue coletado será avaliado pelos pesquisadores, e nada mais será necessário.
- Para este estudo, precisamos coletar algumas células de sangue. A coleta de sangue é feita no braço e a quantidade coletada é equivalente a duas colheres de sopa (13 ml).
- **RISCOS:** A coleta de sangue pode ser desconfortável e o braço pode ficar um pouco dolorido e apresentar um pequeno hematoma, que é uma área arroxeadada no local da coleta. Antes de iniciar a coleta, nós limparemos o seu braço com álcool, e todo material usado na coleta é descartável. A coleta será feita por profissionais treinados e competentes e orientados para reduzir os riscos. Caso ocorra a formação do hematoma, será aplicada compressa gelada para reduzir a vermelhidão.
- **BENEFÍCIOS:** Os benefícios da pesquisa não são individuais. Estendendo-se a sociedade como um todo, uma vez que os resultados obtidos poderão propiciar um maior conhecimento sobre a patogênese destes tipos de tumores. Sendo assim, permitirá não só um melhor entendimento destas doenças como a possibilidade da identificação de novos alvos que poderão ajudar a aperfeiçoar o diagnóstico e a otimizar as estratégias terapêutica.

Todas as informações desta pesquisa serão confidenciais e serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, não havendo identificação dos voluntários, a não ser entre os responsáveis pelo estudo, sendo assegurado o sigilo sobre a sua participação. Os dados coletados nesta pesquisa provenientes dos resultados das amostras coletadas, ficarão devidamente armazenados em arquivos digitais em computadores ou impressos em pastas de arquivos, sob a responsabilidade da pesquisadora Maria de Fátima Deodato de Souza, Endereço: Rua Estanislau Gomes do Prado, Nº 56, Salgadinho – PE, CEP: 55675-000, por um período mínimo 5 anos.

Nada lhe será pago e nem será cobrado para participar desta pesquisa, pois a aceitação é voluntária, mas fica também garantida a indenização em casos de danos, comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa, conforme decisão judicial ou extra-judicial. Se houver necessidade, as despesas para a sua participação serão assumidas pelos pesquisadores (ressarcimento de transporte e alimentação).

Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE no endereço: (Avenida da Engenharia s/n – 1º Andar, sala 4 - Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740-600, Tel.: (81) 2126.8588 – e-mail: cepccs@ufpe.br).

---

(assinatura do pesquisador)

**CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO VOLUNTÁRIO**  
(A)

Eu, \_\_\_\_\_, CPF \_\_\_\_\_, abaixo assinado, após a leitura (ou a escuta da leitura) deste documento e de ter tido a oportunidade de conversar e ter esclarecido as minhas dúvidas com o pesquisador responsável, concordo em participar do estudo “Avaliação funcional e clínica do perfil das galectinas em tumores primários do trato gastrointestinal”, como voluntário (a). Fui devidamente informado (a) e esclarecido (a) pelo(a) pesquisador (a) sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade (ou interrupção de meu acompanhamento/ assistência/tratamento).

Local e data \_\_\_\_\_

Assinatura do participante: \_\_\_\_\_

**Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e o aceite do voluntário em participar.** (02 testemunhas não ligadas à equipe de pesquisadores):

Nome:	Nome:
Assinatura:	Assinatura:

**APÊNDICE C - TERMO DE CONCENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO  
(TCLE/SPCC)**



**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

O Senhor (a) está sendo convidado como voluntário a participar da pesquisa **AVALIAÇÃO FUNCIONAL E CLÍNICA DO PERFIL DAS GALECTINAS EM TUMORES PRIMÁRIOS DO TRATO GASTROINTESTINAL**. Neste estudo pretendemos analisar comparativamente o perfil das galectinas em tumores do trato gastrointestinal visando sua utilização como biomarcador clínico ou alvo terapêutico.

O motivo que nos leva ao estudo é a necessidade de buscar novas estratégias terapêuticas para os tumores do trato gastrointestinal que configuram uma grande parcela dos tumores em humanos, apresentando elevada incidência. Apesar dos avanços nas últimas décadas no campo da biologia molecular, as abordagens para diagnóstico precoce e acompanhamento ainda permanecem limitadas.

Para este estudo será realizada a coleta de sangue que já faz parte dos exames de rotina, utilizando o braço para a retirada da amostra de sangue, sendo necessário a coleta de dois tubos contendo 9 ml cada. Antes de iniciar a coleta, nós limparemos o seu braço com álcool, e todo material usado na coleta será descartável. A coleta será feita por profissionais treinados e competentes. Os riscos envolvidos neste projeto referem-se à coleta de sangue, o constrangimento durante a coleta dos dados e o tempo de espera para atendimento. A coleta de sangue pode ser um pouco desconfortável e o braço apresentar um pequeno hematoma, que é uma área arroxeadada no local da coleta. Todos os riscos serão minimizados, pois os procedimentos serão realizados por profissional habilitado e orientados para reduzir os riscos. Os participantes da pesquisa, se caso aceitar, não terá benefício direto com os resultados, sendo estes voltados para a pesquisa e monitoramentos de tumores do trato gastrointestinal, auxiliando para que ocorra um melhor diagnóstico, de forma mais rápida, facilitando assim o início dos tratamentos futuramente.

Conforme Resolução CNS nº466/2012, para participar deste estudo você não terá nenhum custo, nem receberá qualquer vantagem financeira. Você será esclarecido sobre o estudo em qualquer aspecto que desejar e estará livre para participar ou recusar-se em qualquer momento. A sua participação é voluntária e a recusa em participar não acarretará qualquer penalidade ou modificação na forma em que é atendido pelo pesquisador. O pesquisador irá tratar a sua identidade com padrões profissionais de sigilo. Os resultados da pesquisa estarão à sua disposição quando finalizada. Seu nome ou o material que indique sua participação não será liberado sem a sua permissão. O Sr. não será

identificado em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo. Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias, sendo que uma cópia será arquivada pela pesquisadora responsável Maria de Fátima Deodato de Souza, e-mail: [deodatomariadefatima@gmail.com](mailto:deodatomariadefatima@gmail.com), fone: (81) 99642-3350, no Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica Suely Galdino NUPIT-SG localizado no 1º andar do Prédio da Diretoria de Inovação e Empreendedorismo - DINE (ao lado do Dept. de Educação Física) cujo endereço é Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego S/N - Cidade Universitária, CEP: 50.670-901 Recife – PE, por um período mínimo 5 anos e a outra será fornecida a você.

Eu, \_\_\_\_\_, portador do documento de Identidade \_\_\_\_\_ fui informado dos objetivos da pesquisa “AVALIAÇÃO FUNCIONAL E CLÍNICA DO PERFIL DAS GALECTINAS EM TUMORES PRIMÁRIOS DO TRATO GASTROINTESTINAL”, de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão de participar se assim o desejar.

Declaro que concordo em participar desse estudo. Recebi uma cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e me foi dada à oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

Recife, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

Nome e Assinatura participante: \_\_\_\_\_

Nome Assinatura pesquisador: \_\_\_\_\_

Nome Assinatura testemunha \_\_\_\_\_

Nome Assinatura testemunha \_\_\_\_\_

Em caso de dúvidas com respeito aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar:

CEP / HCP– Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Câncer de Pernambuco

Av. Cruz Cabugá, 1597 Santo Amaro – Recife PE. CEP: 50040000

E-mail: [cep@hcp.org.br](mailto:cep@hcp.org.br) Contato: 3217-8005

## ANEXO A - PARECER CEP – HC/UFPE

UFPE - HOSPITAL DAS  
CLÍNICAS DA UNIVERSIDADE  
FEDERAL DE PERNAMBUCO -



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

Elaborado pela Instituição Coparticipante

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** AVALIAÇÃO FUNCIONAL E CLÍNICA DO PERFIL DAS GALECTINAS EM TUMORES PRIMÁRIOS DO TRATO GASTROINTESTINAL

**Pesquisador:** MARIA DE FATIMA DEODATO DE SOUZA

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 00988018.1.3001.8807

**Instituição Proponente:** EMPRESA BRASILEIRA DE SERVICOS HOSPITALARES - EBSERH

**Patrocinador Principal:** FUNDACAO DE AMPARO A CIENCIA E TECNOLOGIA - FACEPE

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 3.083.401

**Apresentação do Projeto:**

Trata-se de um projeto de tese da Estudante MARIA DE FÁTIMA DEODATO DE SOUZA sob a orientação do Professor MOACYR JESUS BARRETO DE MELO RÉGO, vinculado ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). O projeto será realizado no Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas (LINAT), Serviço de Oncologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (HC-UFPE). A proposta consiste basicamente na análise da hipótese: Alterações nos perfis de glicosilação celular estão associadas ao comportamento de algumas transformações malignas. As galectinas constituem moléculas multifuncionais envolvidas em diversos processos celulares, sendo associadas em distintos fenômenos relacionados ao câncer, como transformação e diferenciação celular, regulação do ciclo celular, migração, adesão e angiogênese. Neste sentido, o grau de avanço dos tumores do trato gastrointestinal (TGI) associados aos perfis de expressão dessas moléculas podem fornecer informações que podem ser confiáveis no diagnóstico e prognóstico.

Para este fim realizar-se-á um estudo com 500 pacientes maiores de 18 anos, provenientes do Serviço de Oncologia do HC-UFPE e diagnosticados com câncer: gástrico, pancreático, hepático ou de vesícula biliar. Todos os pacientes serão submetidos a coleta de 13 ml de sangue. As amostras de sangue serão

**Endereço:** Av. Professor Moraes Rego, S/N, 3º andar do prédio principal (enfermarias)  
**Bairro:** Cidade Universitária **CEP:** 50.670-901  
**UF:** PE **Município:** RECIFE  
**Telefone:** (81)2126-3743 **E-mail:** cephcup@gmail.com

## ANEXO B - PARECER CEP – SPCC

SOCIEDADE PERNAMBUCANA  
DE COMBATE AO CÂNCER-  
SPCC



## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

## DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** (Avaliação Funcional e Clínica do Perfil das Galectinas em Tumores Primários do Trato Gastrointestinal).

**Pesquisador:** MARIA DE FATIMA DEODATO DE SOUZA

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 26501319.3.0000.5205

**Instituição Proponente:** SOCIEDADE PERNAMBUCANA DE COMBATE AO CÂNCER -SPCC

**Patrocinador Principal:** FUND APOIO CULTURA ENSINO PESQUISA E EXTENSÃO DE ALFENA

## DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 3.780.389

**Apresentação do Projeto:**

Os tumores do trato gastrointestinal (TGI) configuram grande parte dos tumores em humanos, apresentando elevada incidência e alta mortalidade. Apesar dos avanços nas últimas décadas no campo da biologia molecular, as abordagens para diagnóstico precoce e acompanhamento ainda permanecem limitadas. As galectinas desempenham importantes papéis no processo carcinogênico, incluindo a transformação e proliferação, regulação do ciclo celular, adesão, metástase entre outros. No entanto, os dados sobre os perfis de expressão das galectinas em tumores do trato digestivo ainda são discrepantes. Dessa forma, o estudo desses aspectos representa uma importante ferramenta que poderá identificar novos marcadores biológicos/ou alvos terapêuticos.

**Objetivo da Pesquisa:**

## 4. OBJETIVOS

## 4.1. OBJETIVO GERAL

Analisar comparativamente o perfil das galectinas em tumores do trato gastrointestinal visando sua utilização como biomarcador clínico ou alvo terapêutico.

## 4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar a expressão diferencial das galectinas em amostras de tumores do trato gastrointestinal através da imuno-histoquímica;

Endereço: Av. Cruz Cabugá, 1597

Bairro: Santo Amaro

CEP: 50.040-000

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)3217-8005

Fax: (81)3217-8005

E-mail: cep@hcp.org.br