



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS**

**EMERSON LUCENA DA SILVA**

**AVALIAÇÃO DO FENÓTIPO METABÓLICO TUMORAL DA LINHAGEM**  
**METASTÁTICA GÁSTRICA AGP-01**

**FORTALEZA**

**2020**

EMERSON LUCENA DA SILVA

AVALIAÇÃO DO FENÓTIPO METABÓLICO TUMORAL DA LINHAGEM  
METASTÁTICA GÁSTRICA AGP-01

Dissertação apresentada a coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas. Área de concentração: Farmacologia Clínica.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Raquel Carvalho Montenegro.

FORTALEZA

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária  
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

S579a Silva, Emerson Lucena da.  
Avaliação do fenótipo metabólico tumoral da linhagem metastática gástrica AGP-01 / Emerson Lucena da Silva. – 2020.  
88 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Fortaleza, 2020.  
Orientação: Profa. Dra. Raquel Carvalho Montenegro.

1. Câncer Gástrico. 2. Metástase. 3. Reprogramação metabólica tumoral. I. Título.

CDD 610

---

EMERSON LUCENA DA SILVA

AVALIAÇÃO DO FENÓTIPO METABÓLICO TUMORAL DA LINHAGEM  
METASTÁTICA GÁSTRICA AGP-01

Dissertação apresentada a coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas. Área de concentração: Farmacologia Clínica.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Raquel Carvalho Montenegro.

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Raquel Carvalho Montenegro (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Caroline de Fátima Aquino Moreira Nunes  
Centro Universitário Christus (Unichristus)

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Débora Castelo Branco de Souza Collares Maia  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

*Dedico este trabalho in memoriam a Alesson Lucena, meu  
irmão e amigo, que sempre acreditou nos meus sonhos.*

## AGRADECIMENTOS

Ao decorrer desses 18 meses de mestrado foi significativa a presença de algumas pessoas na minha jornada, muitos são os nomes que me vem à cabeça na hora de escrever essas linhas, algumas lágrimas também ao lembrar da contribuição de cada um de vocês, de maneira direta ou indireta, na conclusão de mais essa etapa da minha vida acadêmica, a cada um de vocês eu sou eternamente grato.

Dedico esse parágrafo de forma especial a minha família, Seu Antoniel e Dona Maria, muito obrigado por me apoiarem mesmo quando isso significou ter que ficar tão longe do abraço quentinho, dos cafés da manhã regrados a risada e dos almoços de domingo em família. Saibam que minha maior fonte de inspiração e força nesse período longe de casa foram vocês, que sempre foram exemplos de determinação, e por terem sempre regado em mim esses valores eu sou muito grato, amo vocês.

Aos meus amigos mais próximos, que muitas vezes foram meus co-orientadores, parceiros de academia, de festas, de disciplinas e de experimentos. Felipe e Adrhyann, obrigado pelas lições valiosas, pela paciência e pela confiança.

Aos meus amigos de laboratório, pessoas que fizeram do Farmagen minha segunda casa, a Laís, Luína, Emanuel, Júlio, Lucas, Lívia, Beatriz, Aline, Professora Carol e Professora Raquel obrigado por todos os ensinamentos.

Aos meus amigos que mesmo de longe sempre me apoiaram, Vanessa, Gustavo, Adriedson, Carla, Camila, Elen, Ronald, Sabrina, Iago, Neil, Carol Ramos, Vinicius, Lucas, Carol Rosal e Lorena obrigado por todo amor e apoio, nossa amizade transcende a distância, sei que sempre posso contar com vocês.

Aos meus amigos do Ceará, pessoas que me ajudaram a cultivar amor por essa terrinha. Thâmara, Vicente, Wallace, Larissa, Wesley obrigado por tornarem esses meses mais agradáveis. À todos vocês meus mais sinceros agradecimentos.

Aos órgãos de fomento como CAPES, FUNCAP e CNPq, assim como ao Núcleo de Pesquisa de Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM) e a unidade multiusuário, obrigado por terem tornado a minha pesquisa possível.

*“Aqueles que passam por nós não vão sós. Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós.”*

Antoine de Saint-Exupery

## RESUMO

O câncer gástrico (CG) é tido como um grande problema de saúde pública mundial por possuir altos níveis de incidência e mortalidade. Dentre as características associadas ao desenvolvimento do câncer, a reprogramação metabólica envolve a capacidade que a célula tumoral tem em modificar ou reprogramar seu metabolismo em diferentes condições, e assim, fornecer energia para suportar sua proliferação desordenada. Dessa forma, o objetivo desse trabalho é, primeiramente, avaliar o perfil metabólico de três linhagens tumorais gástricas (AGP-01, ACP-03 e ACP-02) e uma não neoplásica gástrica (MNP-01) quando cultivadas em diferentes condições de glicose e, posteriormente, estudar os mecanismos celulares e moleculares envolvidos na reprogramação metabólica da linhagem gástrica metastática AGP-01. Para avaliação do perfil metabólico, foram realizados os ensaios de viabilidade, consumo de glicose e atividade de LDH em três condições de cultivo (25, 5,5 e 0,5 mM de glicose). Em relação a viabilidade celular, foi observado uma diminuição em todas as linhagens analisadas apenas quando cultivadas em 0,5 mM de glicose, sendo os percentuais de viabilidade de aproximadamente 87%, 86%, 47% e 70% para as linhagens AGP-01, ACP-03, ACP-02 e MNP-01, respectivamente. Em relação ao consumo de glicose, foi visualizado que quando cultivadas em 0,5 e 5,5 mM, as linhagens AGP-01 e ACP-03 apresentaram maior atividade metabólica. Já em meio com 25 mM de glicose, as linhagens ACP-03 e ACP-02 apresentaram maior consumo de glicose. As linhagens AGP-01 e ACP-03 não apresentaram redução na atividade enzimática da LDH. Os resultados demonstram que as linhagens AGP-01 e ACP-03 apresentam um perfil metabólico glicolítico aeróbico, sendo a linhagem metastática AGP-01 escolhida para os demais ensaios. Foi observado que quando cultivada em 0,5 mM de glicose, a linhagem AGP-01 apresentou aumento de células em Sub-G1 (fragmentação celular), parada de ciclo em G0/G1, modificações morfológicas típicas de processo apoptótico, aumento de marcação com iodeto de propídio, de despolarização mitocondrial e da concentração de espécies reativas de oxigênio (EROS), diminuição na migração e na atividade de metaloproteinase (MMP) 9, assim como aumento na expressão de *GLUT1*, *GAPDH*, *LDHA*, *HPRT1*, *HIF1* e *TP53*. Já a linhagem AGP-01 quando cultivada em 5,5 mM apenas apresentou aumento no número de colônias e na expressão dos genes *HK1*, *GLUT1*, *GAPDH*, *LDHA*, *HPRT1*, *HIF1*, *C-Myc* e *TP53*, enquanto os outros parâmetros avaliados não mostraram diferenças significativas quando comparados a linhagem cultivada a 25 mM de glicose. Dessa forma, com o presente estudo foi observado o perfil metabólico glicolítico aeróbico da linhagem AGP-01, assim como suas modificações fenotípicas em meios com diferentes concentrações de glicose. Em condições fisiológicas de

glicose (5,5 mM) a linhagem apresenta aumento no perfil proliferativo ligado a aumento na expressão de enzimas relacionadas a vias biossintéticas celulares.

**Palavras-chave:** Câncer Gástrico. Metástase. Reprogramação metabólica tumoral



## ABSTRACT

Gastric cancer (GC) is a huge world public health problem corresponding to high levels of incidence and mortalities worldwide. Among cancer development characteristics associated, metabolic reprogramming involves cancer cell capability in modifying, or reprogramming, its metabolism in different conditions to supply energy in order to maintain cell hyperproliferation rate. Thus, the aim of this study is, firstly, evaluate the metabolic profile of three GC cell lines (AGP-01, ACP-03, and ACP-02) and a normal one (MNP-01) when cultivated in different glucose conditions, then, study cellular and molecular mechanisms involved in metabolic reprogramming of GC metastatic cell line AGP-01. For profile metabolic evaluation, viability, glucose uptake, and LDH activity assays were performed in medium with three different glucose concentrations (25, 5.5 and 0.5 mM of glucose). Was observed a decrease in the viability of all cell lines evaluated when cultivated in 0.5 mM of glucose, viability percentage was around 87%, 86%, 47%, and 70% for AGP-01, ACP-03, ACP-02, and MNP-01 cell lines, respectively. In glucose consumption analysis, it was observed that when cultured at 0.5 and 5.5 mM of glucose, AGP-01 and ACP-03 cell lines showed enhancing metabolic activity. In 25 mM of glucose, ACP-03 and ACP-02 showed higher glucose consumption. AGP-01 and ACP-03 cell lines did not evidence reducing in LDH intrinsic activity. Results showed that AGP-01 and ACP-03 cell lines exhibited an aerobic glycolytic metabolic profile, the AGP-01 metastatic cell line was chosen for subsequent analysis. AGP-01 when cultivated in 0.5 mM of glucose presented enhance in population of Sub-G1 cells (cellular fragmentation), cell cycle arrest in G0/G1, modification in cell morphology typical of apoptotic process, enhance in propidium iodide stained cells, in mitochondrial depolarization and in reactive oxygen species (ROS) production, reduce in migration and in metalloproteinase (MMP) 9 activity as wees ass, enhance in genic expression of *GLUT1*, *GAPDH*, *LDHA*, *HPRT1*, *HIF1*, and *TP53*, while other parameters evaluated showed no significant differences when compared to the cell line grown at 25 mM of glucose. AGP-01 cell line, when grown at 5.5 mM of glucose, only exhibited increased in colony number and in expression of *HK1*, *GLUT1*, *GAPDH*, *LDHA*, *HPRT1*, *HIF1*, *C-Myc*, and *TP53*. while the other parameters evaluated did not show significant differences when compared to the line grown at 25 mM of glucose. Thus, with the present study, the aerobic glycolytic metabolic profile of the AGP-01 strain was observed, as well as its phenotypic modifications in environments with different concentrations of glucose. When cultivated under physiological conditions of glucose (5.5 mM), the strain shows an increase in the proliferative profile linked to an increase in the expression of enzymes related to cellular biosynthetic pathways.

**Keywords:** Gastric cancer. Metastasis. Tumoral metabolic reprogramming.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - As etapas do processo de formação do câncer (carcinogênese).....	18
Figura 2 - Características fenotípicas associadas ao desenvolvimento do câncer. ....	20
Figura 3 - Processo de metástase tumoral.....	21
Figura 4 - Modelo esquemático da reprogramação metabólica tumoral.....	24
Figura 5 - Anatomia do estômago e processo de carcinogênese gástrica. ....	28
Figura 6 - Fluxograma do delineamento experimental do estudo.....	35
Figura 7 - Viabilidade de linhagens gástricas sob privação de glicose.....	53
Figura 8 - Análise do consumo de glicose em diferentes condições de cultivo .....	54
Figura 9 - Atividade intracelular da enzima LDH em linhagens gástricas cultivadas em diferentes concentrações de glicose .....	55
Figura 10 - A linhagem AGP-01 apresenta aumento no potencial proliferativo quando cultivada a 5,5 mM de glicose .....	56
Figura 11 - Diminuição na concentração de glicose leva a um aumento na fragmentação celular e arraste para G0/G1 na linhagem AGP-01.....	57
Figura 12 - Privação de glicose causa alterações morfológicas na linhagem AGP-01.....	58
Figura 13 - Privação de glicose causa aumento na permeabilidade de membrana celular e diminuição no potencial mitocondrial.....	59
Figura 14 - Baixa concentração de glicose leva ao aumento na produção de EROs na linhagem gástrica AGP-01 após 24 horas .....	60
Figura 15 - Diminuição da concentração de glicose influencia o perfil migratório da linhagem gástrica maligna AGP-01 .....	61
Figura 16 - Privação de glicose diminui a atividade de MMP9 na linhagem gástrica maligna AGP-01 após 24 horas .....	62
Figura 17 - A alteração na concentração de glicose modula a expressão gênica na linhagem gástrica maligna AGP-01 .....	63

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características das linhagens celulares utilizadas no estudo.....	36
Tabela 2 - Componentes utilizados para confecção do SDS-PAGE modificado.....	49
Tabela 3 - Sequências de oligonucleotídeos usados na qPCR e vias relacionadas. ....	51
Tabela 4 - Comparação dos resultados da caracterização fenotípica da linhagem AGP-01 .	63

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3-BP	3-bromopiruvato
AMPK	Proteínas quinase ativada por AMP
ATP	Adenosina Trifosfato
CDKs	quinases dependentes de ciclinas
cDNA	DNA Complementar
CG	Câncer Gástrico
CT	Ciclo Limite
d	Espessura da solução
DAPI	4',6'-diamino-2-fenil-indol
DCA	Dicloroacetato
DCFH-DA	2'-7'-diclorofluorescina diacetato
DMEM	Meio Eagle - Modificado por Dulbecco
ELFE	Epirrubicina, Leucovorin, 5-flourouracil e Etoposídeo em combinação
ERK	Quinase regulada por sinal extracelular
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
Ex/Em	Excitação/Emissão
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GLUT	Transportadores de glicose
GOD	Glicose oxidase
HIF1	Fator Indutor de Hipóxia 1
HK	Hexoquinase
IDH	Índice de Desenvolvimento Humano
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IP	Iodeto de Proppidio
JNK	c-Jun-N-terminal
LDH	Lactato Desidrogenase
MAPK	Quinases ativadas por mitógenos p-38
MB	Membrana Basal
MEC	Matriz Extracelular
mM	Milimolar
MMPs	Metaloproteinases

mTOR	Alvo de Mamíferos da rapamicina
NADH	Dinucleótido de Nicotinamida e Adenina
NCI	Instituto Nacional do Câncer Americano
nm	nanômetro
OXPPOS	Fosforilação Oxidativa
PBS	Tampão Fosfato-salina
PCM2	Piruvato Quinase M2
PDHK1	Piruvato Desidrogenase Quinase 1
PDK	Piruvato Desidrogenase Quinase
PFK	Fosfofrutoquinase
PGI	Fosfoglicose Isomerase
PGK	Fosfoglicerato Quinase
PGM	Fosfoglicerato Mutase
PK	Piruvato Quinase
POR	Peroxidase
PPP	Via das Pentoses Fosfato
PUMA	Proteína Moduladora de Apoptose Regulada por p53
R123	Rodamina 123
RT-PCR	PCR em Tempo Real
SBF	Soro Bovino Fetal
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SGLT	Transportadores de Sódio-glicose
SIP1	Proteína de Interação a Smad 1
TA	Temperatura Ambiente
TCA	Ciclo dos Ácidos Tricarboxílicos
TEM	Transição Epitélio-mesenquimal
TMPK	Timidilado Quinase
TPI	Triose-Fosfato Isomerase
TRAIL	Ligante indutor de Apoptose Relacionado ao TNF
TSGs	Genes Supressores Tumorais
Va	Volume da amostra
VEGF	Fator de Crescimento Vascular Endotelial
Vt	Volume total

$\Delta\psi_m$             Potencial de Membrana Mitocondrial  
 $\epsilon$                 Absortividade mM do NADH

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	17
<b>1.1</b>	<b>Câncer</b> .....	17
<b>1.1.1</b>	<i>Metástase tumoral</i> .....	20
<b>1.1.2</b>	<i>Metabolismo tumoral</i> .....	22
<b>1.2</b>	<b>Câncer gástrico</b> .....	26
<b>1.2.1</b>	<i>Epidemiologia</i> .....	26
<b>1.2.2</b>	<i>Classificação</i> .....	27
<b>1.2.3</b>	<i>Tratamento</i> .....	29
<b>1.2.4</b>	<i>Linhagens tumorais gástricas</i> .....	30
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	32
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	34
<b>3.1</b>	<b>Objetivo Geral</b> .....	34
<b>3.2</b>	<b>Objetivos Específicos</b> .....	34
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	35
<b>4.1</b>	<b>Delineamento experimental</b> .....	35
<b>4.2</b>	<b>Cultivo celular</b> .....	36
<b>4.3</b>	<b>Ensaio de citotoxicidade por exclusão com azul de tripan</b> .....	37
<b>4.4</b>	<b>Captação de glicose</b> .....	38
<b>4.5</b>	<b>Atividade da enzima Lactato Desidrogenase (LDH)</b> .....	39
<b>4.6</b>	<b>Ensaio clonogênico</b> .....	41
<b>4.7</b>	<b>Análise de ciclo celular</b> .....	42
<b>4.8</b>	<b>Análise de alterações morfológicas pela colocação com Panótico</b> .....	43
<b>4.9</b>	<b>Integridade de membrana plasmática e potencial de membrana mitocondrial</b> <b>(<math>\Delta\psi_m</math>)</b> .....	44
<b>4.10</b>	<b>Quantificação de espécies reativas de oxigênio (EROs)</b> .....	46



4.11	Ensaio de migração celular .....	47
4.12	Atividade de metaloproteinases por Zimografia.....	48
4.13	Isolamento de mRNA e análise de expressão gênica por RT-qPCR .....	50
5	<b>RESULTADOS</b> .....	53
5.1	Viabilidade celular .....	53
5.2	Avaliação do perfil de consumo de glicose.....	53
5.3	Atividade enzimática LDH.....	54
5.4	Avaliação do potencial proliferativo .....	55
5.5	Avaliação de alterações no ciclo celular e fragmentação.....	56
5.6	Avaliação de modificações morfológicas.....	57
5.7	Avaliação da integridade de membrana e potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ) .....	58
5.8	Avaliação dos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs).....	59
5.9	Avaliação do potencial migratório.....	60
5.10	Avaliação da atividade de metaloproteinases.....	61
5.11	Análise de expressão de mRNA .....	62
6	<b>DISCUSSÃO</b> .....	66
7	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	73
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	74

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Câncer

O câncer pode ser caracterizado como um conjunto de mais de 277 doenças que possuem em comum a capacidade de crescimento desordenado e aumento no potencial invasivo em outros órgãos e tecidos do corpo. Essa grande variedade de tipos de câncer se reflete nos vários tipos de células do corpo, quando se origina de células do tecido epitelial, como pele ou mucosa, são denominados de carcinomas, caso derivem do tecido conjuntivo, como osso, músculo ou cartilagem, são chamados de sarcomas. Aqueles que derivam de tecidos formadores de células hematopoiéticas e de células do sistema imune são conhecidos como leucemias e linfomas/mielomas, respectivamente, e os derivados do cérebro e da medula como tumores do sistema nervoso central (GUPTA; DWIVEDI, 2017; HASSANPOUR; DEHGHANI, 2017).

Para o desencadeamento do câncer, é necessário que ocorram uma série de mutações genéticas que levam a modificações fenotípicas alterando as funções celulares normais. Genes que controlam as funções, como crescimento, sobrevivência, invasão e motilidade, têm a sua expressão aumentada em células malignas, e os genes que tem a função de suprimir esses eventos, apresentam repressão na expressão, levando a uma multiplicação celular descontrolada. Isso ocorre devido ao acúmulo de mutações, embora mudanças epigenéticas também possam corroborar com o processo de formação do câncer (carcinogênese). Essas mutações podem ser causadas por compostos químicos, fatores ambientais, estilo de vida e ainda por infecções por microrganismos como vírus, bactérias e fungos (BLACKADAR, 2016; HANAHAN; WEINBERG, 2011, 2000).

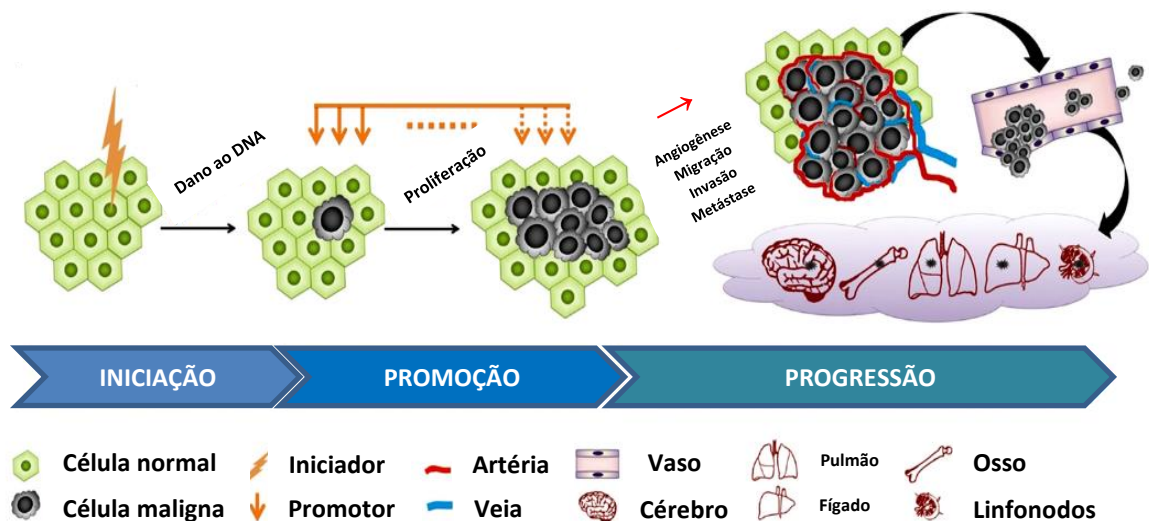
O processo carcinogênico pode ocorrer de maneira gradual, levando vários anos para que uma única célula cancerosa se desenvolva e dê origem ao tumor. Para o desenvolvimento do tumor, a célula passa por diversos estágios de crescimento e adaptação, estes podem ser sintetizados em três etapas: iniciação, promoção e progressão (LIU *et al.*, 2015).

A iniciação é o primeiro estágio do desenvolvimento do tumor. Nesta fase, moléculas iniciadoras (agentes cancerígenos ou carcinógenos) entram em contato com o microambiente celular e implicam em danos não reparados ao DNA, causando mutações. Quanto maior a exposição a essas moléculas iniciadoras, maior é o risco do desenvolvimento do tumor (IRIGARAY; BEMPOMME, 2010).

A promoção é o segundo estágio, acometendo as células já iniciadas (mutadas). Agentes promotores têm o papel de aumentar a taxa de proliferação, criando um maior número de células defeituosas portadoras das mutações. Os agentes promotores não têm efeito direto sobre o DNA, mas sim em receptores celulares, levando a alteração de vias de sinalização e ao aumento de proliferação celular. Os promotores podem ainda ser divididos em duas categorias: promotores específicos, que interagem com receptores em células alvo e promotores não específicos, que alteram a expressão de genes sem o envolvimento de um receptor conhecido. Os promotores não levam a formação do tumor de maneira isolada, estes apenas aumentam a expansão celular das células já iniciadas, levando assim a formação de células malignas (KLAUNIG; KAMENDULIS; XU, 2000).

O terceiro e último estágio da carcinogênese é a etapa de progressão celular. Nesta, a célula passa por uma série de transformações, saindo de um estado benigno para um maligno. Este estágio está associado a mudanças no genótipo celular juntamente com o aumento da taxa de proliferação, da capacidade invasiva e metastática, além de alterações bioquímicas e morfológicas ocasionadas pelo acúmulo de mutações e/ou pela instabilidade genética (OLIVEIRA *et al.*, 2007). Neste nível de desenvolvimento, a formação do tumor é irreversível. Na figura 1 podemos observar de maneira simplificada as etapas do processo carcinogênico.

Figura 1 - As etapas do processo de formação do câncer (carcinogênese).



Fonte: adaptada de LIU *et al.*, 2015.

Como visto, no desenvolvimento da neoplasia, a progressão celular e a sua interação com o ambiente são alteradas e isso resulta de disfunções em genes vitais para manter a homeostasia tecidual. As mutações ocorrem em genes conhecidos como proto-oncogenes e em

genes supressores tumorais, que levam a proliferação celular descontrolada e permitem a aquisição das características das células cancerosas observadas na maioria das neoplasias (REBUCCI; MICHIELS, 2013).

Proto-oncogenes, são genes que controlam a proliferação celular, sobrevivência e a capacidade de invasão e motilidade das células normais, por isso a expressão desses genes é cuidadosamente regulada para evitar a proliferação celular descontrolada. Quando mutados, esses genes são denominados de oncogenes, causando aumento na proliferação celular, aumento da capacidade de sobrevivência e disseminação, devido ao descontrole na maquinaria de divisão. Esses genes são fenotipicamente dominantes, sendo necessária apenas uma mutação em uma de suas cópias para promover a perda no controle do ciclo celular. Podem ter sua expressão aumentada através de modificação na sequência do gene, de uma amplificação desse gene no genoma da célula ou pela translocação do mesmo para outra região, aonde sob a influência de um novo promotor pode ter aumento na produção de transcritos (HARRINGTON, 2016; WANG *et al.*, 2018).

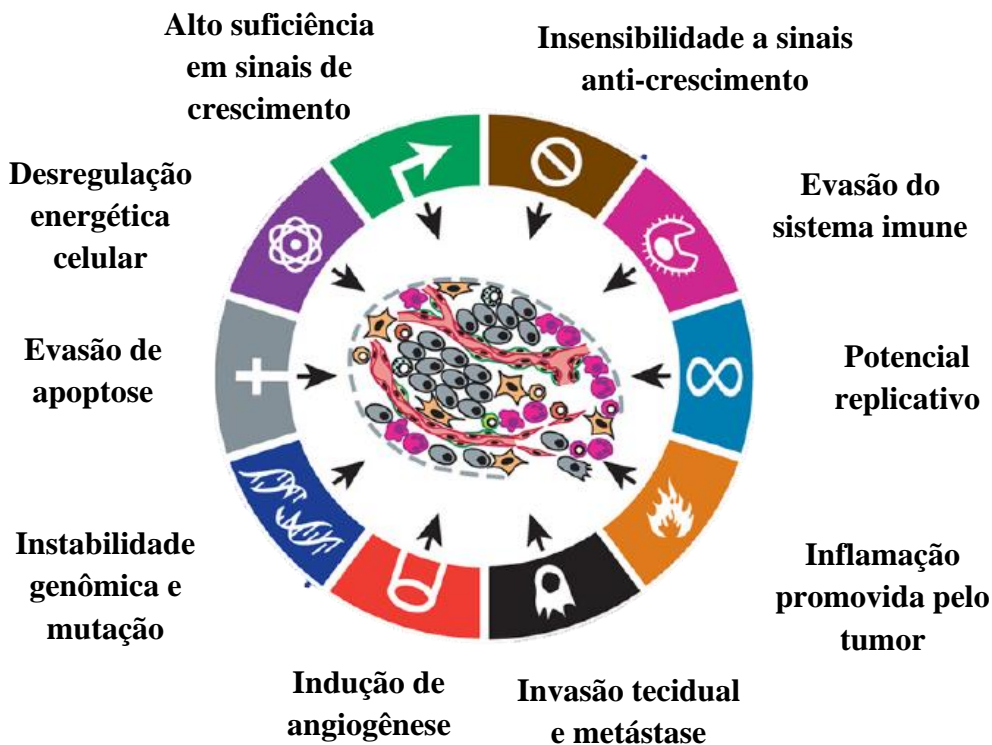
Os genes supressores tumorais (TSGs), tem como função inibir a proliferação e a sobrevivência celular por estarem relacionados com a repressão do ciclo e controle de vias de morte, tentando assim, manter a homeostase do organismo e a integridade celular. Em 1997, Kinzler e Vogelstein dividiram os TSGs dentro de duas categorias: os genes guardiões (*gatekeeper*) que controlam como ocorre o progresso da célula, através de ciclos de crescimento e divisão e os genes cuidadores (*caretaker*), que possuem a função de manter a integridade do genoma celular. Quando esses genes são inativados tendem a aumentar a vantagem de crescimento seletiva das células mutadas sobre as células normais (HARRINGTON, 2016; WANG *et al.*, 2018).

Os TSGs são fenotipicamente recessivos, ou seja, é necessário o silenciamento de ambas as cópias do gene para levar ao desenvolvimento da doença. A inativação de apenas uma cópia do gene é geralmente seguida pela perda da cópia restante, levando assim, ao surgimento do fenótipo tumoral (MORRIS; CHAN, 2015). Podem sofrer inativação por diversos mecanismos, como deleções locais ou em larga escala e pela perda de heterozigosidade, introdução de códon da parada em regiões aleatórias da sequência ou pela modificação no quadro de leitura (*frameshifts*), além disso, essa inativação pode ocorrer por mutações em íntrons que inativam sítios de *splice* de pré-mRNA, levando a formação de proteínas não funcionais (VOGELSTEIN *et al.*, 2013).

Dessa forma, com o intuito de entender melhor a natureza do câncer e assim traçar novas terapias contra a doença, em 2000, Hanahan e Weinberg descreveram seis marcas

características do desenvolvimento do câncer, dentre elas estão: evasão da via apoptótica, alto suficiência em sinais de crescimento celular, insensibilidade a sinais que impedem o crescimento, invasão tecidual e metástase, potencial replicativo ilimitado e a capacidade das células cancerosas em criar novos vasos para nutrir o tumor. Em 2011, os mesmos autores adicionaram quatro novas características dentro de duas classes, na classe das características facilitadoras temos a instabilidade genômica e mutação e além disso a inflamação promovida pelo tumor, e dentre as características emergentes estão a desregulação energética celular e o mecanismo de escape do sistema imune, todas estando relacionadas ao processo de tumorigênese (FIGURA 2).

Figura 2 – Características fenotípicas associadas ao desenvolvimento do câncer.

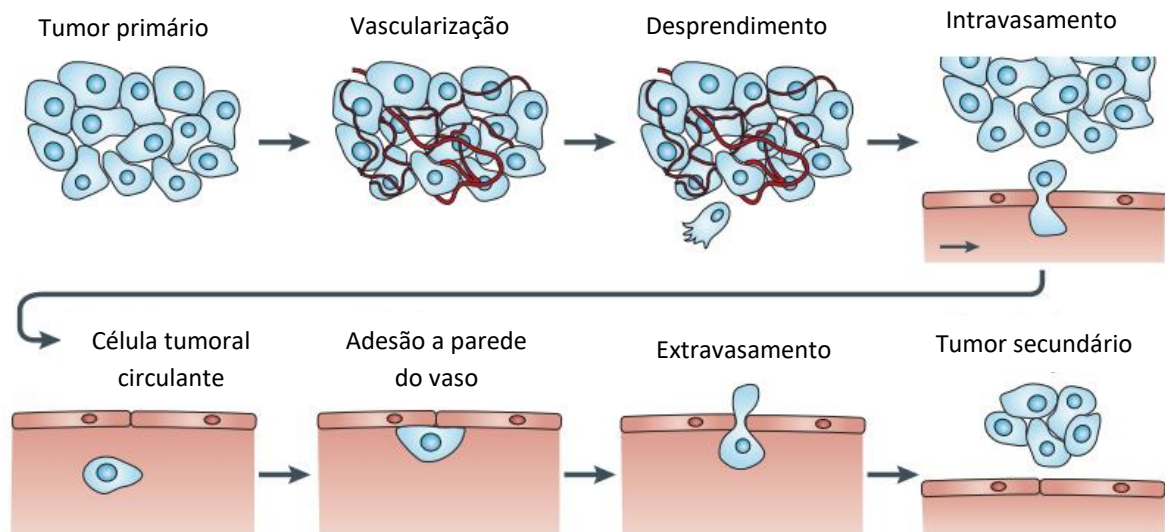


Fonte: Adaptada de HANAHAN; WEINBERG, 2011.

### 1.1.1 Metástase tumoral

O processo metastático tumoral se caracteriza pela disseminação de células do tumor primário para um sítio diferente localizado em um local distante, isso ocorre através da corrente sanguínea e/ou dos vasos linfáticos (WIRTZ *et al.*, 2011). Como visualizado na figura 3, esse processo se deriva de uma sucessão de eventos (cascata de invasão-metástase).

Figura 3 - Processo de metástase tumoral.



Fonte: adaptada de WIRTZ *et al.*, 2011.

Em síntese, nessa cascata ocorre o desenvolvimento de novos vasos (angiogênese) no tumor primário, saída das células metastáticas (desprendimento e migração), invasão da membrana basal (MB) e da matriz extracelular (MEC), invasão da MB que rodeia o endotélio do capilar sanguíneo ou do vaso linfático, intravasamento das células metastáticas na corrente sanguínea e/ou no vaso linfático, adesão das células ao endotélio do capilar próximo ao sítio da metástase, invasão das células (extravasamento) e por fim o estabelecimento, proliferação e formação de um tumor secundário no órgão alvo (GUAN, 2015; WIRTZ *et al.*, 2011).

Em condições normais, quando uma célula de perfil endotelial ou epitelial se desprende da MEC um mecanismo apoptótico é desencadeado (*anoikis*), esse mecanismo de morte tem como objetivo impedir que células de organismos multicelulares se estabeleçam em outro local fora da sua localização anatômica correta. Dessa forma, as células metastáticas primeiramente devem desenvolver mecanismos de adaptação e sobrevivência ao se desprender do tecido de ancoragem, em outras palavras, devem se tornar resistente a *anoikis* (ALIZADEH; SHIRI; FARSINEJAD, 2014).

A resistência a *anoikis*, assim como outras modificações na célula tumoral (adesão célula-célula ou célula-matriz de adesão, polaridade celular e em propriedades invasivas e migratórias), em conjunto, são conhecidas como transição epitélio-mesenquimal (TEM), sendo característica de células metastáticas malignas. Nesse processo, as linhagens saem de um estado morfológico epitelial para um mesenquimal, caracterizado pela diminuição na expressão de proteínas de ancoragem como E-caderina e aumento de marcadores mesenquimais como vimentina e N-caderina. A E-caderina é reprimida de maneira transcricional pelos fatores de

transcrição ZEB-1, ZEB-2, Snail e Slug, proteína de interação a Smad 1 (SIP1) e proteína TWIST1, sendo hipereexpressos em cânceres com elevado potencial metastático (LAMOUILLE *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2017).

Os processos de migração e invasão, que geralmente sucedem o desprendimento, são pontos críticos no processo metastático. A célula é capaz de penetrar a MEC através de dois mecanismos distintos: migração celular mesenquimal (fibroblastóide) e migração celular ameboide. A migração mesenquimal depende da atividade de enzimas proteases para degradação de componentes da MEC, como as metaloproteinases de matriz (MMPs). Entretanto, a migração mesenquimal também é utilizada apenas por fibroblastos, células endoteliais e musculares. O processo de migração ameboide, por outro lado, é independente da ação de proteases, utilizando apenas força mecânica para invadir a MEC ao invés de degradá-la (ALIZADEH; SHIRI; FARSINEJAD, 2014).

A interação do tumor com o microambiente tumoral está amplamente relacionada aos processos da cascata de invasão metástase. O microambiente tumoral inclui a região que rodeia o tumor e o estroma, elementos efetores do sistema imune, plaquetas, fibroblastos, células endoteliais, proteases, citocinas, hormônios entre outros. Em conjunto, estes estão envolvidos em vias de comunicação com as células que formam o tumor, afetando seu crescimento, capacidade angiogênica e a metastática (GOUBRAN *et al.*, 2014).

Os mecanismos de interação entre as células que formam o tumor e o microambiente são complexos e bem articuladas, sendo geralmente simplificados em duas categorias. O mecanismo dependente de contato envolve moléculas de adesão célula-célula e célula-MEC, e o mecanismo independente de contato está relacionado a moléculas solúveis como fatores de crescimento, quimiocinas e citocinas. Estas, por sua vez, agem como quimioatrativas, na angiogênese/linfangiogênese, como reguladoras da TEM e da adesão celular, ajudando no processo de direcionamento e no intravasamento/extravasamento das células metastáticas (ALIZADEH; SHIRI; FARSINEJAD, 2014; JIANG; ABLIN, 2011).

### **1.1.2 Metabolismo tumoral**

Dentre as dez marcas associadas ao desenvolvimento do câncer descritas por Hanahan e Weinberg (2011) (FIGURA 2), a reprogramação metabólica consta como uma marca emergente devido ao grande número de pesquisas recentes na área. A reprogramação metabólica tumoral envolve a capacidade que a célula neoplásica tem em modificar, ou reprogramar, seu metabolismo para assim fornecer energia suficiente para proliferação celular contínua no câncer.

Estudos têm relatado modificações em diversas vias metabólicas tumorais, como aumento da regulação da via da pentose-fosfato, da síntese de lipídios e aminoácidos, do consumo de glutamina (CHOI; PARK, 2018; JIN; ZHOU, 2019; LUKEY; KATT; CERIONE, 2017; POPE *et al.*, 2019). Além dessas, a via glicolítica apresenta grande relevância para a tumorigênese por estar no centro do metabolismo celular e por fornecer grande quantidade de energia através da quebra de glicose, além de estar relacionada as vias de biossíntese de DNA, RNA e fosfolipídios, macromoléculas essenciais para divisão celular (FADAKA *et al.*, 2017).

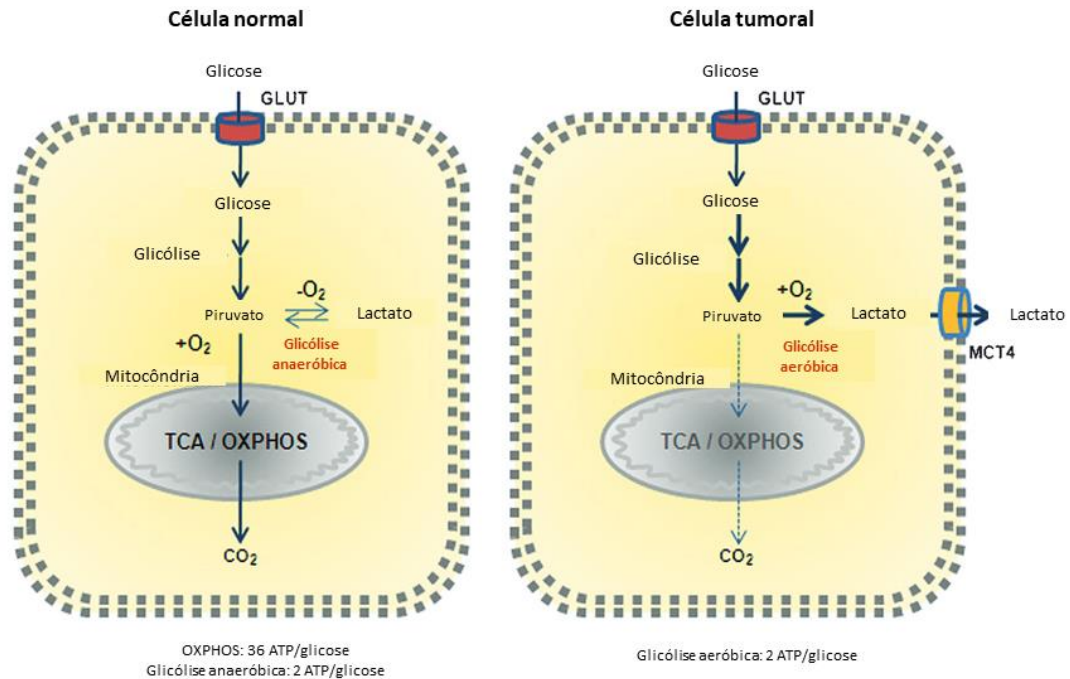
#### *1.1.2.1 Via glicolítica aeróbica*

A glicose é a fonte de matéria prima energética muito importante, podendo ser metabolizada de duas maneiras: por glicólise sob condições anaeróbicas (fermentação) e oxidada sobre glicólise aeróbica. A glicólise é um processo metabólico que visa converter o substrato (glicose) em piruvato no citoplasma celular, esse, é fonte de energia sobre a forma de adenosina trifosfato (ATP) através de reações bioenergéticas subsequentes. Ao todo, a via glicolítica apresenta 10 reações as quais são catalisadas por 10 enzimas específicas, sendo elas em ordem: hexoquinase (HK), fosfoglicose isomerase (PGI), fosfofrutoquinase (PFK), aldolase, triose-fosfato isomerase (TPI), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), fosfoglicerato quinase (PGK), fosfoglicerato mutase (PGM), enolase e piruvato quinase (PK) (LI; GU; ZOU, 2015).

Na década de 20, o pesquisador Otto Warburg demonstrou que células cancerosas exibiam alterações no seu metabolismo quando comparadas às células normais (FIGURA 4). Em condições aeróbicas, células normais metabolizam glicose, primeiramente em piruvato, pela via glicolítica (glicólise) no citosol celular e então em dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) na mitocôndria, através do ciclo de Krebs/ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA), e posteriormente pela fosforilação oxidativa (OXPHOS). Em condições anaeróbicas, a glicólise é priorizada, e a concentração de piruvato enviado à mitocôndria diminui. Em células tumorais, mesmo na presença de oxigênio, o metabolismo é reprogramado e a produção de energia ocorre majoritariamente pela via glicolítica, com a fermentação de glicose e produção de lactato, sendo chamada de glicólise aeróbica ou efeito Warburg (LIBERTI; LOCASALE, 2016).



Figura 4 – Modelo esquemático da reprogramação metabólica tumoral.



Fonte: Adaptada de MARIE; SHINJO, 2011.

Essa reprogramação metabólica primeiramente parece desvantajosa para as células tumorais, pois a quantidade de ATP gerada pelo metabolismo mitocondrial é 18 vezes menos eficiente quando comparada com a via glicolítica aeróbica com formação de lactato. Entretanto, essa baixa produção de ATP é compensada pela maior expressão de transportadores de glicose (GLUT) e das enzimas da via, aumentando a importação de glicose para o citoplasma celular, a conversão desse em piruvato e assim a produção final de energia (HEIDEN; CANTLEY; THOMPSON, 2009).

A hiperproliferação celular depende do aumento do número de ciclos replicativos, incluindo a síntese de novas macromoléculas celulares como DNA, RNA, proteínas e lipídios. Na via glicolítica aeróbica, a partir da glicose intracelular, são produzidos vários intermediários que são essenciais para a biossíntese dessas macromoléculas, sendo um modelo eficiente para sustentar a proliferação descontrolada (HEIDEN; CANTLEY; THOMPSON, 2009; HUME; WEIDEMANN, 1979).

A modificação metabólica celular também depende de fatores genéticos, a ativação de oncogenes e a perda de função de genes supressores tumorais promovem a reprogramação metabólica (BOROUGHES; DEBERARDINIS, 2015). A via das proteínas quinase ativada por AMP (AMPK) e a do alvo de mamíferos da rapamicina (mTOR) estão envolvidas com a via glicolítica tumoral. A via PI3K/AKT aumenta de maneira significativa a glicólise aeróbica, na

qual o gene *AKT* ativado promove o aumento da expressão do transportador GLUT1 (LI; GU; ZOU, 2015; ROBEY; HAY, 2006).

Oncogenes como fator indutor de hipóxia 1 (*HIF1*) e *c-Myc* também tem um importante papel no metabolismo tumoral pela regulação de enzimas importantes para via glicolítica. A hiperexpressão do gene *c-Myc* tem sido descrita em diversos tipos de câncer e tem papel fundamental na absorção de glutamina e a sua utilização em vias do metabolismo celular como o Ciclo de Krebs (TCA), além disso, a proteína *c-Myc* promove o aumento da glicólise aeróbica pelo aumento de expressão de GLUT1 e da enzima lactato desidrogenase (LDH) (DANG *et al.*, 2009; WISE *et al.*, 2008).

O fator de transcrição *HIF1* está associado a condições de estresse celular por ser expresso em situações com baixo oxigênio (hipóxia), além disso, têm efeito na regulação positiva de GLUT1 e ativa a enzima piruvato desidrogenase quinase (PDK), diminuindo a respiração mitocondrial pela inativação de PK. O gene supressor tumoral *p53* também tem um papel chave no metabolismo tumoral, esse gene quando ativo estimula a OXPHOS de maneira direta, a inativação desse gene leva a reprogramação metabólica e troca do metabolismo mitocondrial para o glicolítico (LI; GU; ZOU, 2015).

#### 1.1.2.2 Metabolismo como alvo terapêutico

No ambiente tumoral, devido à alta taxa de proliferação celular e ao metabolismo aeróbico, o ambiente se torna extremamente ácido, com baixa concentração de oxigênio e glicose, levando a uma competição por nutrientes (YIN *et al.*, 2019). Em resposta a modificações nas condições nutricionais, as células tumorais passam por alterações em vias bioquímicas, essa plasticidade tumoral é essencial para o processo de reprogramação metabólica e adaptação celular, assegurando assim a manutenção da proliferação do tumor (BISWAL *et al.*, 2017).

Estudos recentes tem demonstrado o efeito da variação de glicose em modelos *in vitro* de câncer em vários sítios distintos como mama (GUPTA; TIKOO, 2013; SUN *et al.*, 2019), ovário (MA *et al.*, 2019), próstata (LI *et al.*, 2018), tireoide (BIKAS *et al.*, 2015), cérebro (BAO *et al.*, 2019), pulmão (ALISSON-SILVA *et al.*, 2013), estômago (ZHAO *et al.*, 2015), colón (MA *et al.*, 2014), pâncreas (LUO *et al.*, 2018) e vias biliares (PHOOMAK *et al.*, 2017). Esses estudos tem como objetivo melhor compreender os mecanismos relacionados as vias de proliferação celular, replicação, morte, metástase e resistência a quimioterápicos em diferentes ambientes nutricionais. Trabalhos clínicos também têm buscado esclarecer a relação entre o

elevado nível de glicose e a diminuição na sobrevivência dos pacientes, assim como o aumento do perfil malignidade do tumor (LUQUE *et al.*, 2017; MONZAVI-KARBASSI *et al.*, 2016; SUN *et al.*, 2019; ZHU *et al.*, 2017).

Devido a importância da reprogramação metabólica para o desenvolvimento do câncer, e da relevância da via glicolítica aeróbica para esse processo, a pesquisa de novos fármacos com alvo direto no metabolismo celular se mostra promissora. A terapia com alvo na via glicolítica aeróbica é uma estratégia para aumentar a seleção das linhagens tumorais, que são dependentes dessa via para produção de energia, a células normais, diminuindo assim os efeitos adversos no tratamento (XINTAROPOULOU *et al.*, 2015).

Já existem alguns estudos que avaliam inibidores de transportadores e de enzimas glicolíticas, como os inibidores de GLUT1: floretina, quercetina e WZB117 (CHAN *et al.*, 2011; MARTIN; KORNMANN; FUHRMANN., 2003), inibidores de hexoquinase II como o 3-BP (3-bromopiruvato) (CARDACI; DESIDERI; CIRIOLO, 2012), inibidores de fosfoflutoquinase como o 3PO e PFK158 (CLEM *et al.*, 2008; GRANCHI; FANCELLI; MINUTOLO, 2014), inibidores de PDHK1 (Piruvato Desidrogenase Quinase 1) como o Dicloroacetato (DCA) (MICHELAKIS; WEBSTER; MACKEY, 2008; SUN *et al.*, 2010) e ácido oxâmico e NHI-1 que inibem a enzima LDH (FIUME *et al.*, 2011; GRANCHI *et al.*, 2011).

## **1.2 Câncer gástrico**

### ***1.2.1 Epidemiologia***

O câncer gástrico (CG) está entre as neoplasias mais incidentes do mundo, sendo considerado o quinto tipo de câncer mais frequente, excluindo o câncer de pele não melanoma, acometendo mais de 1 milhão de pessoas (5,7% dos casos). Se torna um grave problema de saúde mundial, visto que, apesar de ocupar a quinta posição na incidência, é considerado o terceiro mais letal com cerca de 780 mil mortes notificadas em 2018 (8,2% de todas as mortes causadas por neoplasias). O CG é duas vezes mais frequente em homens, sendo o quarto câncer mais diagnosticado (7,2%) e o terceiro em mortalidade (9,5%). Na população feminina, essa neoplasia corresponde a sétima mais frequente (4,1%) e a quinta que mais causa óbitos nessa população (6,5%) (BRAY *et al.*, 2018).

No Brasil, estimam-se 13.540 novos casos em homens e 7.750 em mulheres para cada ano do biênio 2018-2019, fazendo dessa neoplasia a quarta e a sexta mais frequente em cada

sexo, respectivamente. Sem considerar os tumores de pele não melanoma, o câncer de estômago em homens é o segundo mais frequente nas Regiões Norte (12,35/100 mil) e Nordeste (11,17/100 mil), nas Regiões Sul (17,12/100 mil) e Centro-Oeste (11,52/100 mil) corresponde a quarta neoplasia mais frequente e na Região Sudeste (13,46/100 mil), ocupa a quinta posição. Para o sexo feminino, é o quinto mais frequente nas Regiões Sul (8,95/100 mil), Centro-Oeste (6,52/100 mil) e Norte (5,34/100 mil), sendo que nas Regiões Nordeste (7,16/100 mil) ocupa a sexta posição e na Sudeste (7,41/100 mil) a sétima (INCA, 2018).

Apesar da alta prevalência, previsões para o ano de 2025 sugere diminuição na incidência do CG, assim como a sua mortalidade, como já vem sendo observado, estando associado a modificações nos hábitos de vida da população mundial. Estudos também relatam um aumento na sobrevida nos pacientes de até 30% em cinco anos (JEMAL *et al.*, 2017).

O desenvolvimento do CG está associado a vários fatores em conjunto, sendo determinados pela combinação de fatores genéticos e ambientais. Cerca de metade dos casos de CG estão relacionados ao acúmulo de mutações causadas por fatores ambientais, como dieta rica em sal e carboidratos, consumo de comidas contendo conservantes e redução na inserção de frutas e vegetais na alimentação (KOBAYASHI, 2018; TOMASETTI; LI; VOGELSTEIN, 2017). As infecções crônicas pela bactéria *Helicobacter pylori* e pelo vírus Epstein-Barr também contribuem para o desenvolvimento da carcinogênese gástrica, já os fatores hereditários correspondem em menos de 3% dos casos apresentados (DE SOUZA *et al.*, 2018; RAMOS *et al.*, 2018).

### **1.2.2 Classificação**

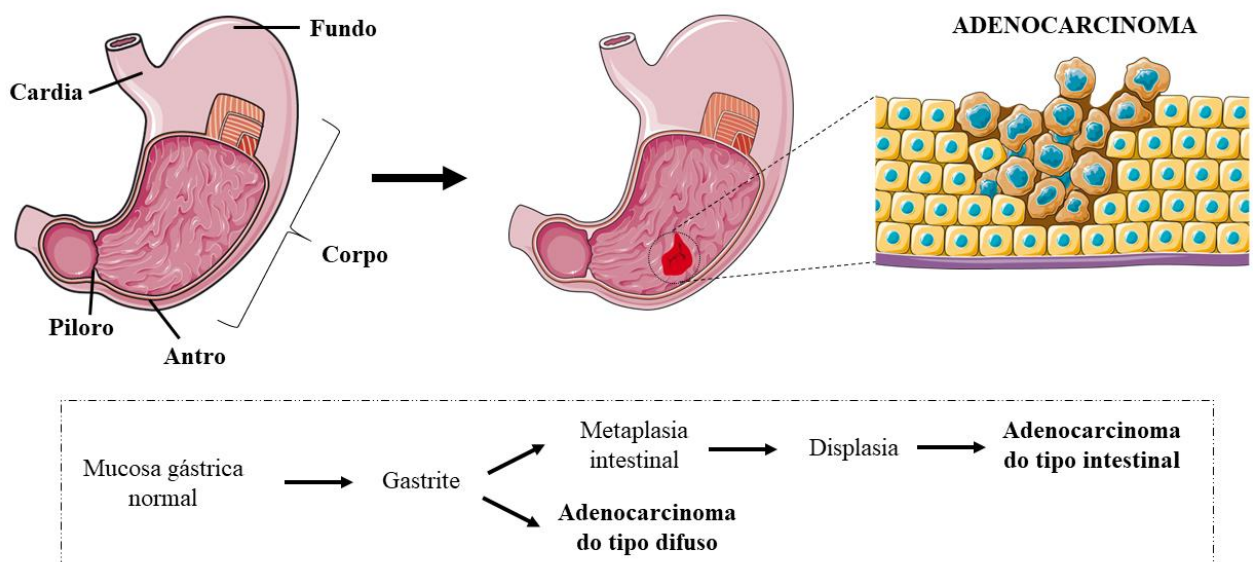
O CG é uma patologia heterogênea com relação a sua localização anatômica e subtipos histológicos. Mais de 90% dos CG são do tipo adenocarcinoma e podem se desenvolver na região da cardia ou na região não cardia (corpo, fundo e piloro) do estômago. Quando esse tipo tumoral acomete a cardia, geralmente está associado com refluxo gastroesofágico, infecção por *H. pylori*, gastrite atrófica, fumo, dieta e afetando mais a população masculina (MCCOLL, 2006). Apesar de aumento dos adenocarcinomas nas regiões da cardia, os da região da não cardia permanecem como os mais frequentes em áreas com grande incidência de CG (FERRO *et al.*, 2014).

De acordo com a classificação de Lauren, os adenocarcinomas que acometem as regiões do corpo, fundo e piloro (não cardia) são subdivididos ainda em duas variantes diferentes histologicamente, sendo as do tipo intestinal e do tipo difuso (LAUREN, 1965). O tipo intestinal tem como característica a presença de adesão celular, capacidade de formar estruturas

semelhantes a glândulas, localização distal no estômago e possui aumento na capacidade invasiva, sendo mais frequente em pacientes de mais idade e do sexo masculino (MA *et al.*, 2016; SITARZ *et al.*, 2018). O tipo intestinal é geralmente precedido por uma fase pré-cancerosa, tendo início com a transição da mucosa normal para uma gastrite atrófica, em seguida a essa alteração, ocorre o desenvolvimento de uma metaplasia intestinal, que evolui para uma displasia e para formação do adenocarcinoma (CORREA, 1992).

No tipo difuso, entretanto, as células possuem falta de aderência e são pouco diferenciadas, afetando pacientes de faixa etária mais baixas, sendo associado a fatores genéticos (OLIVEIRA *et al.*, 2013). Esse tipo de adenocarcinoma também é originado de uma lesão na mucosa normal (gastrite), ainda assim, possui menor relação com fatores ambientais do que o tipo intestinal, embora a infecção por *H. pylori* também esteja envolvida na carcinogênese do tipo difuso. Entretanto, diferentemente do tipo intestinal, no tipo difuso ocorre o desenvolvimento do adenocarcinoma como resultado da inflamação crônica, sem ser necessário os passos intermediários característicos do tipo intestinal (FIGURA 5). O tipo difuso, pode acometer toda a superfície do órgão, tem incidência em homens e mulheres na mesma proporção e está associado com um pior prognóstico e taxa de sobrevivência (CASTAÑO-RODRÍGUEZ; KAAKOUSH; MITCHELL, 2014; MA *et al.*, 2016; SITARZ *et al.*, 2018).

Figura 5 - Anatomia do estômago e processo de carcinogênese gástrica.



Fonte: autoria do autor.

### 1.2.3 Tratamento

Devido à complexidade da doença, o procedimento padrão de tratamento é primeiramente a excisão cirúrgica do tumor e a técnica utilizada varia de acordo com as características do tumor. Nas últimas décadas, duas novas abordagens cirúrgicas revolucionaram a metodologia de tratamento do CG, designadas de ressecção endoscópica e acesso minimamente invasivo (laparoscopia) (CAI *et al.*, 2011; CHOI *et al.*, 2013).

Algum tempo atrás, com o objetivo de minimizar a extensiva manipulação do abdômen foi considerado a utilização da técnica de ressecção endoscópica para retirada de tumores gástricos malignos em fase inicial. Entretanto, a invasão das margens horizontal e vertical, e particularmente o risco de envolvimento nodal, tiveram que ser considerados para evitar complicações pós-cirúrgicas. Inicialmente, a ressecção endoscópica da mucosa, ou, a dissecação endoscópica submucosa, foram indicadas como tratamento padrão para adenocarcinoma de tipo diferenciado (intestinal) sem a presença de infiltração (ORDITURA *et al.*, 2014).

A metodologia da laparoscopia gástrica foi primeiramente utilizada para tratamento de doenças benignas gastresofágicas e continua sendo modelo padrão para reparo de hérnia hiatal e acalasia (KATADA *et al.*, 2014). Devido a dificuldades técnicas e preocupações oncológicas, o acesso laparoscópico foi inicialmente confinado ao tratamento de CG precoce na região distal, que não requer gastrectomia total e linfadenectomia aumentada (MEMON; BUTLER; MEMOM, 2010). Após pesquisas indicarem que esse método demonstrou resultados satisfatórios no tratamento do câncer de colón, a metodologia foi gradativamente incluída no tratamento de CG mais avançados que requerem gastrectomia total com linfadenectomia. Apesar de ainda apresentar dados controversos, estudos tem demonstrado que essa metodologia aplicada ao tratamento de CG avançados tem provado ser viável, seguro e oncológicamente adequado (MOISAN *et al.*, 2012).

Embora a completa retirada do tumor e dissecação linfonodal sejam considerados parâmetros de cura para o CG, uma alta taxa de recidivas locais em tem sido observada. Os sítios de recidivas mais frequentes são as regiões próximas ao tumor (19% - 42% dos casos), peritônio (21% - 72%) e sítios mais distantes (18% - 49%). Um benefício na sobrevivida dos pacientes tem sido observado na adição da quimioterapia ou quimiorradioterapia a cirurgia (KO *et al.*, 2012; SCHWARZ; ZAGALA-NEVAREZ, 2002).

Na terapia adjuvante utilizando o estudo clínico de fase III com os quimioterápicos Epirrubicina, Leucovorin, 5-flourouracil e Etoposídeo em combinação (ELFE) para pacientes com CG, após 5 anos de acompanhamento, a terapia ELFE não demonstrou aumento na sobrevivida quando comparada a utilização apenas da cirurgia (DE VITA *et al.*, 2007). Por outro

lado, a mono-quimioterapia utilizando fluoropirimidinas (pró-drogas do 5-fluorouracil) em pacientes asiáticos portadores de câncer gástrico em estágio avançado, foi verificado um aumento significativo na taxa de sobrevida de 3 e 5 anos nos pacientes que receberam a quimioterapia em conjunto com a cirurgia, em comparação com aqueles que fizeram uso apenas da cirurgia de remoção, entretanto os ensaios precisam ser repetidos em uma população mais heterogênea para demonstrar sua eficácia clínica (SAKURAMOTO *et al.*, 2007).

A terapia de quimiorradiação adjuvante também tem demonstrado bons resultados contra o CG, no estudo clínico de fase II utilizando quimiorradiação consistindo em 5-fluorouracil, Leucovorin e radiação por um mês em adição a cirurgia de remoção. Após o acompanhamento por 5 anos, o grupo de pacientes que recebeu a quimiorradiação obteve um aumento na taxa de sobrevida e na sobrevivência livre de progressão quando comparado aos pacientes que apenas receberam a cirurgia, além disso, após 10 anos de acompanhamento o benefício terapêutico se manteve (MACDONALD *et al.*, 2001, 2009).

Apesar dos benefícios terapêuticos observados na adição da quimioterapia/quimiorradioterapia a cirurgia, as taxas de recorrência local e do aparecimento de tumores em sítios distantes continuam elevadas (ORDITURA *et al.*, 2014). Dessa forma, o estudo de novas terapias, assim como melhor compreender essa neoplasia deve ser incentivado com o intuito de oferecer novos tratamentos a indivíduos não responsivos as terapias atuais.

#### ***1.2.4 Linhagens tumorais gástricas***

A cultura de linhagens derivadas de tumores é um modelo essencial que auxilia os pesquisadores a entenderem a biologia do câncer, desde as funções dos oncogenes durante o processo de carcinogênese, até as respostas terapêuticas provenientes de estudos de fármacos sobre esses genes (SHARMA; HARBER; SETTLEMAN, 2010). Atualmente, existem várias linhagens de câncer estabelecidas, representando uma grande variedade de tipos tumorais e respostas *in vitro*, provendo assim um modelo de estudos que permite analisar a heterogeneidade da doença (KLIJN *et al.*, 2015).

O Instituto Nacional do Câncer americano (NCI) desenvolveu um sistema de *screening* de substâncias antitumorais, neste é utilizado um painel de 60 linhagens derivadas de diferentes tipos de câncer (cérebro, colón, leucemia, pulmão, melanoma, ovário e rim), incluindo linhagens resistentes aos quimioterápicos, dessa forma é possível avaliar o potencial antitumoral de substâncias e analisar aquelas com melhor atividade e assim seguir adiante nos testes pré-clínicos (NCI, 2015). Entretanto, apesar da grande prevalência apresentada pelo CG

no mundo, nenhuma linhagem correspondente a essa neoplasia foi adicionada ao painel até então (AMARAL *et al.*, 2019).

O estabelecimento de linhagens tumorais é uma ferramenta importante para oncologia experimental por fornece parâmetros preditivos da biologia do tumor. O desenvolvimento de uma coleção de linhagens tumorais gástricas reflete a diversidade molecular presente nessa neoplasia a nível mundial, além de promover modelos adequados de estudo. Apesar disso, poucas linhagens derivadas de CG estão disponível, sendo a maioria estabelecida a partir de pacientes asiáticos, aonde esse tipo tumoral é altamente prevalentes (MYTAR *et al.*, 2018).

A linhagem gástrica CaVe foi a primeira linhagem derivada de tecido gástrico tumoral estabelecida (DOBRYNIN, 1963). Muitas linhagens gástricas tem sido descrita desde então, como a linhagem gástrica americana (AGS) (BARRANCO *et al.*, 1983) e as linhagens gástricas derivadas de pacientes coreanos SNU-1, SNU-5 e SNU-16. O mesmo grupo de pesquisa, estabeleceu mais tarde 8 novas linhagens, sendo SNU-484, SNU-520 e SNU-719 a partir de adenocarcinoma primário, SNU-601, SNU-620, SNU-638 e SNU-668 de ascite e a SNU216 de metástase linfonodal (PARK *et al.*, 1997, 1990).

Em seguida, na Alemanha foram estabelecidas as linhagens St-23132 e St-3051 do sítio primário e St-2474 e St-2957 de metástase linfonodal (VOLLMERS *et al.*, 1993). No Japão, foram estabelecidas as linhagens gástricas derivadas de metástases em diversos órgãos como TMK-1, MKN-1, MKN-7 e MKN-8 (linfonodo), MKN-45 e MKN-74 (fígado), KATO-III (efusão pleural) e HSC-39 (fluído ascítico) (YOKOZAKI, 2000). Pesquisadores poloneses, mais recentemente, estabeleceram as linhagens GC1401, GC1415 e GC1436 derivadas de metástase peritoneal de pacientes com adenocarcinoma gástrico (MYTAR *et al.*, 2018).

No Brasil, um grupo paraense desenvolveu a primeira linhagem celular de adenocarcinoma do tipo intestinal, sendo conhecida como ACP-01 (LIMA *et al.*, 2004). Em seguida, o mesmo grupo de pesquisa estabeleceu e caracterizou citogeneticamente três novas linhagens, sendo elas obtidas a partir de adenocarcinoma gástrico primário (ACP-03) e de fluído ascítico de adenocarcinoma gástrico (AGP-01), ambas do tipo intestinal, e a terceira proveniente de adenocarcinoma gástrico do tipo difuso (ACP-02) (LEAL *et al.*, 2009). Tais linhagens foram bem caracterizadas com alto grau de aneuploidia, amplificação do gene *c-Myc* e modificação no número de cópias referente ao gene *TP53* (LEAL *et al.*, 2011). Calcagno e colaboradores (2013) também mostraram uma significativa alteração na expressão dos genes *c-Myc*, *FBXW7* e *TP53* nessas linhagens de câncer gástrico semelhante ao encontrado nos tumores primários dos pacientes da região brasileira.



## 2 JUSTIFICATIVA

O câncer foi responsável por cerca de 8,2 milhões de mortes no ano de 2012, e desde então esse número vem aumentando, em 2015 o número de óbitos foi de aproximadamente 8,8 milhões e para o ano de 2018 foram estimados 9,6 milhões de mortes. Assim, uma em cada seis mortes no globo é causada por algum tipo de câncer, dentre esses, 30-50% dos casos poderiam ser prevenidos por mudanças na rotina e/ou alimentação. Essa doença gerou um impacto econômico de cerca de 1,16 trilhões de dólares no ano de 2010 (BRAY *et al.*, 2018; OMS, 2018).

O câncer gástrico (CG) é uma das neoplasias mais incidente no mundo, sendo essa duas vezes superior no sexo masculino quando comparada ao sexo feminino, e mais comum em países com IDH (Índice de Desenvolvimento Humano) mais baixos (FERLAY *et al.*, 2015, 2013). A taxa de mortalidade causada pela doença foi de 8,8% do total de casos em 2012, somando cerca de 723 mil mortes no globo, em 2018 esse número subiu para 780 mil mortes notificadas (8,2% do total). Assim como a incidência, os maiores índices de morte também foram em países de baixo desenvolvimento socioeconômico, como na Ásia Oriental aonde as taxas de morte foram de 24/100 mil habitantes e de 9,8/100 mil habitantes, em homens e mulheres respectivamente (BRAY *et al.*, 2018; FERLAY *et al.*, 2013).

O processo metabólico é altamente alterado nas células tumorais, essas por sua vez, obtém vantagens dessa reprogramação em termos de produção de energia e síntese de biomoléculas que ajudam a sustentar a proliferação descontrolada. O aumento de estudos acerca do metabolismo tumoral resultou na inserção da reprogramação metabólica como uma das marcas características do câncer (DE MAS *et al.*, 2014; HANAHAN; WEINBERG, 2011). A reprogramação metabólica contribui de maneira significativa para o desenvolvimento tumoral e introduz novos alvos que podem ser explorados no tratamento da doença. Quimioterápicos com alvo no metabolismo já vem sendo explorados, demonstrando a dependência metabólica dos tumores como uma nova estratégia terapêutica contra o câncer (LUENGO; GUI; HEIDEN, 2017).

Os modelos de estudos *in vitro* têm demonstrado bom valores preditivos de resposta na oncologia, sendo uma alternativa relativamente barata e rápida para o estudos de vias de sinalização importantes para o desenvolvimento tumoral (WILDING; BODMER, 2014). Dessa forma, a análise da reprogramação metabólica em diferentes linhagens é imprescindível para traçar novas rotas terapêuticas com base no metabolismo tumoral. Recentemente, diversos inibidores da via glicolítica foram desenvolvidos, entretanto, poucos têm ido adiante nas

pesquisas clínicas (LUENGO; GUI; HEIDEN, 2017 et al., 2017; ZHAO *et al.*, 2013). Até o momento, nenhum inibidor metabólico foi introduzido na quimioterapia anticâncer, sendo necessário ainda mais estudos relacionados as vias metabólicas e as suas possíveis interações com moléculas alvo (MARTINEZ-OUTSCHOORN *et al.*, 2017).

Um entrave em relação aos métodos de estudo *in vitro* é que esses geralmente utilizam meios de cultivo com alta concentração de glicose (25 mM ou 450 mg/dL). Apesar dessas condições criarem um ambiente ideal pro crescimento celular, o elevado nível de glicose pode implantar vieses no entendimento das vias da carcinogênese. O ambiente com alta glicose por si só leva a um aumento na ativação de vias de proliferação, já no ambiente normal, essa disponibilidade elevada de glicose nem sempre é real. A literatura cita, que o nível normal de glicose no corpo humano gira em torno de 4 a 6 mM (72-108 mg/dL) e em casos de privação nutricional, essa concentração pode chegar até 2,6 mM (45 mg/dL), com níveis ainda inferiores nos tecidos (HAN *et al.*, 2011; ZHUANG *et al.*, 2014).

Entretanto, apesar de um ambiente rico em glicose não ser geralmente o ambiente tumoral normal, o estudo celular em diferentes concentrações desse substrato pode fornecer informações importantes acerca da reprogramação metabólica tumoral e dos parâmetros adaptativos em situações metabólicas extremas, e assim, se tornar uma ferramenta útil na pesquisa por novos alvos metabólicos (YUN *et al.*, 2009).

Para melhor compreender a patogênese gástrica e traçar alternativas de tratamento para essa neoplasia altamente incidente, Leal e colaboradores (2009) estabeleceram três linhagens de adenocarcinoma gástrico derivadas de pacientes brasileiros, duas com perfil intestinal, sendo uma derivada de tumor primário (ACP-03) e outra de ascite maligna (AGP-01), e a terceira derivada de um tumor primário do tipo difuso (ACP-02), essas apresentam alterações na expressão gênica e características fenotípicas semelhantes as encontradas em pacientes da região brasileira, sendo uma importante ferramenta para o estudo novos alvos para o tratamento do CG (MESQUITA *et al.*, 2018; PINTO *et al.*, 2015, 2017, 2019).

Dessa forma, o objetivo desse estudo é avaliar o perfil metabólico das linhagens gástricas tumorais (AGP-01, ACP-03 e ACP-02) e da linhagem estomacal normal (MNP-01) em diferentes condições de glicose. Assim como estudar os mecanismos celulares e moleculares envolvidos na reprogramação metabólica da linhagem gástrica metastática AGP-01 nas mesmas condições, e assim identificar possíveis estratégias terapêuticas, bem como o manejo de novas terapias farmacológicas com base no metabolismo tumoral nesse tipo de câncer.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Caracterizar o perfil metabólico, celular e molecular envolvidos na reprogramação do fenótipo maligno da linhagem metastática gástrica AGP-01.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

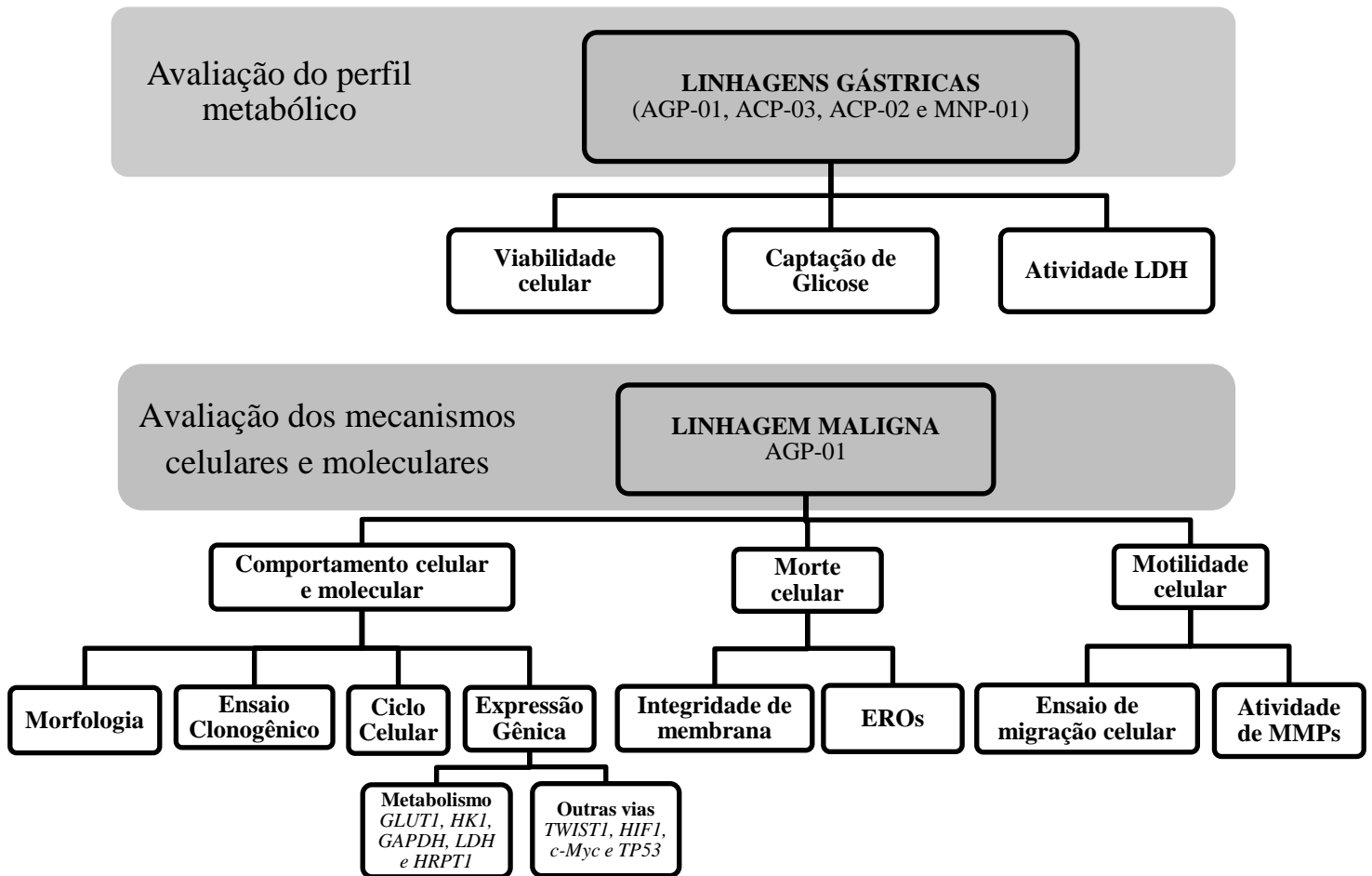
- Determinar a viabilidade celular de linhagens gástricas em diferentes concentrações de glicose;
- Determinar o consumo de glicose e o perfil da atividade da enzima LDH nas linhagens gástricas em diferentes concentrações de glicose;
- Avaliar o perfil do ciclo celular e da sobrevivência na linhagem metastática AGP-01 sob privação de glicose;
- Avaliar o perfil de morte celular e na geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) da linhagem metastática AGP-01 sob efeito da privação de glicose;
- Avaliar o potencial metastático da linhagem AGP-01 sob diferentes concentrações de glicose;
- Avaliar a modulação de genes relacionados ao metabolismo, proliferação e migração celular sob a privação de glicose na linhagem AGP-01.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Delineamento experimental

O delineamento experimental do presente trabalho está descrito na figura 6 abaixo, se dividindo em dois momentos. No primeiro, ocorreu a avaliação do perfil metabólico de quatro linhagens derivadas de tecido gástrico, sendo uma delas normal e três de CG. Depois, a linhagem do tipo intestinal metastática AGP-01 foi eleita com base nas modificações metabólicas e na viabilidade apresentada, os demais estudos buscaram analisar o comportamento da linhagem de acordo com os parâmetros celulares e metabólicos apresentados *in vitro* quando submetida a diferentes concentrações de glicose.

Figura 6 – Fluxograma do delineamento experimental do estudo. Nos experimentos, as linhagens foram expostas a diferentes concentrações de glicose (25, 5,5, e 0,5 mM) para avaliar os parâmetros descritos e a reprogramação metabólica.



Fonte: elaborada pelo autor.

## 4.2 Cultivo celular

No presente estudo foram utilizadas quatro linhagens celulares derivadas de tecido gástrico, as linhagens AGP-01, ACP-03 e ACP-02 foram anteriormente estabelecidas pelo nosso grupo de pesquisa a partir de adenocarcinoma tumoral gástrico, sendo derivadas de fluido ascítico gástrico do tipo intestinal, tumor primário do tipo intestinal e tumor primário do tipo difuso, respectivamente (LEAL *et al.*, 2009). Além disso, foi utilizada a linhagem derivada da mucosa estomacal normal MNP-01 (TABELA 1). As quatro linhagens celulares foram cultivadas em meio DMEM (Meio Eagle - Modificado por Dulbecco), suplementado com 10% de SBF (Soro Bovino Fetal) e 1% de antibióticos (penicilina/estreptomicina 5000U/5000µg/mL), sendo mantidas em estufa de cultura com atmosfera de CO<sub>2</sub> a 5%, a 37°C.

Tabela 1 – Características das linhagens celulares utilizadas no estudo.

Linhagem	Tipo Histológico	Região	Classificação	Estadiamento	Referência
AGP-01	Fluido ascítico de adenocarcinoma gástrico	Antro e corpo	Tipo intestinal	T3N2M1	LEAL <i>et al.</i> , 2009
ACP-03	Adenocarcinoma gástrico primário	Antro	Tipo intestinal	T4N1M0	LEAL <i>et al.</i> , 2009
ACP-02	Adenocarcinoma gástrico primário	Cárdia	Tipo difuso	T3N2M0	LEAL <i>et al.</i> , 2009
MNP-01	Mucosa estomacal normal	-	-	-	MESQUITA <i>et al.</i> , 2018

Fonte: elaborada pelo autor.

O crescimento das culturas foi observado periodicamente com o auxílio de um microscópio invertido (Leica DMIL LED) até a confluência de 85%, também foi verificado o consumo de nutrientes contidos no meio de cultura através da modificação do pH e modificação da coloração do mesmo.

Quando as células alcançaram a confluência celular, realizou-se a manutenção da cultura. Primeiramente, o meio contido nas garrafas era desprezado e as células eram lavadas com tampão fosfato-salino (PBS) 1x (NaCl 137 mM, Fosfato 10 mM e KCl 2,7 mM e pH 7.4), em seguida era adicionado tripsina-EDTA (0,25% v/v em PBS 1x) durante 5 minutos em estufa de CO<sub>2</sub> a 37°C para a dissociação das células. Após, a tripsina era inativada com meio de cultura

acrescido de 10% de SFB. A solução era então homogeneizada e uma parte descartada, por fim, foi adicionado meio de cultura novo a garrafa para dar continuidade a cultura.

Para avaliar os parâmetros metabólicos, celulares e moleculares para simulação de ambientes fisiológicos com diferentes condições de glicose as linhagens foram mantidas em meio DMEM *High Glucose* (25 mM) por 24 horas, em seguida os meios foram retirados e as células lavadas com PBS 1x, as células foram então cultivadas em DMEM *High Glucose* (25 mM), DMEM *Low Glucose* (5,5 mM) ou *Free Glucose* (0,5 mM) (Gibco®), suplementados como descrito anteriormente.

### 4.3 Ensaio de citotoxicidade por exclusão com azul de tripan

- **Princípio do teste**

A coloração com o corante Azul de Tripan é amplamente utilizada para determinar a viabilidade celular de suspensões celulares. A técnica se baseia no princípio de que as células viáveis apresentam a membrana celular intacta o que impede a entrada de certos corantes, como é o caso do azul de tripan, eosina, iodeto de propídio (IP), enquanto as células mortas, que apresentam rupturas na membrana, permitem a entrada dos corantes e então são facilmente mensuráveis por meio de técnicas de análise (microscopia de fluorescência, microscopia convencional, citometria, entre outras). O corante azul de tripan cora o citoplasma de células mortas em azul, enquanto que as células viáveis mantêm o citoplasma límpido (STROBER, 2015).

- **Procedimento experimental**

As linhagens celulares AGP-01, ACP-03, ACP-02 e MNP-01 foram plaqueadas em placa de 12 poços na concentração de  $7 \times 10^4$  células/poço. Após a aderência celular, o meio foi retirado e as células foram lavadas com PBS 1x, em seguida, o meio DMEM com diferentes concentrações de glicose (25, 5,5 e 0,5 mM) foram adicionados por 24 horas. Após, os meios foram retirados, as células foram lavadas com PBS 1x e tripsinizadas com tripsina-EDTA (0,25%) por 5 minutos. Em seguida, na suspensão celular foi adicionado meio suplementado para inativação da tripsina e a solução foi transferida para eppendorfs estéreis e centrifugados (Universal 320 R) a 1.500 rpm por 5 minutos. O pellet celular foi então ressuscitado em 100  $\mu$ L de PBS 1x e uma alíquota de 20  $\mu$ L foi transferida para um novo tubo e o corante azul de tripan (0,4%) foi adicionado a suspensão, em seguida as células viáveis foram contadas com o

auxílio de uma câmara de Neubauer em microscópio óptico invertido (Leica DMIL LED) e a viabilidade celular foi estimada.

- **Análise de dados**

As células foram diferenciadas em viáveis e não viáveis, as viáveis com citoplasma límpido e as não viáveis/mortas com citoplasma corado em azul. A viabilidade celular foi mensurada pela fórmula:

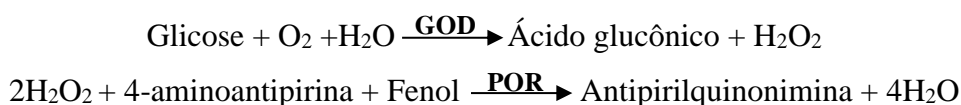
$$Viabilidade (\%) = \frac{Total\ de\ células\ viáveis}{Total\ de\ células}$$

Os dados foram analisados a partir da média  $\pm$  desvio padrão da média de 3 experimentos independentes. Para verificar a ocorrência de diferença significativa entre os grupos, os dados foram comparados por 2way ANOVA seguida por pós-teste de Bonferroni, com nível de significância de 95% ( $p < 0,05$ ) utilizando o programa estatístico GraphPad Prism® 5.1.

#### 4.4 Captação de glicose

- **Princípio do teste**

A captação de glicose pelos organismos garante a demanda de substrato para as vias bioquímicas responsáveis pela produção de energia, síntese de nucleotídeos, produção de lipídios, etc. Avaliar a captação de glicose é crucial para o estudo e entendimento de doenças e distúrbios metabólicos como é o caso do câncer (FADAKA *et al.*, 2017). O ensaio enzimático-colorimétrico permite a determinação da concentração de glicose da amostra através da ação de enzimas como glicose oxidase (GOD) e peroxidase (POR), primeiramente a enzima GOD catalisa a oxidação da glicose presente em ácido glucônico e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), o  $H_2O_2$  formado reage com 4-aminoantipirina e fenol sob ação de POR levando a formação de antipirilquinonimina de coloração vermelha, de acordo com a reação descrita abaixo. Dessa forma, a intensidade de cor é proporcional a concentração de glicose presente, sendo possível a sua determinação através de métodos colorimétricos.



- **Procedimento experimental**

As linhagens tumorais AGP-01, ACP-03 e ACP-02 e a linhagem normal MNP-01 foram plaqueadas ( $7 \times 10^4$  células/poço) em placa de 12 poços. Após 24 horas, o meio foi retirado e os poços foram lavados com PBS 1x e então um novo meio com diferentes concentrações de glicose (25, 5,5, e 0,5 mM) foram adicionados. Após o consumo de glicose (tempo de 24 horas) uma alíquota de 100  $\mu$ L do sobrenadante foi retirada e centrifugada a 1.500 rpm por 5 minutos. Para determinação da concentração de glicose presente foi utilizado o kit bioquímico Glicose Liquiform® (Labtest, Brasil), e as recomendações do fabricante foram seguidas. Foi adicionado 195  $\mu$ L do reagente 1 em placa de 96 poços e 5  $\mu$ L do sobrenadante retirado dos grupos avaliados foram acrescentados, o padrão de calibração do teste foi realizado nas mesmas condições. Em seguida as amostras foram colocadas em banho maria a 37°C por 10 minutos e então lidas em espectrofotômetro (Beckman Coulter Microplate Reader DTX 880) em absorvância de 450 nm.

- **Análise de dados**

Para o cálculo de concentração de glicose na amostra é utilizada a fórmula:

$$\text{Glicose (mg/dL)} = \frac{\text{Absorbância do teste}}{\text{Absorbância do padrão}} \times 100$$

Os dados foram analisados a partir da média  $\pm$  desvio padrão da média de 3 experimentos independentes. Para verificar a ocorrência de diferença significativa entre os grupos, os dados foram comparados por 2way ANOVA seguida por pós-teste de Bonferroni, com nível de significância de 95% ( $p < 0,05$ ) utilizando o programa estatístico GraphPad Prism® 5.1.

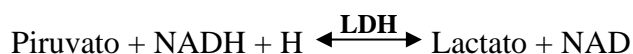
#### 4.5 Atividade da enzima Lactato Desidrogenase (LDH)

- **Princípio do teste**

A LDH possui papel central no metabolismo celular assim como está associada a reprogramação metabólica em tumores, uma vez que, diferente das células normais, reduz o piruvato a lactato mesmo em condições aeróbicas. O aumento na atividade da enzima LDH está associada a malignidade, dessa forma a atividade enzimática pode ser considerada um parâmetro preditivo da agressividade tumoral (PELIZZARI *et al.*, 2019). O ensaio utilizado consiste na capacidade da enzima LDH em converter piruvato em lactato na presença de



dinucleótido de nicotinamida e adenina (NADH), como descrito na reação abaixo. A oxidação de NADH leva a um decréscimo na absorvância em 340 nm, sendo proporcional a atividade da enzima na amostra avaliada.



- **Procedimento experimental**

As linhagens gástricas AGP-01, ACP-03, ACP-02 e MNP-01 foram plaqueadas em placa de 12 poços na concentração de  $7 \times 10^4$  células/poço. Após 24 horas de aderência celular, o meio foi retirado e os poços foram lavados com PBS 1x, posteriormente, foi acrescentado aos poços meios DMEM com diferentes concentrações de glicose (25, 5,5, e 0,5 mM) e a placa foi incubada por 24 horas. Em seguida, os meios foram retirados e as células lavadas com PBS 1x, ocorreu então a desagregação celular com auxílio de tripsina-EDTA (0,25%) por 5 minutos. Então, a atividade enzimática foi inativada com a adição de meio completo e a suspensão celular foi centrifugada (Universal 320 R) a 1.500 rpm/5 minutos. O pellet foi ressuscitado em 100  $\mu\text{L}$  de PBS 1x e a concentração de células viáveis foi mensurada com auxílio do corante azul de tripan (0,4%), como descrito anteriormente. Um total estimado em  $2 \times 10^4$  células viáveis foi transferida para outro tubo e centrifugada, o pellet foi então ressuscitado em 80  $\mu\text{L}$  de uma solução com PBS 1x/Triton X-100 durante 45 minutos em estufa de  $\text{CO}_2$  a  $37^\circ\text{C}$  para permeabilização celular. Em sequência, as amostras foram centrifugadas e 20  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foi retirado para mensurar a atividade enzimática utilizando o kit bioquímico LDH Liquiform® (Labtest, Brasil), seguindo as recomendações do fabricante. Em placa de 96 poços foram acrescentados 200  $\mu\text{L}$  da solução trabalho, formada por reagente 1 e reagente 2 (4:1), e em seguida 20  $\mu\text{L}$  de amostra foi adicionado aos poços e a placa foi então incubada em estufa de  $\text{CO}_2$  por 1 minuto. Posteriormente, a absorvância (340 nm) foi mensurada em leitor de placas (Beckman Coulter Microplate Reader DTX 880), leitura 1 (A1), e após dois minutos a leitura foi realizada novamente, leitura 2 (A2), utilizando os mesmos parâmetros.

- **Análise de dados**

A atividade de LDH foi mensurada pela fórmula:

$$\text{Atividade LDH } \left( \frac{U}{L} \right) = \Delta \text{Teste} \times \text{Fator}$$

Aonde:

$$\Delta \text{Teste} = \frac{A1 - A2}{2}$$

E:

$$Fator = \frac{Vt \times 1000}{\varepsilon \times Va \times d}$$

Sendo:

Vt= Volume total do ensaio (0,22 mL);

1000= Conversão de U/mL para U/L;

$\varepsilon$ = Absortividade mM do NADH (6,3);

Va= Volume da amostra (0,02 mL);

d= Espessura da solução (0,068 cm).

Os resultados de atividade enzimática de LDH (U/L) foram então normalizados por transformação em percentual, tendo as amostras correspondentes a alta concentração de glicose (25 mM) como 100%. Assim, os dados foram analisados a partir da média  $\pm$  desvio padrão da média de 3 experimentos independentes. Para verificar a ocorrência de diferença significativa entre os grupos, os dados foram comparados por 2way ANOVA seguida por pós-teste de Bonferroni, com nível de significância de 95% ( $p < 0,05$ ) utilizando o programa estatístico GraphPad Prism® 5.1.

#### 4.6 Ensaio clonogênico

- **Princípio do teste**

O ensaio clonogênico tem como objetivo avaliar a capacidade de linhagens celulares multiplicarem-se e formarem colônias, assim como observar a atividade da substância teste na inibição desse processo. Este ensaio tem sido descrito como um método eficaz para avaliação *in vitro* do comportamento proliferativo, citotóxico e citostático de compostos químicos e radiosensibilidade de linhagens tumorais (PLUMB, 2004)

- **Procedimento experimental**

A linhagem AGP-01 foi triada para os seguintes experimentos por apresentar um metabolismo glicolítico aeróbico com base na sua viabilidade, captação de glicose e atividade de LDH. Dessa forma a linhagem AGP-01 foi semeada em placas de 24 poços na densidade de  $1 \times 10^2$  células/poço. Após 24 horas, o meio foi retirado e os poços foram lavados com PBS 1x, em seguida foram adicionados meios com diferentes concentrações de glicose (25, 5,5, e 0,5 mM) e a placa foi incubada em estufa de CO<sub>2</sub> por sete dias. Para análise do número de colônias,

primeiramente fez-se a retirada do meio de cultura, os poços foram lavados com PBS 1x e então as células foram fixadas com uma solução de metanol, ácido acético e água (1:1:8) por 30 minutos. As colônias foram coradas com solução de cristal violeta (0,2%) por 30 minutos. Por fim, os poços foram lavados com água destilada e as colônias foram fotografadas e contadas com o auxílio de uma lupa de aumento.

- **Análise de dados**

O número de colônias contados foram normalizados para percentual tendo o grupo correspondente as amostras cultivadas em alta concentração de glicose (25 mM) como 100%. Então, os dados foram analisados a partir da média  $\pm$  desvio padrão da média de 3 experimentos independentes. Para verificar a ocorrência de diferença significativa entre os grupos, os dados foram comparados por 1way ANOVA seguida por pós-teste de Bonferroni, com nível de significância de 95% ( $p < 0,05$ ) utilizando o programa estatístico GraphPad Prism® 5.1.

#### **4.7 Análise de ciclo celular**

- **Princípio do teste**

O ciclo celular é um processo altamente regulado, sendo responsável pela divisão celular e assim da proliferação tecidual. O ciclo celular é dividido em quatro fases sequenciais, indo da progressão da quiescência celular (fase G0) para fase proliferativa (fases G1, S, G2 e M) e em seguida voltando a fase G0. A desregulação do ciclo celular está associada a hiperproliferação celular levando ao surgimento de neoplasias (BAI; LI; ZHANG, 2017). Devido a importância desse processo celular para manutenção da homeostase tecidual, metodologias de análise foram desenvolvidas. Como as fases do ciclo celular são determinadas pela mudança na concentração de DNA intracelular, visto que, se o conteúdo de DNA na fase G0/G1 é N, na fase G2/M essa quantidade é o dobro (2N), na fase S entre N-2N e na fase Sub-G1 (fragmentação celular) abaixo de N. Marcadores como Iodeto de Propídio (IP) e 4',6'-diamino-2-fenil-indol (DAPI) podem ser utilizados por se ligarem ao DNA e emitirem fluorescência, dessa forma quantificando a concentração de material genético e determinando a fase do ciclo celular por meio de equipamentos capazes de quantificar essa marcação, como o citômetro de fluxo (CROWLEY; CHOJNOWSKI; WATERHOUSE, 2016).

- **Procedimento experimental**

A linhagem gástrica maligna AGP-01 foi plaqueada em placa de 12 poços na concentração de  $7 \times 10^4$  células/poço. Após 24 horas de aderência celular, o sobrenadante foi retirado e os poços lavados com PBS 1x, em seguida, foi acrescentado aos poços meios DMEM com diferentes concentrações de glicose (25, 5,5, e 0,5 mM) e seguiu-se a incubação por 24 horas. Ao fim da incubação, o meio foi retirado dos poços e os mesmos lavados com PBS 1x, as células foram dissociadas com tripsina-EDTA (0,25%) por 5 minutos. Então, a suspensão celular foi centrifugada (1.500 rpm/5 minutos) e o pellet ressuscitado em álcool 80% a 4°C por 30 minutos ou *overnight* para fixação. Em seguida, as células foram centrifugadas a 1.500 rpm por 5 minutos e o pellet permeabilizado com solução de Triton X-100 (0,1% v/v) por 30 minutos e centrifugadas novamente como descrito. O pellet celular foi então ressuscitado na solução de marcação com IP (50 µg/mL), sendo incubada a 4°C, longe da luz por 30 minutos. Por fim, a amostra foi novamente centrifugada como descrito, sendo ressuscitado em PBS 1x para posterior análise de 10.000 eventos por amostra em citometria de fluxo (BD FACSVerser<sup>TM</sup>).

- **Análise de dados**

A porcentagem de células em cada fase do ciclo celular (Sub-G1, G0/G1, S e G2/M) foi avaliada através da fluorescência do IP (Ex/Em: 535/617 nm), e extraídas utilizando o software FlowJo®. Os dados foram analisados a partir da média  $\pm$  desvio padrão da média de 3 experimentos independentes. Para verificar a ocorrência de diferença significativa entre os grupos, os dados da porcentagem de células em Sub-G1 foram analisados separadamente das células em G0/G1, S e G2/M, sendo comparados por 1way e 2way ANOVA, respectivamente. Em ambas as análises foi utilizado o pós-teste de Bonferroni, com nível de significância de 95% ( $p < 0,05$ ) no programa estatístico GraphPad Prism® 5.1.

#### **4.8 Análise de alterações morfológicas pela colocação com Panótico**

- **Princípio do teste**

A análise morfológica celular permite visualizar, identificar e classificar anormalidades características de doenças e processos celulares específicos (CHEN *et al.*, 2012). As técnicas de coloração que se baseiam no método tradicional de Romanowsky têm como fundamento a capacidade de corantes ácidos e básicos terem especificidade a componentes celulares de cargas opostas, ou seja, os corantes ácidos coram em rósea/vermelho componentes básicos celulares,

enquanto os corantes básicos coram em azul/roxo componentes ácidos, como é caso do núcleo celular, permitindo visualizar possíveis alterações estruturais (HOROBIN, 2011; WEISS, 1953).

- **Procedimento experimental**

A linhagem tumoral gástrica derivada de fluido ascítico do tipo intestinal AGP-01 foi escolhida para os posteriores estudos. A mesma foi semeada em placa de 24 poços ( $7 \times 10^4$  células/poço) e após 24 horas, o meio dos poços foi retirado e lavados com PBS 1x, em seguida meios com diferentes concentrações de glicose (25, 5,5, e 0,5 mM) e as placas foram incubadas por 24 horas. Após o tempo de incubação, o meio foi retirado, as células lavadas com PBS 1 x e então tripisinizadas por 5 minutos a 37°C. Após a desagregação celular, a suspensão foi centrifugada a 1.500 rpm e o pellet celular ressuspendido em 200 µL de PBS 1x, destes, 100 µL foram colocados em lâminas, previamente limpas com álcool 70%, e centrifugadas em citocentrífuga (Cytospin) a 1.500 rpm por 5 minutos. Para coloração das lâminas foi utilizado o kit Panótico Rápido® (LaborClin, Brasil), segundo as recomendações do fabricante. Primeiramente, as lâminas foram imersas na solução 1 (fixador) por 5 segundos, com movimentos contínuos de cima pra baixo. Em seguida, o mesmo processo foi realizado com a solução 2 (corante ácido) e a solução 3 (corante básico). Por fim, as lâminas foram secas em temperatura ambiente e analisadas.

- **Análise de dados**

A análise qualitativa do experimento foi feita através das lâminas analisadas em microscópio investido (Evos XL) no aumento de 40x. Dessa forma, as modificações morfológicas foram visualizadas, classificadas e fotografadas em cada grupo estudado.

#### **4.9 Integridade de membrana plasmática e potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ )**

- **Princípio do teste**

O processo de morte celular é essencial pro desenvolvimento do organismo, o desregulamento ou evasão desse processo pode levar a uma hiperproliferação celular e ao desenvolvimento de doenças como o câncer. Dentro os mecanismos de morte já descritos, os mais estudados são a apoptose (intrínseca ou extrínseca) e necrose (JAN; CHAUDHRY, 2019).

A utilização de marcação dupla com os corantes IP e Rodamina 123 (R123) é utilizada na diferenciação do padrão de morte celular, além de fornecer dados relacionados a funcionalidade mitocondrial e o seu potencial de membrana ( $\Delta\psi_m$ ). Células que possuem membrana plasmática intacta não permitem a passagem de corantes carregados como o IP, dessa forma, células com danos a membrana (indício de morte celular) são marcadas no núcleo com IP (IP+). Por outro lado, a R123 é um fluorocromo catiônico lipofílico que atravessa a membrana plasmática intacta e se deposita na membrana mitocondrial, assim, a despolarização da membrana mitocondrial ou diminuição no  $\Delta\psi_m$  (R123-) é considerado um indicio de dano mitocondrial e/ou apoptose (DARZYNKIEWICZ; LI; GONG, 1994; WLODKOWIC *et al.*, 2011).

- **Procedimento experimental**

Em placas de 12 poços, a linhagem AGP-01 foi semeada na concentração de  $7 \times 10^4$  células/poço. Após 24 horas, o sobrenadante foi removido e os poços lavados com PBS 1x, posteriormente, foi acrescentado aos poços meios DMEM com diferentes concentrações de glicose (25, 5,5, e 0,5 mM) e as células foram incubadas por 24 horas. Em seguida, o sobrenadante foi retirado e os poços lavados com PBS 1x, as células então foram retiradas com auxílio de tripsina-EDTA (0,25%) por 5 minutos. Então, a suspensão adquirida foi centrifugada a 1.500 rpm por 5 minutos e o pellet obtido foi ressuscitado na ausência de luz em uma solução de IP/R123 (5  $\mu\text{g/mL}$  de cada) por 35 minutos a 37°C. Por fim, as amostras foram centrifugadas como descrito, ressuscitadas em PBS 1x e analisadas em citômetro de fluxo (BD FACSVerser<sup>TM</sup>) em um total de 10.000 eventos por amostra. Além das amostras experimentais, células sem marcação (branco), marcadas apenas com IP (5  $\mu\text{g/mL}$ ) e com R123 (5  $\mu\text{g/mL}$ ) foram utilizadas para calibração e compensação de fluorescência (sobreposição de espectros de excitação/emissão) para aquisição dos dados.

- **Análise de dados**

O percentual do total de células em cada quadrante (R123-/IP+, R123+/IP+, R123+/IP- e R123-/IP-) foi medido através da fluorescência de R123 (Ex/Em: 507/527 nm) e IP (Ex/Em: 535/617 nm), sendo extraídos através software FlowJo®. Os dados foram analisados a partir da média  $\pm$  desvio padrão da média de 3 experimentos independentes. Para verificar a ocorrência de diferença significativa entre os grupos, os dados da porcentagem de células em cada quadrante foram comparados por 2way ANOVA seguida por pós-teste de Bonferroni, com nível de significância de 95% ( $p < 0,05$ ) utilizando o programa estatístico GraphPad Prism® 5.1.

#### 4.10 Quantificação de espécies reativas de oxigênio (EROs)

- **Princípio do teste**

O composto conhecido como 2'-7'-diclorofluorescina diacetato (DCFH-DA), pode ser oxidado intracelularmente por vários agentes oxidantes, tais como, peróxido de hidrogênio, ânion radical superóxido, hidroperóxidos lipídicos, entre outros; o que o torna um importante marcador para a determinação de EROs (BILSKI; BELANGER; CHIGNELL, 2002). O reagente DCFH-DA difunde-se passivamente pela membrana plasmática e no interior da célula é hidrolisado por uma enzima esterase, provocando a liberação de 2'-7'-diclorofluorescina (DCFH), a qual tem afinidade por espécies reativas de oxigênio. Desta forma, a DCFH liberada reage com as EROs liberando uma grande quantidade de substância fluorescente conhecida como 2'-7'-diclorofluoresceína (DCF), a qual é impermeável à membrana plasmática ficando aprisionada no meio intracelular, dessa forma é possível estimar os níveis de EROs intracelular (DCFH-DA+) de acordo com a intensidade de fluorescência produzida.

- **Procedimento experimental**

AGP-01 foi plaqueada em placa de 24 poços ( $7 \times 10^4$  células/poço) e após a aderências celular, o sobrenadante foi removido e os poços lavados com PBS 1x e nos respectivos poços foram acrescentados meios DMEM com diferentes concentrações de glicose (25, 5,5, e 0,5 mM). Após 24 horas, o sobrenadante foi retirado, os poços lavados com PBS 1x e as células retiradas com auxílio de tripsina-EDTA (0,25%). Em seguida, as células foram centrifugadas a 1.500 rpm por 5 minutos e o pellet celular foi ressuspensionado longe da luz em uma solução de contendo DCFH-DA (10  $\mu$ M) por 30 minutos a 37°C. Após a incubação com o fluoróforo, as células são novamente centrifugadas como descrito e ressuspensionadas em PBS1x para análise. A fluorescência foi estimada em citômetro de fluxo (BD FACSVerser<sup>TM</sup>), aonde foram obtidos 10.000 eventos por amostra. Além das amostras experimentais, células sem marcação (branco) foram utilizadas para calibração dos parâmetros de aquisição.

- **Análise de dados**

O percentual do total de células marcadas (DCFH-DA+) e não marcadas (DCFH-DA-) foi medido através da fluorescência do fluoróforo DCFH-DA (Ex/Em: 488/525 nm) e extraídos através software FlowJo®. O percentual de células marcadas (DCFH-DA+) foram analisados a partir da média  $\pm$  desvio padrão da média de 3 experimentos independentes. Para verificar a ocorrência de diferença significativa entre os grupos, os foram comparados por 1way ANOVA

seguida por pós-teste de Bonferroni, com nível de significância de 95% ( $p < 0,05$ ) utilizando o programa estatístico GraphPad Prism® 5.1.

#### 4.11 Ensaio de migração celular

- **Princípio do teste**

O processo de migração celular ocorre durante todo o desenvolvimento, em condições normais, como no processo de cicatrização de feridas e também em processos malignos e patológicos, como na progressão do câncer. A migração é definida como o movimento celular de uma área para outra, o tipo de migração e a sua velocidade derivam do tipo da extensão da adesão entre célula-célula e célula-matriz de adesão (SCHAEFFER *et al.*, 2014). Com base na relevância desse processo, Liang, Park e Guan (2007) desenvolveram um ensaio simples, barato e que simula o processo de migração *in vitro* de maneira satisfatória. O ensaio se baseia na criação de um “arranhão” em uma monocamada celular, são então capturadas imagens em tempos consecutivos acompanhando o processo de fechamento do “arranhão” e assim a migração das células. Este estudo é adequado para simular os efeitos nas interações entre célula-matriz e célula-célula no processo migratório.

- **Procedimento experimental**

A linhagem tumoral AGP-01 foi semeada em placa de 12 poços na concentração de  $2 \times 10^5$  células/poço. Após atingir a confluência celular, em cada poço foi realizado um “arranhão” utilizando uma ponteira de 10  $\mu$ L estéril, os poços foram então lavados com PBS 1x e meios DMEM com diferentes concentrações de glicose (25, 5,5, e 0,5 mM) foram adicionados. Para evitar a interferência da proliferação, o processo migratório foi acompanhado até o tempo de duplicação da linhagem de 24 horas (PINTO *et al.*, 2015), dessa forma, imagens de cada poço foram capturadas nos tempos de 0, 12 e 24 horas com auxílio do microscópio investido (Leica DMIL LED).

- **Análise de dados**

A área dos arranhões nos diferentes tempos de análise foi mensurada através do programa Image J® e convertidas em porcentagem, sendo o tempo de 0 horas igual 100% equivalente a área do arranhão. Então, os dados foram analisados a partir da média  $\pm$  desvio padrão da média de 3 experimentos independentes. Para verificar a ocorrência de diferença



significativa entre os grupos, os dados foram comparados por 2way ANOVA seguido por pós-teste de Bonferroni, com nível de significância de 95% ( $p < 0,05$ ) utilizando o programa estatístico GraphPad Prism® 5.1.

#### **4.12 Atividade de metaloproteinases por Zimografia**

- **Princípio do teste**

Metaloproteinases (MMPs) são enzimas endopeptidases capazes de degradar uma gama de componentes proteicos presentes na matriz extracelular (MEC), como colágeno, elastina, gelatina e caseína. Estão associadas a capacidade metastática de células malignas uma vez que a MEC se apresenta como uma barreira para progressão tumoral e apresentam atividade enzimática elevada no câncer. Existem cerca de 25 membros da família das MMPs sendo divididas de acordo com o substrato que são capazes de degradar, as MMP2 e MMP9 são da classe das gelatinases e podem desnaturar e clivar colágeno do tipo IV e gelatina (JOHN; TUSZYNSKI, 2001; ZHANG; CHEN, 2017).

O ensaio de Zimografia é uma técnica simples para análise da atividade de MMPs, foi descrita primeiramente em 1980 passando por adaptações (HEUSSEN; DOWDLE, 1980; KAJI *et al.*, 2003; REN; CHEN; KHALIL, 2017). Essa técnica se baseia na separação de proteínas por eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida, copolimerizado com dodecil sulfato de sódio modificado (SDS-PAGE). A polimerização do gel é feita na presença do substrato da enzima de interesse, no caso de MMP2 (gelatinase A) e MMP9 (gelatinase B), gelatina. Durante a eletroforese, MMPs são separadas, sem exercer função proteolítica devido a presença de SDS. Em seguida a separação eletroforética ocorre a renaturação enzimática pela remoção de SDS, então a atividade enzimática é ativada pela incubação do gel a 37°C em tampão contendo  $Zn^{2+}$  e  $Ca^{2+}$ , dessa forma as enzimas são capazes de degradar o substrato presente no gel e terem sua atividade mensurada pelo tamanho da banda degradada.

- **Procedimento experimental**

As linhagens tumorais derivadas de fluido ascítico gástrico maligno (AGP-01) e de fibrossarcoma (HT-1080), foram plaqueadas em placas de 24 poços ( $7 \times 10^4$  células/poço) e após a aderência celular, o sobrenadante foi removido, os poços lavados com PBS 1x e então foram acrescentados meios de cultura DMEM sem SBF com diferentes concentrações de glicose (25, 5,5, e 0,5 mM). Após 24 horas, o sobrenadante foi removido e centrifugado (3.000 rpm/5 minutos). As proteínas do meio de cultura foram quantificadas pelo método de Lowry (LOWRY

et al., 1951). Para separação das proteínas, dois géis foram utilizados, de acordo com a tabela 2.

Tabela 2 - Componentes utilizados para confecção do SDS-PAGE modificado.

Reagentes	Gel de corrida 10%	Gel de compactação
Acrilamida	3,33 mL	835 µL
Água miliq	3,92 mL	2,84 µL
Gelatina 10%	100 µL	-
Tampão Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	2,5 mL	-
Tampão Tris-HCl 0,5 M pH 6,8	-	1,25 mL
Dodecil Sulfato de Sódio (SDS)	50 µL	50 µL
Persulfato de Amônio	50 µL	25 µL
TEMED	5 µL	25 µL

Fonte: elaborada pelo autor.

A gelatina funciona como substrato para MMP2 (72 KDa) e MMP9 (92 KDa). O gel de corrida 10% foi adicionado a cuba de eletroforese vertical até o ponto dos poços, após sua polimerização o gel de compactação foi adicionado por cima do gel anterior. Após a montagem do gel foram acrescentados 25 µg/mL de proteínas por poço. Em seguida, o gel foi submetido à eletroforese (120 V por 1 hora e 30 minutos) para separação das proteínas. Após a corrida, o gel foi lavado duas vezes por 15 minutos com 2,5% Triton X-100, para retirada do SDS. Em seguida, o gel foi incubado com tampão de incubação (0,05 M TrisHCl pH 8, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 µM ZnCl<sub>2</sub>), *overnight*, a 37°C, para a degradação do substrato pelas MMPs. Logo depois, o gel foi corado (Coomassie Brilliant Blue R-250 0,5% em solução descorante metanol: ácido acético: água/ 4,5:1:4,5) por 30 minutos, à temperatura ambiente, sob agitação constante, e descorado com metanol 10% e ácido acético 10%.

- **Análise de dados**

As bandas claras, representando a degradação enzimática e assim a atividade de MMPs, foram fotografadas no aparelho de captura de imagens iBright® (Invitrogen, EUA). As imagens foram então analisadas no programa Image J aonde através da seleção da área da banda foi possível quantificar a densidade ótica de cada pixel. O percentual de atividade enzimática das MMPs foi calculado considerando as amostras de células cultivadas em 25 mM de glicose como 100%. As amostras provenientes da linhagem de fibrossarcoma HT-1080 cultivadas em meio

DMEM (25 mM) foram consideradas como controle positivo para atividade de MMPs. Dessa forma, os dados foram analisados a partir da média  $\pm$  desvio padrão da média de 3 experimentos independentes. Para verificar a ocorrência de diferença significativa entre os grupos, os dados foram comparados por 2way ANOVA seguido por pós-teste de Bonferroni, com nível de significância de 95% ( $p < 0,05$ ) utilizando o programa estatístico GraphPad Prism® 5.1.

#### **4.13 Isolamento de mRNA e análise de expressão gênica por RT-qPCR**

- **Princípio do teste**

A PCR em tempo real (RT-qPCR) é um método fluorimétrico que possibilita a visualização da amplificação do transcrito em tempo real, permitindo estimar a quantidade de mRNA presente na amostra de acordo com a quantidade de ciclos necessários para atingir determinado ponto (*threshold cycle* ou CT). A quantidade de ciclos necessários para a amplificação do transcrito é diretamente proporcional ao CT e inversamente proporcional a quantidade de mRNA. Para mensurar a amplificação, são utilizados compostos fluorescentes como o SYBR® Green, este, possui a capacidade de se ligar a dupla fita gerada da reação de amplificação do cDNA (DNA complementar), a quantidade de cDNA é proporcional a concentração de mRNA da amostra. Ao se ligar, o composto emite fluorescência sendo esta medida pelo equipamento, e assim, mensurando a concentração relativa do transcrito na amostra (HEID *et al.*, 1996; WANG; ZHU; LEVY, 2006).

- **Procedimento experimental**

Em placas de 12 poços, a linhagem AGP-01 foi semeada na concentração de  $7 \times 10^4$  células/poço. Após 24 horas, o sobrenadante foi removido e os poços lavados com PBS 1x, posteriormente, foi acrescentado aos poços meios DMEM com diferentes concentrações de glicose (25, 5,5, e 0,5 mM) e incubadas por 24 horas. Em seguida, o sobrenadante foi retirado e os poços lavados com PBS 1x, as células foram então retiradas com auxílio de tripsina-EDTA (0,25%) por 5 minutos a 37°C. Então, a suspensão foi centrifugada a 1.500 rpm por 5 minutos e o pellet obtido ressuspendido em 1 ml de TRIzol® Reagent (Invitrogen, EUA) para extração do RNA de acordo com as recomendações do fabricante. As amostras foram vortexadas e deixadas a temperatura ambiente (TA) por 5 minutos, então foi adicionado clorofórmio as amostras e estas foram novamente vortexadas e deixadas a TA por 10 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 4°C em 12.000 x g por 15 minutos para separação dos componentes da amostra, a fase transparente do sobrenadante (contendo mRNA) foi então

transferida para outro tubo estéril aonde foi adicionado isopropanol, as amostras foram homogeneizadas por inversão e então deixadas a TA por 10 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 12.000 x g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi cuidadosamente retirado, o pellet foi então ressuspensionado em etanol 75% e vortexado. Por conseguinte, as amostras foram centrifugadas a 7.400 x g por 5 minutos a 4°C, o sobrenadante foi desprezado cuidadosamente e o pellet de mRNA foi deixado secar a TA por aproximadamente 1 hora ou até a visualização da completa evaporação do álcool. Por fim, o pellet foi hidratado com água miliq e quantificado em espectrofotômetro (NanoDrop®, Thermo Scientific), o mRNA foi armazenado em -80°C até a conversão em cDNA.

O mRNA foi então convertido a cDNA através do kit High Capacity cDNA Reverse Transcriptase® (Thermo Scientific, EUA). Para conversão, foram utilizados 20 ng/μL de amostra, as reações de conversão foram realizadas em termociclador (Verity®, Thermo Scientific). Os transcritos analisados e as vias relacionadas a influência dos genes estão descritos na tabela 3. Para estimar a expressão relativa de mRNA foi realizada a PCR em tempo real utilizando o equipamento QuantiStudio™ 5 (Applied Biosystems, USA) e o sistema de detecção Power Up™ SYBR® Green Master Mix (Life Technologies, EUA) seguindo as exigências feitas por *Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments- MIQE Guidelines* (BUSTIN *et al.*, 2009).

Tabela 3 - Sequências de oligonucleotídeos usados na qPCR e vias relacionadas.

Gene	Sequência (5'-3') Senso/Reverso	Via relacionada	Referência da sequência (NCBI)
<i>GLUT1</i>	TCCTGCCCTGTTGTGTATAG CAGGAGTGAGGTGGTGTATT	Metabolismo da glicose	NM_006516.2
<i>HK1</i>	GATCACGTGGACAAAGGGT ACGTCCAGGTCAAATTCCTC	Metabolismo da glicose	NM_001322364.1
<i>GAPDH</i>	GGTATCGTGGAAGGACTCAT CCATCACGCCACAGTTTC	Metabolismo da glicose	NM_002046.6
<i>LDHA</i>	TCTGGATTCAGCCCGATT TACAGGCACACTGGAATCTC	Metabolismo da glicose	NM_005566.3
<i>HPRT1</i>	TCAGGCAGTATAATCCAAAGATGGT AGTCTGGCTTATATCCAACACTTCG	Metabolismo de purinas	NM_000194.3
<i>HIF1</i>	CCCTGCACTCAATCAAGAAG GGACTAGGTGTCTGATCCTG	Hipóxia	NM_001530.3

<i>TWIST1</i>	CCTCACACCTCTGCATTCT CTGATTGGCACGACCTCT	Transição epitélio- mesenquimal	NM_003380.4
<i>c-Myc</i>	CTTCTCTCC GTCCTCGGATTCT GAAGGTGATCC AGACTCTGACCTT	Proliferação celular, entre outros	NM_002467.6
<i>TP53</i>	AGAGTCTATAGGCCACCCC GCTCGACGCTAGGATCTGAC	Ciclo celular, apoptose e metabolismo	NM_001276760.2
<i>RPLP0</i>	GCAATGTTGCCAGTGTCTG GCCTTGACCTTTTCAGCAA	Síntese de proteínas	NM_001002.4

Fonte: elaborada pelo autor.

- **Análise de dados**

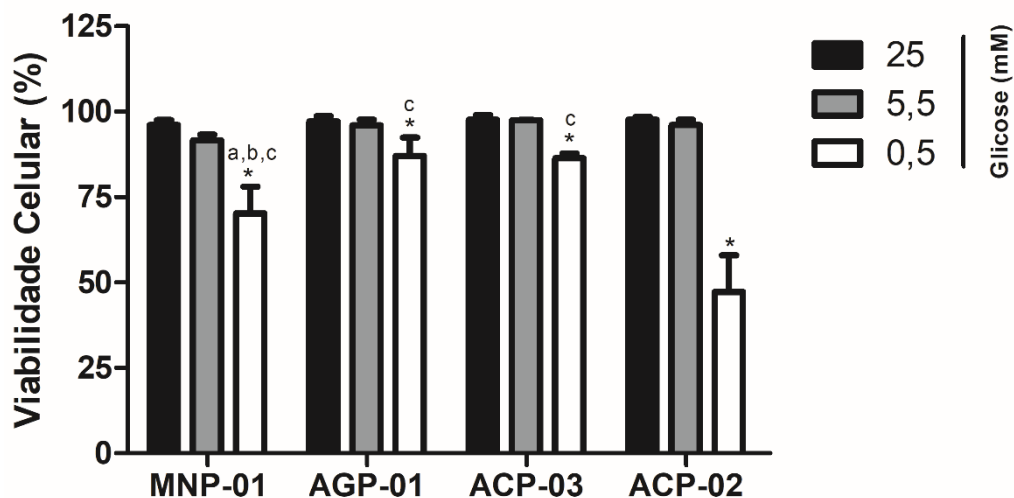
O nível de expressão foi calculado usando o método  $\Delta\Delta C_t$ , normalizando as amostras em relação ao gene endógeno (*RPLP0*) utilizado (SCHMITTGEN; LIVAK, 2008). O grupo correspondente as células cultivadas em 25 mM de glicose, foi utilizado como calibrador do experimento, os dados foram analisados a partir da média  $\pm$  desvio padrão da média de 3 experimentos independentes. Para verificar a ocorrência de diferença significativa entre os grupos, os dados foram comparados por 1way ANOVA seguido por pós-teste de Bonferroni, com nível de significância de 95% ( $p < 0,05$ ) utilizando o programa estatístico GraphPad Prism® 5.1.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Viabilidade celular

Na análise de viabilidade celular pelo método de exclusão por azul de tripan foi verificado que todas as linhagens estudadas apresentaram diminuição na viabilidade de maneira significativa apenas quando cultivadas em meio com baixa concentração de glicose (0,5 mM) ( $p < 0,001$ ). Ainda, os percentuais de viabilidade nas linhagens quando cultivadas em 0,5 mM de glicose foram de aproximadamente 70%, 87%, 86% e 47% para as linhagens MNP-01, AGP-01, ACP-03 e ACP-02, respectivamente, sendo a linhagem ACP-02 a mais sensível a baixa concentração do substrato dentre todas as linhagens analisadas ( $p < 0,001$ ), e as linhagens do tipo intestinal (AGP-01 e ACP-03) mais resistentes a privação do substrato (FIGURA 7).

Figura 7 - Viabilidade de linhagens gástricas sob privação de glicose. As barras representam a média  $\pm$  desvio padrão da média de 3 experimentos independentes. \*  $p < 0,001$  quando comparadas as células cultivadas em 25 mM de glicose dentro do mesmo grupo. a, b e c representam  $p < 0,001$ , comparadas a linhagem AGP-01, ACP-03 e ACP-02, respectivamente. A comparação foi realizada por 2way ANOVA seguida por teste de Bonferroni, com nível de significância de 95% ( $p < 0,05$ ).



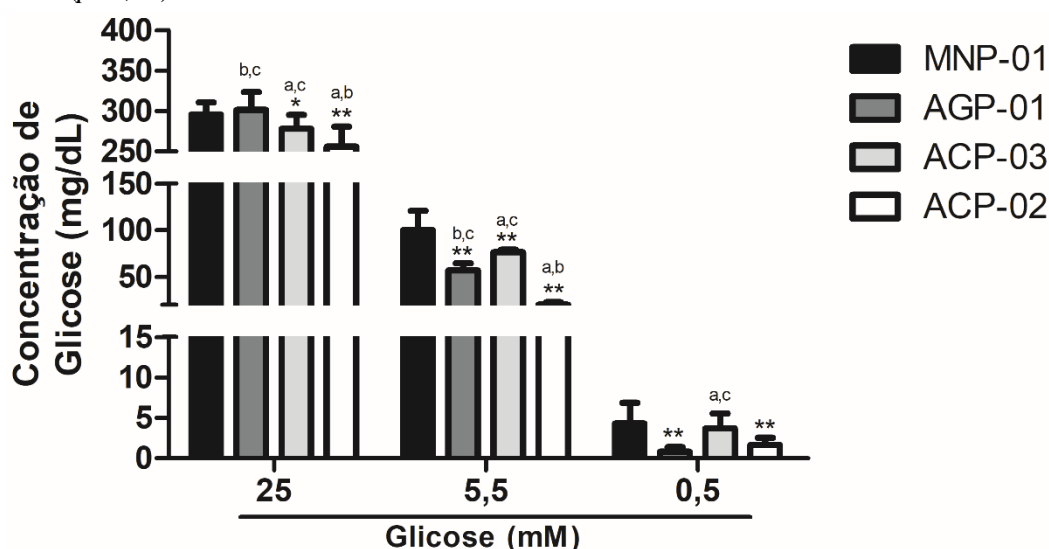
Fonte: dados da pesquisa.

### 5.2 Avaliação do perfil de consumo de glicose

Para verificar a atividade metabólica das linhagens gástricas foi analisado o perfil de consumo de glicose em diferentes condições através da quantificação da concentração de glicose presente no sobrenadante após 24 horas de cultivo. Como ilustrado na figura 8 abaixo, nossos achados mostram que na presença de alta glicose (25 mM), a linhagem derivada de CG de tumor primário do tipo intestinal (ACP-03) e do tipo difuso (ACP-02) obtiveram consumo significativo ( $p < 0,01$  e  $p < 0,001$ , respectivamente) quando comparado a linhagem normal

(MNP-01). Quando cultivadas em menores condições de glicose (5,5 mM), as três linhagens tumorais avaliadas obtiveram consumo significativo quando comparada a linhagem normal ( $p < 0,001$ ), sendo visualizado um maior consumo na linhagem ACP-02, seguida pela linhagem metastática do tipo intestinal AGP-01. Em privação de glicose (0,5 mM), apenas as linhagens AGP-01 e ACP-02 demonstraram consumo significativo ( $p < 0,001$ ) quando comparada a normal, sendo a linhagem AGP-01 com maior consumo.

Figura 8 - Análise do consumo de glicose em diferentes condições de cultivo. As barras representam a média  $\pm$  desvio padrão da média de 3 experimentos independentes. \* $p < 0,01$ , \*\* $p < 0,001$ , comparadas a linhagem gástrica normal MNP-01. a, b e c representam  $p < 0,001$ , comparadas a linhagem AGP-01, ACP-03 e ACP-02, respectivamente. A comparação foi realizada por 2way ANOVA seguida por teste de Bonferroni, com nível de significância de 95% ( $p < 0,05$ ).



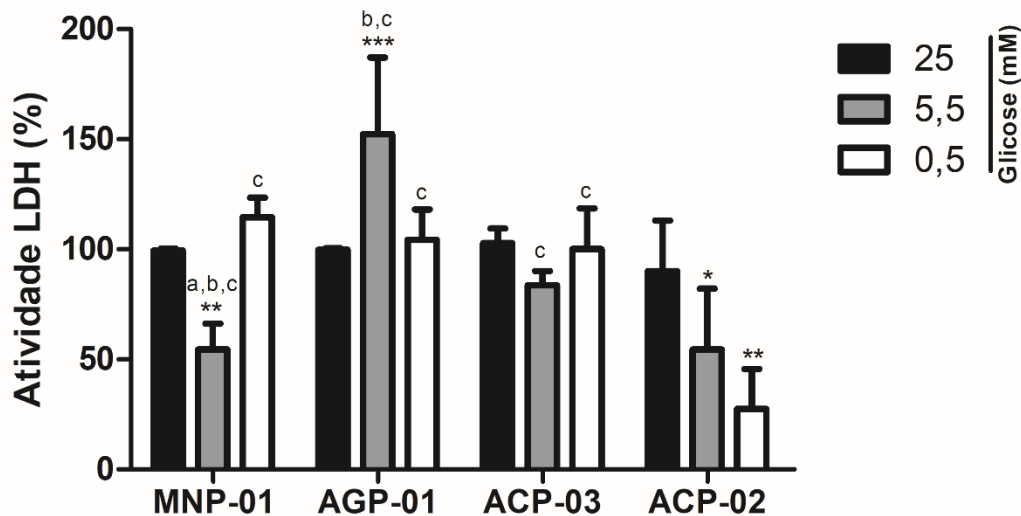
Fonte: dados da pesquisa.

### 5.3 Atividade enzimática LDH

Em seguida, analisamos atividade intrínseca da enzima lactato desidrogenase (LDH), a linhagem normal MNP-01, apresentou redução na atividade enzimática em aproximadamente 54% em meio com 5,5 mM de glicose ( $p < 0,001$ ). A linhagem metastática do tipo intestinal AGP-01, entretanto, apresentou aumento na atividade da enzima em torno de 53% ( $p < 0,001$ ) nas mesmas condições. A linhagem derivada de tumor primário do tipo intestinal ACP-03 não apresentou diferença estatística na atividade enzimática nas condições analisadas, já a linhagem do tipo difuso ACP-02 apresentou diminuição em aproximadamente 36% e 63% quando cultivada em 5,5 ( $p < 0,05$ ) e 0,5 mM de glicose ( $p < 0,001$ ), respectivamente. Ao comparar as linhagens entre si em cada condição de cultivo analisada, foi verificado que a linhagem AGP-01 apresentou maior atividade enzimática quando comparada as outras em meio a 5,5 mM,

quando analisada a atividade enzimática no meio com alta privação de glicose (0,5 mM) a linhagem do tipo difuso apresentou menor atividade entre todas as avaliadas, como visualizado na figura 9.

Figura 9 - Atividade intracelular da enzima LDH em linhagens gástricas cultivadas em diferentes concentrações de glicose. As barras representam a média  $\pm$  desvio padrão da média de 3 experimentos independentes. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,001$ , comparadas as células cultivadas a 25 mM. a, b e c representam  $p < 0,05$ , comparadas a linhagem AGP-01, ACP-03 e ACP-02, respectivamente. A comparação foi realizada por 2way ANOVA seguida por teste de Bonferroni, com nível de significância de 95% ( $p < 0,05$ ).



Fonte: dados da pesquisa.

Os dados demonstram que as linhagens do tipo intestinal possuem maior atividade da enzima LDH nas condições avaliadas, enquanto que a do tipo difuso tem diminuição na atividade quando cultivadas em meios com menos glicose. A linhagem normal demonstrou aumento na atividade apenas em condições de privação de glicose (0,5 mM).

Assim, vemos que as linhagens gástricas do tipo intestinal possuem um perfil metabólico glicolítico aeróbico, por possuírem alta atividade de LDH e por serem mais resistentes a privação do substrato. A linhagem AGP-01, além de atestar um elevado consumo de glicose (em 5,5 e 0,5 mM) apresenta elevado potencial metastático e com o objetivo de melhor entender seus mecanismos celulares e moleculares em diferentes condições de cultivo foi escolhida para os testes subsequentes.

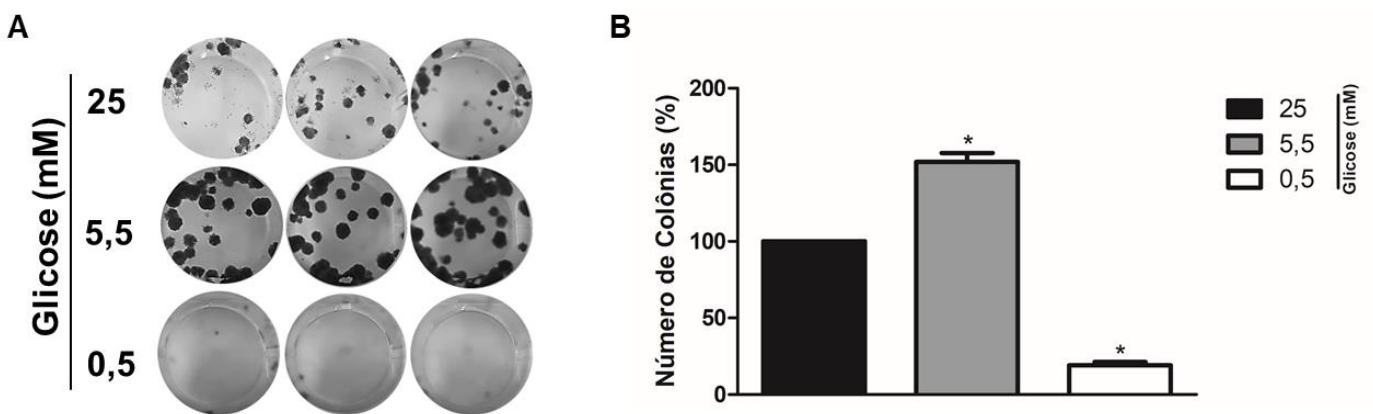
#### 5.4 Avaliação do potencial proliferativo

Através do ensaio clonogênico foi possível analisar o número de colônias e assim o efeito na proliferação da linhagem celular AGP-01 durante 7 dias de cultivo em meios com diferentes concentrações de glicose. Foi visualizado que linhagem AGP-01 apresentou aumento



em cerca de 52% no número de colônias ( $p<0,0001$ ) quando cultivada em meio com 5,5 mM e comparadas com as células cultivada em 25 mM. Como observado na figura 10, o efeito oposto foi observado nas células cultivadas em quase total ausência de glicose, com diminuição em 81% no perfil proliferativo ( $p<0,0001$ ).

Figura 10 - A linhagem AGP-01 apresenta aumento no potencial proliferativo quando cultivada a 5,5 mM de glicose. A) Fotomiografia representativa do número de colônias cultivadas em diferentes concentrações de glicose. B) Representação gráfica do percentual de colônias. As células cultivadas em 25 mM foram normalizadas como 100%. As barras representam a média  $\pm$  desvio padrão da média de 3 experimentos independentes. \* $p<0,0001$ , comparadas as células cultivadas em 25 mM de glicose por 1way ANOVA seguida por teste de Bonferroni, com nível de significância de 95% ( $p<0,05$ ).

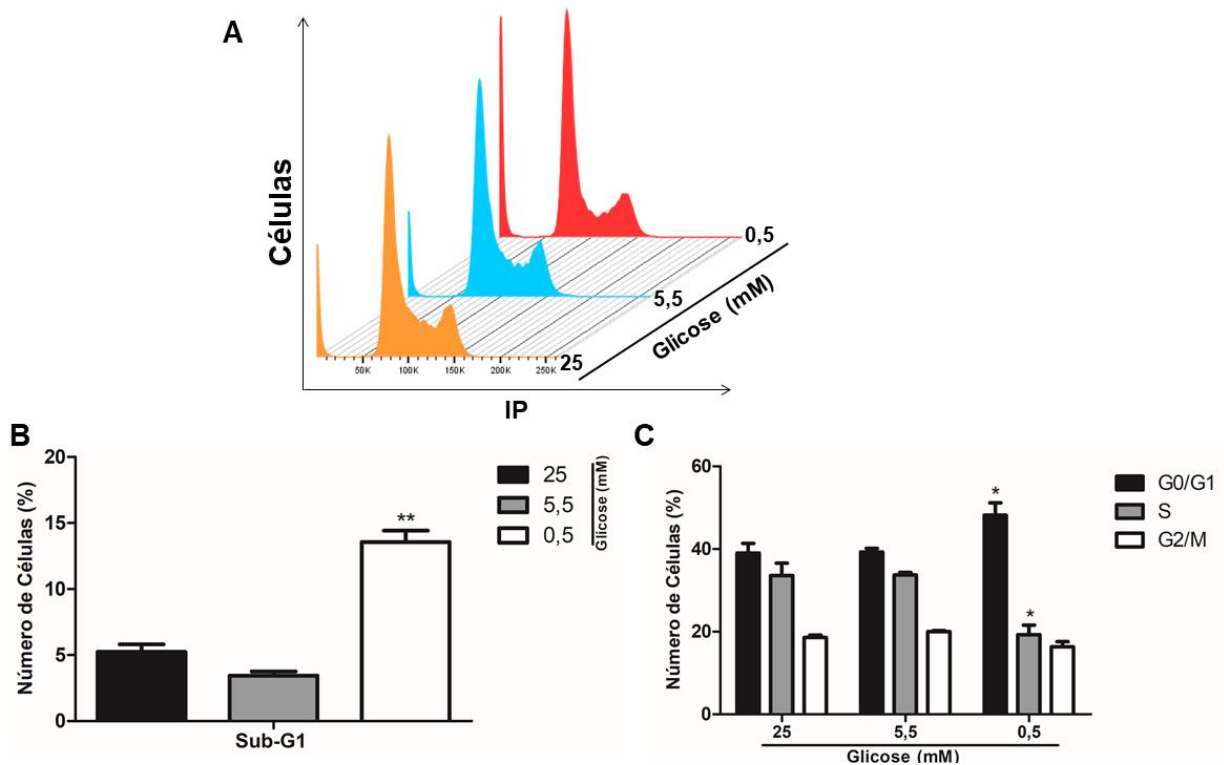


Fonte: dados da pesquisa.

### 5.5 Avaliação de alterações no ciclo celular e fragmentação

Através da citometria de fluxo foi possível avaliar o ciclo celular da linhagem AGP-01 sob diferentes concentrações de glicose. Células cultivadas nas concentrações de 25 e 5,5 mM de glicose não apresentaram diferença estatística no ciclo celular nem na fragmentação (células em Sub-G1), já células cultivadas em 0,5 mM apresentaram aumento na fragmentação celular ( $p<0,0001$ ) e um arraste da fase S para G0/G1 ( $p<0,001$ ) (FIGURA 11).

Figura 11 - Diminuição na concentração de glicose leva a um aumento na fragmentação celular e arraste para G0/G1 na linhagem AGP-01. A) Histograma representativo da marcação de IP e a quantidade de DNA respectivo de cada fase do ciclo em relação a população de células. B) Representação gráfica da população de células que possuem marcação de IP inferior a concentração N de DNA (fase Sub-G1), indicando fragmentação celular. C) Representação gráfica da porcentagem de células em cada fase do ciclo celular. As barras representam a média  $\pm$  desvio padrão da média de 3 experimentos independentes. \* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,0001$  comparado com células cultivadas a 25 mM por 1way (análise de células em Sub-G1) e 2way (análise de células em G0/G1, S e G2/M) ANOVA seguida por teste de Bonferroni, com nível de significância de 95% ( $p < 0,05$ ).

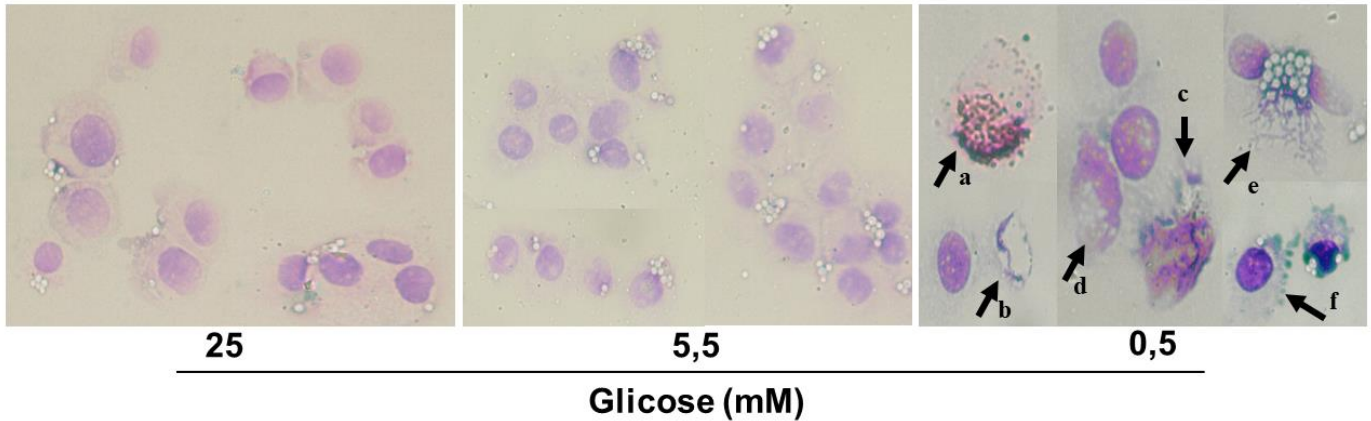


Fonte: dados da pesquisa.

## 5.6 Avaliação de modificações morfológicas

A análise morfológica da linhagem AGP-01, não revelou modificações características de processo de morte nas células cultivadas a 25 e 5,5 mM de glicose. Entretanto, nas células cultivadas em privação de glicose (0,5 mM) houveram modificações típicas de processo apoptótico, como lise celular, afrouxamento de cromatina, presença de vacúolos intracelulares, fragmentação na membrana celular, cariólise e formação de corpos apoptóticos (FIGURA 12).

Figura 12 - Privação de glicose causa alterações morfológicas na linhagem AGP-01. Em ausência de glicose (0,5 mM), o ensaio revelou modificações morfológicas típicas do processo apoptótico, incluindo lise celular (a), afrouxamento de cromatina (b), fragmentação da membrana celular (c), presença de vacúolos intracelulares (d), cariólise (e) e formação de corpos apoptóticos (f). As figuras são representativas de três experimentos, Aumento de 40x, barra de escala= 100  $\mu$ m.

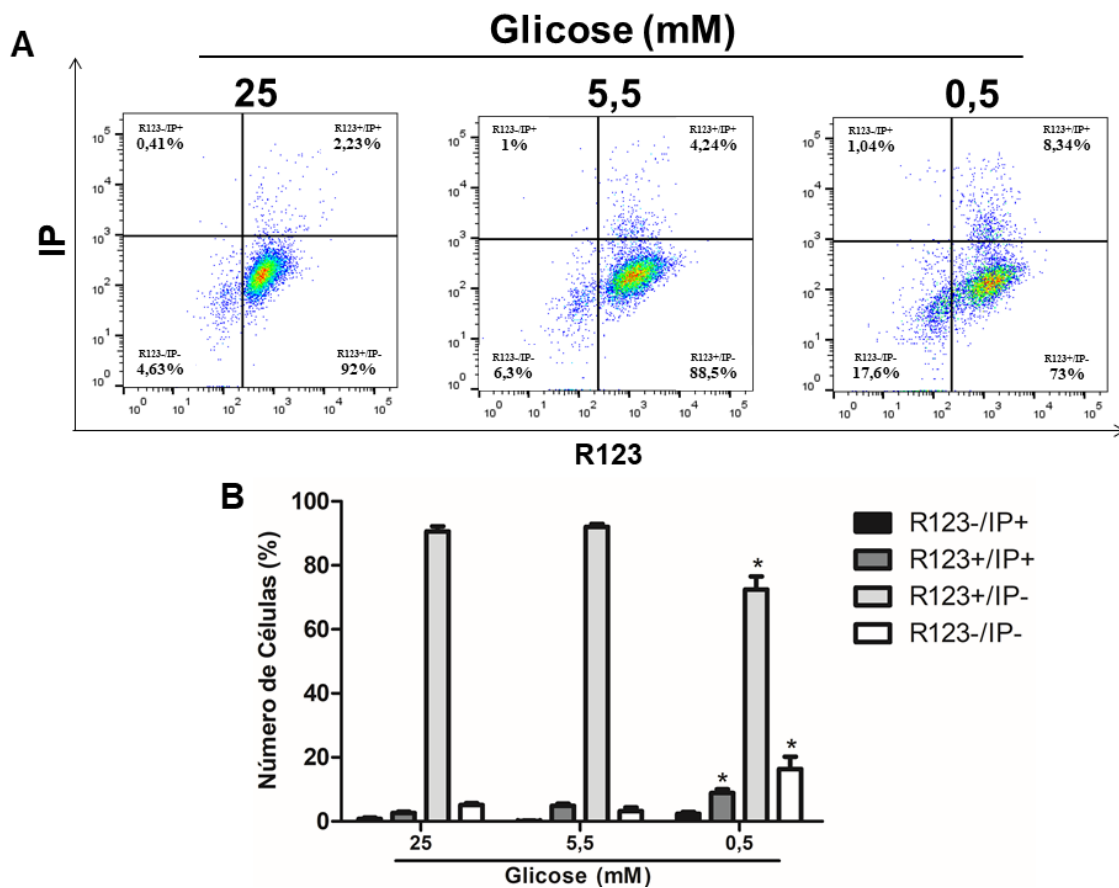


Fonte: dados da pesquisa.

### 5.7 Avaliação da integridade de membrana e potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ )

Com o objetivo de analisar a função mitocondrial, assim como o possível mecanismo de morte induzido pela privação de glicose na linhagem tumoral gástrica AGP-01, foi realizada a dupla marcação utilizando os marcadores fluorescentes Rodamina 123 (R123) e Iodeto de Propídio (IP). As células cultivadas nas concentrações de 25 e 5,5 mM não apresentaram diferença significativa nos parâmetros analisados, atestando sua viabilidade celular. Entretanto, como é possível visualizar na figura 13, as linhagens cultivadas em 0,5 mM de glicose apresentaram aumento na marcação com IP (R123+/IP+), indicando alteração na permeabilidade da membrana plasmática e assim um indício de apoptose inicial. Também foi observado aumento no número de células que apresentam redução no potencial de membrana mitocondrial (R123-/IP-), supondo que esse mecanismo apoptótico pode estar sendo ativado pela despolarização da mitocôndria, ou seja, por via intrínseca. Além disso, houve diminuição de células com perfil viável (R123+/IP-) ( $p < 0,001$ ).

Figura 13 - Privação de glicose causa aumento na permeabilidade de membrana celular e diminuição no potencial mitocondrial. A análise foi realizada por dupla marcação com Rodamina 123 (R123) e Iodeto de Propídio (IP), tendo suas fluorescências mensuradas por citometria de fluxo e assim divididas em quatro quadrantes, sendo eles células em: apoptose tardia/necrose inicial (R123-/IP+), apoptose inicial (R123+/IP+), viáveis (R123+/IP-) e com perda de função mitocondrial/apoptose por via intrínseca (R123-/IP-). A) Dot plots representativos da dupla marcação com R123 e IP. B) Representação gráfica do percentual de células em cada quadrante indicando a dupla marcação. As barras representam a média  $\pm$  desvio padrão da média de 3 experimentos independentes. \* $p < 0,001$ , comparadas as células cultivadas em 25 mM de glicose por 2way ANOVA seguida por teste de Bonferroni, com nível de significância de 95% ( $p < 0,05$ ).

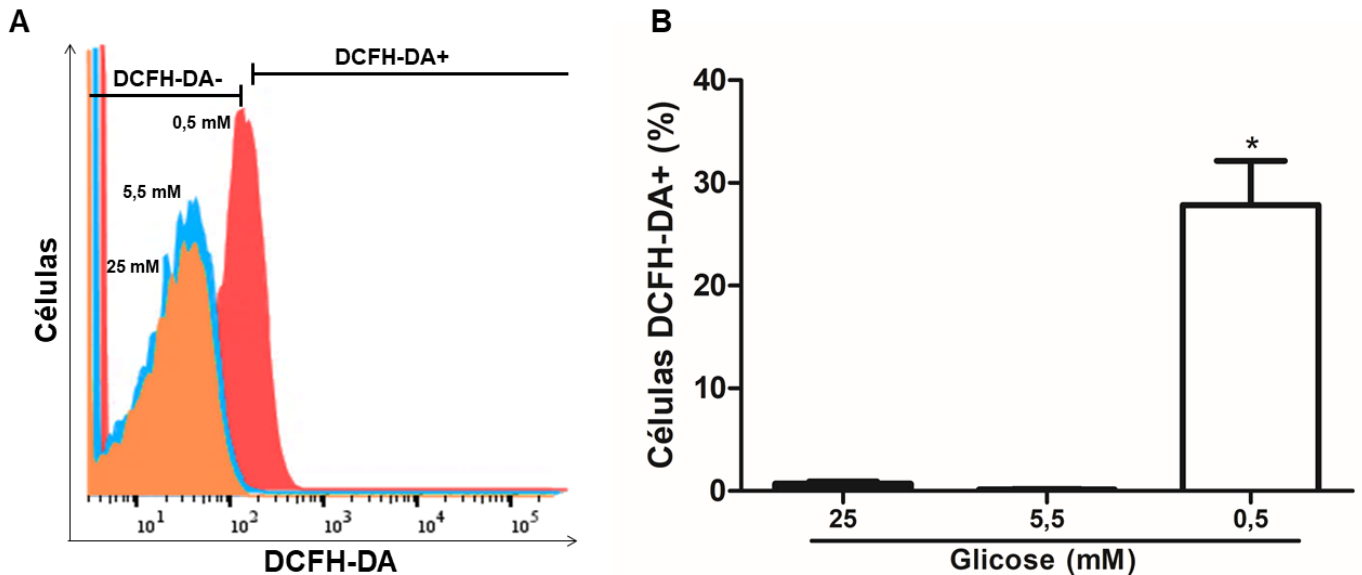


Fonte: dados da pesquisa.

### 5.8 Avaliação dos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs)

Com a finalidade de avaliar a produção de EROs nas células cultivadas em diferentes condições de glicose, foi utilizado o composto fluorescente DCFH-DA. Foi observado, que após 24 horas de cultivo em baixa concentração de glicose (0,5 mM), a linhagem AGP-01 apresentou aumento na produção de EROs (DCFH-DA+) em cerca de 27% ( $p < 0,0001$ ). As células cultivadas em 25 e 5,5 mM de glicose não apresentaram aumento significativo, como visualizado na figura 14 abaixo.

Figura 14 – Baixa concentração de glicose leva ao aumento na produção de EROs na linhagem gástrica AGP-01 após 24 horas. A) Histograma representativo da marcação com DCFH-DA em relação a população de células. B) Representação gráfica da população de células marcadas com DCFH-DA (DCFH-DA+) indicando aumento na produção de EROs. As barras representam a média  $\pm$  desvio padrão da média de 3 experimentos independentes. \* $p < 0,0001$  comparado com células cultivadas a 25 mM por 1way ANOVA seguida de teste de Bonferroni, com nível de significância de 95% ( $p < 0,05$ ).

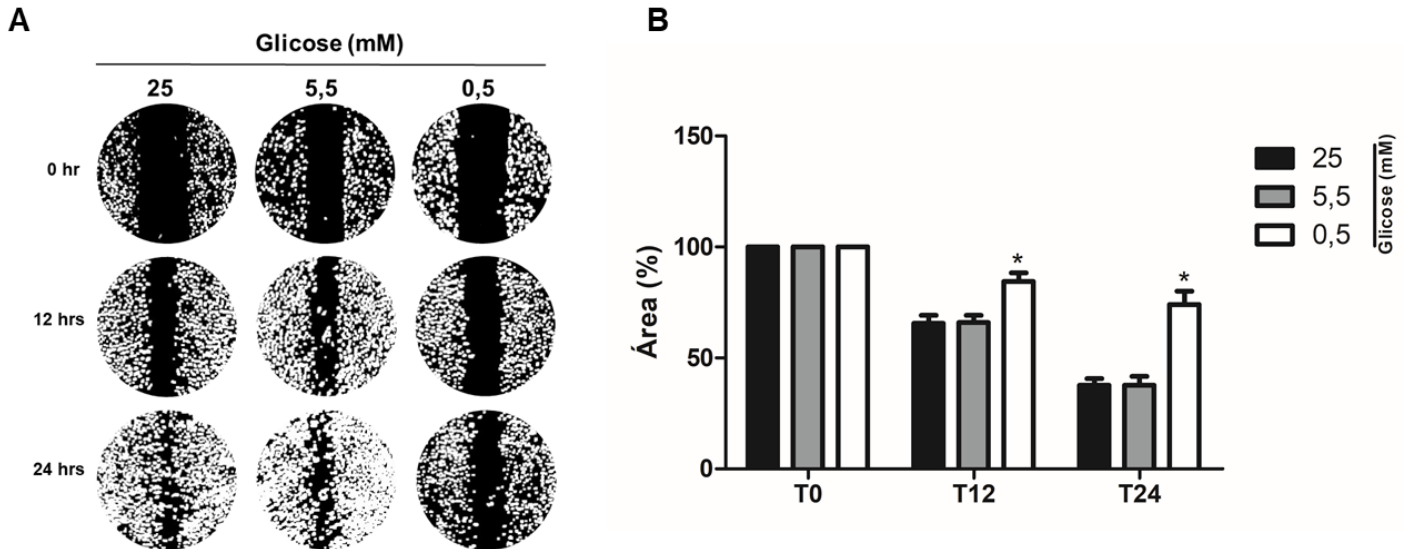


Fonte: dados da pesquisa.

### 5.9 Avaliação do potencial migratório

Para visualizar influência da variação de glicose na migração celular, foi realizado análise de migração nos tempos de 0, 12 e 24 horas. Como visualizado na figura 15, as células cultivadas em 25 e 5,5 mM de glicose não demonstraram diferença no perfil migratório, caracterizado pela diminuição área do “arranhão”. Enquanto que, em 0,5 mM de glicose a linhagem AGP-01 demonstrou diminuição no potencial migratório nos tempos de 12 e 24 horas ( $p < 0,001$ ).

Figura 15 - Diminuição da concentração de glicose influencia o perfil migratório da linhagem gástrica maligna AGP-01. A) Imagens de diferentes tempos de exposição a diferentes concentrações de glicose mostrando o processo de migração celular caracterizado pela redução na área do “arranhão”. B) Representação gráfica da migração celular. A área do arranhão nos diferentes tempos foi estimada através programa ImageJ®. As células cultivadas em 25 mM foram normalizadas como 100%. As barras representam a média  $\pm$  desvio padrão da média de 3 experimentos independentes. \* $p < 0,0001$  comparado com células cultivadas a 25 mM por 2way ANOVA seguida de teste de Bonferroni, com nível de significância de 95% ( $p < 0,05$ ).

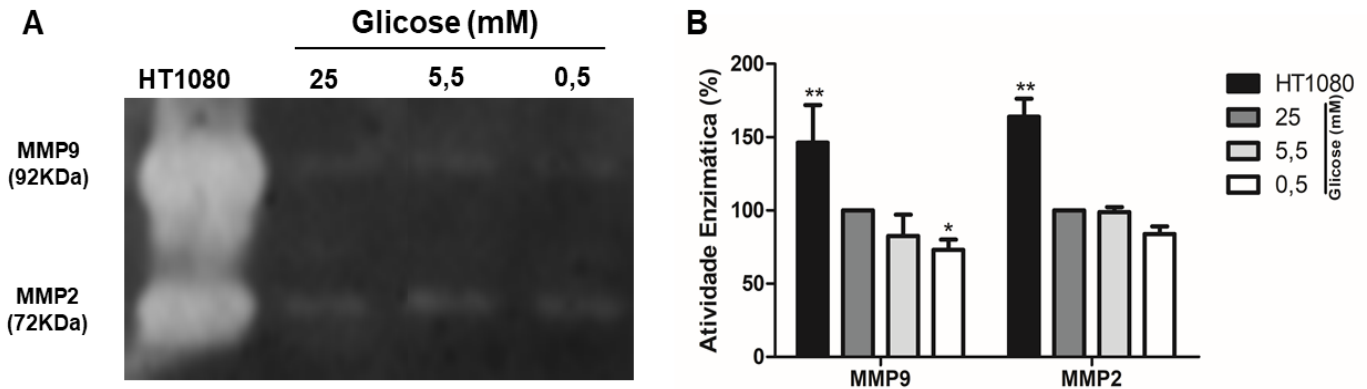


Fonte: dados da pesquisa.

### 5.10 Avaliação da atividade de metaloproteinasas

Para melhor entender o papel da variação de glicose em possíveis alterações do potencial metastático relacionada a transição epitélio-mesenquimal (TEM) da linhagem maligna AGP-01, a atividade das metaloproteinasas 9 (MMP9) e 2 (MMP9) foi determinada através do ensaio de Zimografia. Não foi visualizada diminuição significativa na atividade de MMP2 nas condições avaliadas, entretanto, a linhagem AGP-01 demonstrou redução na atividade de MMP9 em aproximadamente 27% quando cultivada a 0,5 mM de glicose ( $p < 0,05$ ) (FIGURA 16).

Figura 16 – Privação de glicose diminui a atividade de MMP9 na linhagem gástrica maligna AGP-01 após 24 horas. A) Gel de zimografia demonstrando a atividade enzimática de MMP9 e MMP2 através do tamanho da banda degradada. B) Representação gráfica da atividade enzimática de MMP 2 e MMP9. As células cultivadas em 25 mM foram normalizadas como 100%. Os dados foram estimados por densitometria das bandas através do programa ImageJ®, a linhagem HT1080 cultivada a 25 mM de glicose foi utilizada como controle positivo para atividade de MMPs. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,0001$  comparado com células cultivadas a 25 mM por 2way ANOVA seguida de teste de Bonferroni, com nível de significância de 95% ( $p < 0,05$ ).

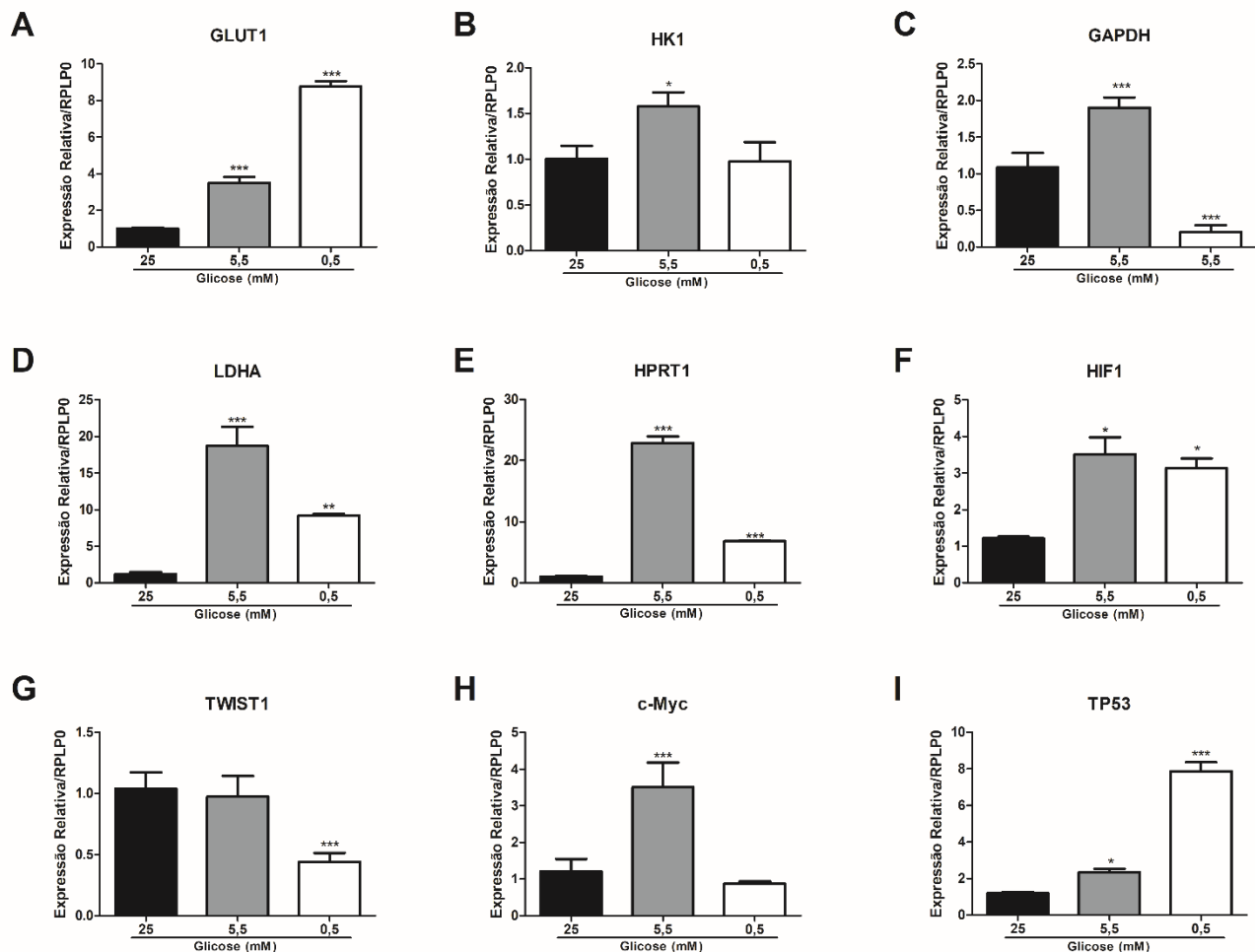


Fonte: dados da pesquisa.

### 5.11 Análise de expressão de mRNA

Adicionalmente, foi realizado a análise de expressão gênica de um painel de transcritos relacionados ao metabolismo da glicose (via glicolítica) (*GLUT1*, *HK1*, *GAPDH*, *LDHA*), metabolismo de nucleotídeos (*HPRT1*), transição epitélio-mesenquimal (*TWIST1*), hipóxia (*HIF1*), proliferação (*C-Myc*), regulação do ciclo celular e apoptose (*TP53*). Dessa forma, foi observado que a linhagem AGP-01 quando cultivada a 5,5 mM de glicose apresentou aumento na expressão dos genes *HK1* ( $p < 0,05$ ), *GLUT1* ( $p < 0,0001$ ), *GAPDH* ( $p < 0,0001$ ), *LDHA* ( $p < 0,0001$ ), *HPRT1* ( $p < 0,0001$ ), *HIF1* ( $p < 0,05$ ), *c-Myc* ( $p < 0,0001$ ) e *TP53* ( $p < 0,05$ ) e não modificou a expressão do gene *TWIST1*, relacionado a TEM, quando comparada linhagem cultivada a 25 mM de glicose. A linhagem estudada, quando cultivada em privação de glicose (0,5 mM) apresentou aumento na expressão dos genes *GLUT1* ( $p < 0,0001$ ), *LDHA* ( $p < 0,001$ ), *HPRT1* ( $p < 0,0001$ ), *HIF1* ( $p < 0,05$ ) e *TP53* ( $p < 0,0001$ ). Além disso, nessa condição não houve diferença na expressão de *HK1* e *c-Myc* e foi observada uma diminuição estatística na expressão de *GAPDH* ( $p < 0,0001$ ) e *TWIST1* ( $p < 0,0001$ ) quando comparada a linhagem cultivada a 25 mM de glicose (FIGURA 17).

Figura 17 - A alteração na concentração de glicose modula a expressão gênica na linhagem gástrica maligna AGP-01. Após 24 horas de exposição a diferentes concentrações de glicose, foi realizada a extração de mRNA e então seguiu-se a análise de expressão dos genes A) *GLUT1*, B) *HK1*, C) *GAPDH*, D) *LDHA*, E) *HPRT1*, F) *HIF1*, G) *TWIST1*, H) *c-Myc* e I) *TP53* por RT-qPCR. A expressão gênica foi normalizada através da expressão do gene endógeno *RPLP0* e o grupo das linhagens cultivadas a 25 mM foi utilizado como calibrador do experimento. As barras representam a média  $\pm$  desvio padrão da média de 3 experimentos independentes. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,001$ , \*\*\* $p < 0,0001$  comparado com células cultivadas a 25 mM por 1way ANOVA seguida de teste de Bonferroni, com nível de significância de 95% ( $p < 0,05$ ).



Fonte: dados da pesquisa.

De maneira geral, podemos sintetizar os resultados de caracterização fenotípica da linhagem AGP-01 cultivada em diferentes concentrações de glicose (25, 5,5 e 0,5 mM) na tabela 4 abaixo.

**Tabela 4 – Comparação dos resultados da caracterização fenotípica da linhagem AGP-01.** Os resultados foram comparados com a linhagem cultivadas em 25 mM de glicose e analisados estatisticamente 1way ou 2way ANOVA seguida por teste de Bonferroni, com nível de significância de 95% ( $p < 0,05$ ).

ENSAIO	Condição de cultivo	
	5,5 mM	0,5 mM
<b>Avaliação do potencial proliferativo</b>	Aumento no número de colônias	Diminuição no número de colônias



<b>Avaliação de alterações no ciclo celular e fragmentação</b>	Sem alteração	Aumento de células para Sub-G1 e arraste para G0/G1o número de colônias
<b>Avaliação de modificações morfológicas</b>	Sem alterações	Lise celular, afrouxamento de cromatina, fragmentação da membrana celular, presença da vacúolos intracelulares, cariólise e formação de corpos apoptóticos
<b>Avaliação da integridade de membrana e potencial de membrana mitocondrial (<math>\Delta\psi_m</math>)</b>	Sem alterações	Aumento de células com perfil apoptótico inicial (R123+/IP+) e com sinais de perca de função mitocondrial e/ou de apoptose intrínseca (R123-/IP-) com redução de células com perfil viável (R123+/IP)
<b>Avaliação dos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs)</b>	Sem alterações	Aumento na produção de EROs
<b>Avaliação do potencial migratório</b>	Sem alterações	Diminuição na migração a partir de 12 horas
<b>Avaliação da atividade de metaloproteinases</b>	Sem alterações	Diminuição na atividade de MMP 9

<b>Expressão gênica</b>		
<i>GLUT1</i>	Aumento	Aumento
<i>HK1</i>	Aumento	Sem alterações
<i>GAPDH</i>	Aumento	Diminuição
<i>LDHA</i>	Aumento	Aumento
<i>HPRT1</i>	Aumento	Aumento
<i>HIF1</i>	Aumento	Aumento
<i>TWIST1</i>	Sem alterações	Diminuição
<i>c-Myc</i>	Aumento	Sem alteração
<i>TP53</i>	Aumento	Aumento

Fonte: dados da pesquisa.

## 6 DISCUSSÃO

Devido ao seu elevado potencial proliferativo, as células tumorais adquirem uma enorme demanda por energia e para assegurar esse processo as células malignas passam por modificações metabólicas (LUNT; VANDER HEIDEN, 2011). Além do aumento no consumo de glicose e glutamina, diversas alterações metabólicas foram relatadas em diferentes sítios tumorais, como nas vias de biossíntese de lipídios e aminoácidos e outras macromoléculas (CHOI; PARK, 2018; JIN; ZHOU, 2019; POPE *et al.*, 2019). Visto que a reprogramação metabólica contribui significativamente pro desenvolvimento do câncer, entender esse mecanismo é essencial no desenvolvimento de novos compostos com alvo no metabolismo tumoral (LUENGO *et al.*, 2017).

No presente estudo, foram analisadas as diferenças nos parâmetros metabólicos das linhagens AGP-01, ACP-03, ACP-02 derivadas de tumores gástricos e da linhagem normal MNP-01 em diferentes condições de glicose para simular diferentes ambientes glicêmicos, a concentração fisiológica de glicose é aproximadamente 5,5 mM enquanto o ambiente em 25 mM simulada um ambiente hiperglicêmico e é comumente utilizado nos estudos de cultura celular *in vitro* (HAN *et al.*, 2011; ZHUANG *et al.*, 2014). O efeito nas diferentes condições de cultivo também foi utilizado para verificar modificações fenotípicas na proliferação, no ciclo celular, em alterações na membrana plasmática e na despolarização mitocondrial, na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), na migração, na atividade de metaloproteinases (MMPs) e na expressão gênica de transcritos relacionados a via glicolítica, a síntese de nucleotídeo, a regulação celular em estado de hipóxia, a transição epitélio-mesenquimal (TEM), a proliferação, ao controle do ciclo celular e a apoptose na linhagem metastática AGP-01.

As linhagens AGP-01, ACP-03 e ACP-02 são modelos *in vitro* de câncer gástrico (CG) utilizados em diversos estudos de novas drogas com potencial antitumoral (VARGAS *et al.*, 2015; FIGUEIREDO *et al.*, 2019; MESQUITA *et al.*, 2018; MONTENEGRO *et al.*, 2016; PINTO *et al.*, 2015, 2017, 2019), entretanto, os parâmetros metabólicos dessas células e sua influência na progressão tumoral permanecem pouco compreendidos.

A glicose é uma fonte crucial de energia, necessária para o desenvolvimento e para sobrevivência das células cancerosas. Estudos associaram o consumo metabólico de glicose ao crescimento e ao tempo de duplicação celular (FERNANDEZ-DE-COSSIO-DIAZ; VAZQUEZ, 2017). De fato, a linhagem gástrica do tipo difuso ACP-02 possui um tempo de

duplicação menor (20 horas) quando comparada a linhagem do tipo intestinal AGP-01 (24 horas) (MESQUITA *et al.*, 2018; PINTO *et al.*, 2015). No presente estudo, foi observado que a linhagem ACP-02 apresentou maior consumo de glicose nas condições analisadas, atestando assim que a captação de glicose está relacionada com seu perfil proliferativo *in vitro*. A linhagem metastática AGP-01, por sua vez, demonstrou um maior consumo quando comparada a linhagem gástrica normal (MNP-01) e a linhagem do tipo intestinal primário (ACP-03) em condições com menor concentração de glicose (5,5 e 0,5 mM).

Estudos mostram que há um aumento da atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) com a progressão maligna do tumor, sendo um fator utilizado como preditor de prognóstico na clínica. O aumento na atividade dessa enzima está associado à reprogramação metabólica tumoral, característica essa conhecida como efeito Warburg (KOUKOURAKIS; GIATROMANOLAKI, 2019). Adicionalmente, na privação de glicose, o lactato produzido pelo metabolismo anaeróbico é capaz de proteger as células tumorais através da regulação de vias associadas ao fenótipo glicolítico tumoral, e assim, preservar o seu potencial maligno (HU *et al.*, 2017). Nossos estudos corroboram com esses achados, visto que dentre as linhagens gástricas estudadas, a linhagem metastática do tipo intestinal AGP-01 foi a única que manteve os níveis de atividade intrínsecos da enzima (25 e 0,5 mM), demonstrando ainda um aumento significativo na sua atividade quando cultivada em 5,5 mM de glicose.

Dessa forma, verificamos que a linhagem gástrica do tipo intestinal AGP-01 demonstrou um perfil metabólico glicolítico aeróbico, apresentando uma alta atividade de LDH e aumento no consumo de glicose (quando cultivada em 5,5 e 0,5 mM). A linhagem AGP-01 apresenta uma grande relevância clínica por ser derivada de fluído ascítico e possuir um elevado potencial metastático. Assim, com o objetivo de melhor entender seus mecanismos celulares e moleculares em diferentes condições de cultivo, esta foi escolhida para os testes subsequentes de caracterização.

Por meio dos nossos estudos, foi verificado que a linhagem AGP-01 quando cultivada em 5,5 mM de glicose teve um aumento no número de colônias (aumento na clonogenicidade/proliferação celular) se comparado em células cultivadas com maior concentração do substrato (25 mM). Diferente dos nosso achados, Han e colaboradores (2015) mostraram um aumento no crescimento de duas linhagens de câncer endometrial (ECC-1 e Ishikawa) em meio com alta concentração de glicose (25 mM), quando comparado com células em meio com baixa glicose (5,5 mM) e livre de glicose (0 mM). No mesmo estudo, foi evidenciado que em alta concentração de glicose houve um aumento no número de colônias (aumento na clonogenicidade) de ambas as células se comparado com as linhagens cultivadas

em contrações inferiores de glicose. Esses achados indicam que, embora a glicose seja um nutriente essencial para o crescimento celular, células gástricas malignas são menos dependentes de uma alta concentração de substrato para proliferar.

No nosso estudo, foi observado que apenas as linhagens cultivadas em privação de glicose (0,5 mM) evidenciaram modificações morfológicas, como lise celular, afrouxamento da cromatina, fragmentação da membrana plasmática, aumento no número de vacúolos intracelulares, cariólise, formação de corpos apoptóticos e aumento de fragmentação celular caracterizado por células na fase Sub-G1. Essas características corroboram com um perfil de morte celular apoptótico (SU *et al.*, 2017; VASCONCELOS *et al.*, 2018), no estudo realizado por Iurlaro e colaboradores (2017) foi observado que linhagens de câncer cervical (HeLa) e de colón (HCT-116) em ausência de glicose sofreram morte por apoptose, mais especificamente por meio da via extrínseca pela ativação do receptor ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF (TRAIL), assim como indução de necroptose, também conhecida como um via necrótica controlada. Entretanto, nesse estudo a privação de glicose não induziu a via apoptótica intrínseca, caracterizada por despolarização mitocondrial e liberação de citocromo C. No presente trabalho, observamos que somente as células cultivadas em privação de glicose (0,5 mM) se demonstraram aumento na marcação com Iodeto de Propídio (IP) e diminuição de células marcadas com Rodamina 123 (R123+), sugerindo que ambos os mecanismos apoptóticos, extrínseco e intrínseco, podem estar ocorrendo em estado de ausência do substrato além de possíveis alterações na função mitocondrial.

Células cancerosas são mais responsivas à falta de glicose do que células normais, contudo o mecanismo de morte celular na ausência desse nutriente ainda não é bem esclarecido, estudos mostraram diferentes mecanismos de morte para diferentes tipos tumorais, e tais mecanismos divergem com o tempo de escassez (LEÓN-ANNICCHIARICO *et al.*, 2015; LOWMAN *et al.*, 2010).

Na reprogramação metabólica, as células malignas precisam ser capazes de produzir uma grande quantidade de energia para sustentar o crescimento celular, dessa forma, a análise do ciclo celular é uma etapa primordial para avaliação de novos alvos terapêuticos em condições de ausência de glicose e mudança do perfil metabólico (ROY *et al.*, 2017). No presente estudo não foi verificada diferença na distribuição do ciclo celular em células cultivadas em 25 e 5,5 mM, entretanto, quando cultivadas em 1 mM de glicose foi visualizado um arraste do ciclo celular para fase G0/G1. Chen e colaboradores (2019) analisaram modificações na distribuição do ciclo celular em células de câncer de cólon (SW480 e SW620) em diferentes concentrações de glicose, atestando um aumento de células na fase G1 em 25 mM de glicose se comparado

com células cultivadas em 5,5 mM do substrato, assim como redução de células na fase S relacionada ao aumento na concentração de glicose. Enquanto isso, como nos nossos estudos, em linhagens de câncer endometrial (ECC-1 e Ishikawa), não foram verificadas diferenças na distribuição do ciclo celular em células cultivadas em 25 e 5,5 mM, entretanto, quando cultivadas em 1 mM de glicose foi visualizado um arraste do ciclo celular para fase G0/G1. Além disso, foi constatado uma redução na expressão de proteínas quinases dependentes de ciclinas (CDKs) 4 e 6 em 1 mM de glicose (HAN *et al.*, 2015).

O maquinário de divisão celular é cuidadosamente regulado por pontos de checagem caracterizados pela ação de CDKs que atuam em complexo com suas respectivas ciclinas, e no câncer, esse mecanismo está constantemente ativado levando a um aumento da proliferação. CDK4 e CDK6 são pontos de checagem que controlam a progressão do ciclo celular de G0/G1 para a fase S, na ausência de glicose, esses pontos de checagem são ativados e a célula permanece na fase G0/G1 devido à falta de substrato para produção de energia e síntese de nucleotídeos na fase S (ICARD *et al.*, 2019; OTTO; SICINSKI, 2017).

No câncer, espécies reativas de oxigênio (EROs) possuem um papel ambíguo na progressão tumoral de concentração-dependente. Estudos mostraram que a produção extrema de EROs pode ocasionar dano celular oxidativo e promover morte celular, um mecanismo de ação utilizado no estudo de agentes anticâncer (YANG *et al.*, 2018; ZHANG *et al.*, 2019). Em concentrações inferiores de EROs, essas espécies são capazes de aumentar a regulação de vias celulares relacionadas à divisão, sobrevivência, invasão, metástase e resistência celular a quimioterápicos (NISHIKAWA *et al.*, 2009; ZHU *et al.*, 2015). Além, disso o aumento nos níveis de EROs pode ser uma consequência do aumento no metabolismo mitocondrial e da fosforilação oxidativa (OXPHOS), levando a produção elevada de espécimes de  $H_2O_2$  e  $O_2^-$  na mitocôndria, subprodutos da respiração celular (PANIERI; SANTORO, 2016).

No nosso estudo, foi visualizado que a linhagem de CG AGP-01 atestou aumento na produção de EROs em baixas concentrações de glicose (0,5 mM), assim como também demonstrou despolarização da membrana mitocondrial caracterizado por células negativas para marcação com Rodamina 123 (R123-). No metabolismo tumoral, a privação de glicose pode ocasionar um aumento dos níveis de EROs devido a disfunções mitocondriais ocasionadas pela deficiência na concentração de substrato para a produção de energia e da manutenção da taxa proliferativa (BHATTI *et al.*, 2017; JEZEK *et al.*, 2018; MURPHY, 2013).

Estudos realizados com células de câncer pancreático (Panc-1 e CFPAC-1) atestaram um aumento na produção de EROs em células cultivadas em meio com 25 mM de glicose quando comparadas com células cultivadas a 5,5 mM. Além disso, o aumento de EROs foi

relacionado ao aumento do perfil migratório pela ativação da via quinase regulada por sinal extracelular (ERK) e de proteínas quinases ativadas por mitógenos p-38 (MAPK), assim como diminuição na regulação da via de quinases c-Jun-N-terminal (JNK) em 25 mM de glicose (CAO *et al.*, 2016; LUO *et al.*, 2018). Spitz e colaboradores (2006) mostraram aumento da síntese de glutathiona como um sinal de indução de estresse oxidativo na privação de glicose em linhagens de fibroblastos humanos transformados (SV40).

No CG, a presença de ascite maligna é normalmente relacionada a disseminação peritoneal, conhecida como carcinomatose peritonial, um modo de CG recorrente que indica um prognóstico ruim e diminuição na expectativa de vida do paciente. No Japão, estudos realizados entre 1960 e 1999 demonstraram que a incidência de disseminação peritoneal e de ascite devido ao CG somam mais de 40% dos casos diagnosticados (MAEDA *et al.*, 2015). O desenvolvimento de metástase peritoneal inclui etapas consecutivas, como desprendimento de células do tumor primário, migração para o peritônio, transição epitelial-mesenquimal (TEM) do mesotélio peritoneal, invasão do tecido subperitoneal, proliferação com infiltração do estroma de células e proliferação atrelada a angiogênese e/ou linfagiogênese (YONEMURA *et al.*, 2007).

No presente trabalho, foi observado que a linhagem AGP-01, quando cultivada em 0,5 mM de glicose, demonstrou redução na migração, assim como na atividade de MMP9 e na expressão do transcrito *TWIST1*. A linhagem AGP-01, quando cultivada em 25 e 5,5 mM de glicose não demonstrou modificações no seu potencial migratório, na atividade de MMPs e na expressão do gene *TWIST1*. Endo e colaboradores (2018) demonstraram que linhagens derivadas de carcinoma hepático (HepG2) cultivadas em baixas concentrações de glicose (1 mM) atestaram aumento do perfil migratório, invasivo e na atividade da MMP9. De modo contrário, linhagens de câncer de cólon (HCT-116 e HT-29) e mama (MCF-7 e MDA-MB-231), quando cultivadas em 25 mM de glicose demonstraram aumento na migração e invasão, quando comparadas a linhagens cultivadas a 5,5 mM. Ainda, nas linhagens de colón em 25 mM de glicose foi visualizado aumento na concentração da proteína Vimentina e redução de E-caderina, atestando a aquisição de marcadores mesenquimais e perda de marcadores epiteliais (SUN *et al.*, 2019; WU *et al.*, 2018).

No metabolismo tumoral, as células são mais dependentes da via glicolítica para a produção de energia, portanto o entendimento das alterações das enzimas glicolíticas é essencial e têm sido descrita como uma nova área para o estudo de alvos para terapias antitumorais (MARTINEZ-OUTSCHOORN *et al.*, 2017; XINTAROPOULOU *et al.*, 2015). O gene *c-Myc* possui aumento na expressão no CG e apresenta amplificação na linhagem AGP-01, estudos

demonstraram que *c-Myc* regula constituintes metabólicos relacionados à síntese de DNA/RNA e a via glicolítica, como timidilado quinase (TMPK), transportador de glicose 1 (GLUT1), hexokinase II (HKII), lactato desidrogenase A (LDHA) e piruvato quinase M2 (PCM2) (OSTHUS *et al.*, 2000; PUSCH *et al.*, 1997; SHIM *et al.*, 1997; TATEISHI *et al.*, 2016). Adicionalmente, *c-Myc* está envolvido na regulação de fatores de transcrição de microRNAs relacionados com reprogramação metabólica em vias de degradação de ácidos graxos, glutamina e prolina (EDMUNDS *et al.*, 2014; GAO *et al.*, 2009; LIU *et al.*, 2012; MANNAVA *et al.*, 2008).

No nosso estudo, foi visualizado um aumento na expressão do gene *c-Myc* em células cultivadas em meio com 5,5 mM de glicose, assim como aumento na concentração dos transcritos relacionados a via glicolítica, como do transportador de glicose (*GLUT1*), hexokinase I (*HK1*), gliceraldeído fosfato desidrogenase (*GAPDH*), e lactato desidrogenase (LDHA) e do gene *HPRT1*, relacionado a regulação da síntese de nucleotídeos purínicos. Desta forma, nesse trabalho foi possível inferir o papel do gene *c-Myc* na estimulação glicolítica, síntese de nucleotídeos e no aumento da proliferação de células cultivadas nessas condições.

Em situações de pouca disponibilidade de oxigênio (hipóxia), células ativam uma variedade de respostas para manter a sobrevivência celular. O fator de indução por hipóxia (HIF) 1 e 2 são agentes que regulam respostas adaptativas à hipóxia por meio da transcrição de inúmeros genes envolvidos na sobrevivência celular, proliferação, angiogênese e metabolismo (MAJMUNDAR *et al.*, 2010; SEMENZA, 2003). No câncer, a deficiência na irrigação sanguínea leva a diminuição da disponibilidade de oxigênio e nutrientes no centro do tumor, levando a um aumento significativo na expressão do gene *HIF1*, este por sua vez possui papel na reprogramação metabólica tumoral por meio do aumento do metabolismo glicolítico e da expressão de genes codificantes para GLUT1, transportadores de sódio-glicose (SGLT) e da regulação de genes relacionados a OXPHOs, como um aumento na atividade da enzima piruvato quinase (PK) e da redução concomitante da atividade de piruvato desidrogenase quinase (PDK) (DENKO, 2008; SINGH *et al.*, 2017). Adicionalmente, estudos demonstraram que *c-Myc* induz *HIF1* de maneira pós-transcricional e, em combinação, esses regulam a expressão dos genes codificantes para hexokinase II (*HK2*), fosfofrutoquinase (*PFK1*), triose-fosfato isomerase (*TPI*), *PDK*, *LDHA*, e genes da via da glutaminólise (DOE *et al.*, 2012; KIM *et al.*, 2007; THORÉN *et al.*, 2017). Neste estudo, o aumento da expressão de *HIF1* foi observado na linhagem AGP-01 quando cultivada nas concentrações de 0,5 e 5,5 mM de glicose em resposta a privação de glicose. Esse aumento também foi observado na concentração dos transcritos para *GLUT1* e *LDHA* nas mesmas condições. Entretanto, apesar de aumento na



expressão de *HIF1* em células cultivadas em 0,5 e 5,5 mM de glicose, o gene *c-Myc* apenas demonstrou aumento significativo em células cultivadas em 5,5 mM de glicose.

A proteína p53, codificada pelo gene *TP53*, é um agente supressor tumoral que busca prevenir a carcinogênese. Diversos estudos mostraram que a proteína p53 é capaz de induzir apoptose, parada no ciclo celular e senescência em células pré-cancerosas (MELLO; ATTARDI, 2018). O papel da p53 na mudança metabólica do câncer ainda é controverso, estudos mostraram que a p53 selvagem aumenta o metabolismo mitocondrial através da OXPHOS em detrimento da glicólise, diminui a expressão de transportadores de glicose (GLUT1 e GLUT4), inibe a atividade da enzima glicose-6-fosfato-desidrogenase (G6PDH) na via das pentoses fosfato (PPP) e aumenta a expressão de inibidores glicolíticos (*RRAD* e *TIGAR*) (BENSAAD *et al.*, 2006; HU *et al.*, 2010; JIANG *et al.*, 2011; MATOBA *et al.*, 2006; SCHWARTZENBERG-BAR-YOSEPH *et al.*, 2004; ZHANG *et al.*, 2014). Contudo, um estudo recente realizado por Kim e colaboradores (2019) mostrou que a proteína p53 selvagem suprime a entrega de piruvato para a mitocôndria, reduzindo OXPHOS por meio do aumento na expressão da proteína moduladora de apoptose regulada por p53 (PUMA) em linhagens de hepatocarcinoma (HepG2).

No presente estudo, foi evidenciado aumento na expressão de *TP53* na linhagem AGP-01 cultivada em 0,5 e 5,5 mM quando comparada à linhagem cultivada em 25 mM de glicose. Em condições de privação de glicose (0,5 mM) a linhagem AGP-01 mostrou aumento da permeabilização mitocondrial, assim como nos níveis de EROs com arraste de ciclo celular para G0/G1, modificações morfológicas com características apoptóticas, aumento de fragmentação e permeabilização da membrana plasmática. Como mencionado anteriormente, a expressão de *TP53* está relacionada ao aumento do metabolismo mitocondrial, e em consequência ocorre aumento na produção de EROs levando a despolarização da membrana mitocondrial e, por fim, a ativação do processo apoptótico (PANIERI; SANTORO, 2016). Curiosamente, células cultivadas em meio com 5,5 mM de glicose com aumento na expressão de *TP53* demonstraram maiores concentrações de transcritos *HIF1*, *GLUT1*, *HPRT1* e *LDHA*. Isso pode se dever ao fato de que células cancerosas, em resposta a diferentes condições nutricionais, adquirem plasticidade metabólica e o aumento do fluxo metabólico ocorre como uma estratégia para garantir sobrevivência e crescimento em ambientes com falta de oxigênio e nutrientes (CLUNTUN *et al.*, 2017; GATENBY; GILLIES, 2008).

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Dessa forma, por meio do presente estudo resultados iniciais obtidos podemos concluir que as linhagens do tipo intestinal (AGP-01 e ACP-03) possuem um perfil metabólico glicolítico aeróbico, por apresentarem alta atividade da enzima LDH e maior viabilidade quando cultivadas em diferentes concentrações de glicose. Além disso, foi verificado que a linhagem maligna AGP-01, quando cultivada em privação de glicose (0,5 mM) apresentou diminuição no número de colônias, modificações morfológicas e aumento na fragmentação celular, sinais característicos do processo apoptótico, além de arraste do ciclo celular para G0/G1, aumento de permeabilização na membrana celular e na despolarização mitocondrial, assim como na produção de EROs, indicando uma possível disfunção no aparato mitocondrial. Além disso foi verificado diminuição na migração e na atividade de MMP9, ligado a diminuição na expressão do regulador de TEM *TWIST1*, assim como aumento na expressão dos genes *GLUT1*, *LDHA*, *HPRT1*, *HIF1* e *TP53*.

Entretanto, AGP-01 quando cultivada na concentração de 5,5 mM não apresentou diferença nos parâmetros de morte e viabilidade estudados (morfologia, fragmentação celular e integridade de membrana plasmática/mitocondrial), assim como não houveram alterações no ciclo celular, na produção de EROs, na migração e atividade de MMPs quando comparadas com as linhagens cultivadas em alta concentração de glicose (25 mM). Apesar disso, foi visualizado aumento no perfil proliferativo da AGP-01 quando cultivada a 5,5 mM de glicose ligado ao aumento na expressão dos genes *HK1*, *GLUT1*, *GAPDH*, *LDHA*, *HPRT1*, *HIF1*, *c-Myc* e *TP53*.

Portanto, com o presente trabalho foi possível compreender de maneira mais abrangente como a modificação na concentração e glicose altera o fenótipo metabólico tumoral da linhagem estática gástrica maligna AGP-01. As concentrações hiperglicêmicas (25 mM) de glicose frequentemente utilizadas nos estudos *in vitro* podem alterar os fenótipos encontrados em condições normais de glicemia (5,5 mM) em pacientes não diabéticos.

## REFERÊNCIAS

- ALISSON-SILVA, Frederico; FREIRE-DE-LIMA, Leonardo; DONADIO, Joana L.; *et al.* Increase of O-Glycosylated Oncofetal Fibronectin in High Glucose-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition of Cultured Human Epithelial Cells. **PLOS ONE**, v. 8, n. 4, p. e60471, 2013.
- ALIZADEH, Ali Mohammad; SHIRI, Sadaf; FARSINEJAD, Sadaf. Metastasis review: from bench to bedside. **Tumor Biology**, v. 35, n. 9, p. 8483–8523, 2014.
- AMARAL, Márcia Vanessa Sales; PORTILHO, Adrhyann Jullyanne De Sousa; SILVA, Emerson Lucena Da; *et al.* Establishment of Drug-resistant Cell Lines as a Model in Experimental Oncology: A Review. **Anticancer Research**, v. 39, n. 12, p. 6443–6455, 2019.
- BAI, Jingwen; LI, Yaochen; ZHANG, Guojun. Cell cycle regulation and anticancer drug discovery. **Cancer Biology & Medicine**, v. 14, n. 4, p. 348–362, 2017.
- BAO, Zhiyao; CHEN, Keqiang; KREPEL, Stacey; *et al.* High Glucose Promotes Human Glioblastoma Cell Growth by Increasing the Expression and Function of Chemoattractant and Growth Factor Receptors. **Translational Oncology**, v. 12, n. 9, p. 1155–1163, 2019.
- BARRANCO, S. C.; TOWNSEND, C. M.; CASARTELLI, C.; *et al.* Establishment and characterization of an in vitro model system for human adenocarcinoma of the stomach. **Cancer Research**, v. 43, n. 4, p. 1703–1709, 1983.
- BARTHEL, Andreas; OKINO, Steven; LIAO, Jinfang; *et al.* Regulation of GLUT1 gene transcription by the serine/threonine kinase Akt1. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 29, p. 20281–20286, 1999.
- BENSAAD, Karim; TSURUTA, Atsushi; SELAK, Mary A.; *et al.* TIGAR, a p53-inducible regulator of glycolysis and apoptosis. **Cell**, v. 126, n. 1, p. 107–120, 2006.
- BHATTI, Jasvinder Singh; BHATTI, Gurjit Kaur; REDDY, P. Hemachandra. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in metabolic disorders — A step towards mitochondria based therapeutic strategies. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1863, n. 5, p. 1066–1077, 2017.
- BIKAS, Athanasios; JENSEN, Kirk; PATEL, Aneeta; *et al.* Glucose-deprivation increases thyroid cancer cells sensitivity to metformin. **Endocrine-Related Cancer**, v. 22, n. 6, p. 919–932, 2015.
- BILSKI, P.; BELANGER, A. G.; CHIGNELL, C. F. Photosensitized oxidation of 2',7'-dichlorofluorescein: singlet oxygen does not contribute to the formation of fluorescent oxidation product 2',7'-dichlorofluorescein. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 33, n. 7, p. 938–946, 2002.
- BISWAL, Biranchi Narayan; DAS, Surya Narayan; DAS, Bijoy Kumar; *et al.* Alteration of cellular metabolism in cancer cells and its therapeutic prospects. **Journal of Oral and Maxillofacial Pathology : JOMFP**, v. 21, n. 2, p. 244–251, 2017.

- BLACKADAR, Clarke Brian. Historical review of the causes of cancer. **World Journal of Clinical Oncology**, v. 7, n. 1, p. 54–86, 2016.
- BOROUGHES, Lindsey K.; DEBERARDINIS, Ralph J. Metabolic pathways promoting cancer cell survival and growth. **Nature cell biology**, v. 17, n. 4, p. 351–359, 2015.
- BRAY, Freddie; FERLAY, Jacques; SOERJOMATARAM, Isabelle; *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.
- BUSTIN, Stephen A.; BENES, Vladimir; GARSON, Jeremy A.; *et al.* The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611–622, 2009.
- CAI, J.; WEI, D.; GAO, C. F.; *et al.* A prospective randomized study comparing open versus laparoscopy-assisted D2 radical gastrectomy in advanced gastric cancer. **Digestive Surgery**, v. 28, n. 5–6, p. 331–337, 2011.
- CALCAGNO, Danielle Queiroz; FREITAS, Vanessa Morais; LEAL, Mariana Ferreira; *et al.* MYC, FBXW7 and TP53 copy number variation and expression in Gastric Cancer. **BMC Gastroenterology**, v. 13, n. 1, p. 141, 2013.
- CAO, Lei; CHEN, Xin; XIAO, Xue; *et al.* Resveratrol inhibits hyperglycemia-driven ROS-induced invasion and migration of pancreatic cancer cells via suppression of the ERK and p38 MAPK signaling pathways. **International Journal of Oncology**, v. 49, n. 2, p. 735–743, 2016.
- CARDACI, Simone; DESIDERI, Enrico; CIRIOLO, Maria Rosa. Targeting aerobic glycolysis: 3-bromopyruvate as a promising anticancer drug. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 44, n. 1, p. 17–29, 2012.
- CASTAÑO-RODRÍGUEZ, Natalia; KAAKOUSH, Nadeem O.; MITCHELL, Hazel M. Pattern-Recognition Receptors and Gastric Cancer. **Frontiers in Immunology**, v. 5, 2014.
- CHAN, Denise; SUTPHIN, Patrick; NGUYEN, Phuong; *et al.* Targeting GLUT1 and the Warburg effect in renal cell carcinoma by chemical synthetic lethality. **Science Translational Medicine**, v. 3, n. 94, p. 94ra70, 2011.
- CHEN, Shengyong; ZHAO, Mingzhu; WU, Guang; *et al.* Recent Advances in Morphological Cell Image Analysis. **Computational and Mathematical Methods in Medicine**, v. 2012, 2012.
- CHEN, Ya-Chun; OU, Ming-Che; FANG, Chia-Wei; *et al.* High Glucose Concentrations Negatively Regulate the IGF1R/Src/ERK Axis through the MicroRNA-9 in Colorectal Cancer. **Cells**, v. 8, n. 4, p. 326, 2019.
- CHOI, Mun Ki; KIM, Gwang Ha; PARK, Do Youn; *et al.* Long-term outcomes of endoscopic submucosal dissection for early gastric cancer: a single-center experience. **Surgical Endoscopy**, v. 27, n. 11, p. 4250–4258, 2013.
- CHOI, Yeon-Kyung; PARK, Keun-Gyu. Targeting Glutamine Metabolism for Cancer Treatment. **Biomolecules & Therapeutics**, v. 26, n. 1, p. 19–28, 2018.

CLEM, Brian; TELANG, Sucheta; CLEM, Amy; *et al.* Small-molecule inhibition of 6-phosphofructo-2-kinase activity suppresses glycolytic flux and tumor growth. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 7, n. 1, p. 110–120, 2008.

CLUNTUN, Ahmad A; LUKEY, Michael J; CERIONE, Richard A; *et al.* Glutamine Metabolism in Cancer: Understanding the Heterogeneity. **Trends in cancer**, v. 3, n. 3, p. 169–180, 2017.

CORREA, Pelayo. Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process--First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention. **Cancer Research**, v. 52, n. 24, p. 6735–6740, 1992.

CROWLEY, Lisa; CHOJNOWSKI, Grace; WATERHOUSE, Nigel J. Measuring the DNA Content of Cells in Apoptosis and at Different Cell-Cycle Stages by Propidium Iodide Staining and Flow Cytometry. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2016, n. 10, 2016.

DANG, Chi; LE, Anne; GAO, Ping. MYC-induced cancer cell energy metabolism and therapeutic opportunities. **Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research**, v. 15, n. 21, p. 6479–6483, 2009.

DARZYNKIEWICZ, Zbigniew; LI, Xun; GONG, Jianping. Assays of cell viability: discrimination of cells dying by apoptosis. **Methods in Cell Biology**, v. 41, p. 15–38, 1994.

DE MAS, Igor Marín; AGUILAR, Esther; JAYARAMAN, Anusha; *et al.* Cancer cell metabolism as new targets for novel designed therapies. **Future Medicinal Chemistry**, v. 6, n. 16, p. 1791–1810, 2014.

DE SOUZA, Carolina Rosal Teixeira; ALMEIDA, Marcelli Carolini Alves; KHAYAT, André Salim; *et al.* Association between Helicobacter pylori, Epstein-Barr virus, human papillomavirus and gastric adenocarcinomas. **World Journal of Gastroenterology**, v. 24, n. 43, p. 4928–4938, 2018.

DE VITA, F.; GIULIANI, F.; ORDITURA, M.; *et al.* Adjuvant chemotherapy with epirubicin, leucovorin, 5-fluorouracil and etoposide regimen in resected gastric cancer patients: a randomized phase III trial by the Gruppo Oncologico Italia Meridionale (GOIM 9602 Study). **Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology**, v. 18, n. 8, p. 1354–1358, 2007.

DENKO, Nicholas C. Hypoxia, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumour. **Nature Reviews. Cancer**, v. 8, n. 9, p. 705–713, 2008.

DOBRYNIN, Ya. Establishment and Characteristics of Cell Strains From Some Epithelial Tumors of Human Origin. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 31, n. 5, p. 1173–1195, 1963.

DOE, Megan; ASCANO, Janice; KAUR, Mandeep; *et al.* Myc post-transcriptionally induces HIF1 protein and target gene expression in normal and cancer cells. **Cancer Research**, v. 72, n. 4, p. 949–957, 2012.

EDMUNDS, Lia; SHARMA, Lokendra; KANG, Audry; *et al.* c-Myc programs fatty acid metabolism and dictates acetyl-CoA abundance and fate. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 36, p. 25382–25392, 2014.

ENDO, Hitoshi; OWADA, Satoshi; INAGAKI, Yutaka; *et al.* Glucose starvation induces LKB1-AMPK-mediated MMP-9 expression in cancer cells. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 10122, 2018.

FADAKA, Adewale; AJIBOYE, Basiru; OJO, Oluwafemi; *et al.* Biology of glucose metabolization in cancer cells. **Journal of Oncological Sciences**, v. 3, n. 2, p. 45–51, 2017.

FERLAY, J.; STELIAROVA-FOUCHER, E.; LORTET-TIEULENT, J.; *et al.* Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. **European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)**, v. 49, n. 6, p. 1374–1403, 2013.

FERLAY, Jacques; SOERJOMATARAM, Isabelle; DIKSHIT, Rajesh; *et al.* Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **International Journal of Cancer**, v. 136, n. 5, p. E359-386, 2015.

FERNANDEZ-DE-COSSIO-DIAZ, Jorge; VAZQUEZ, Alexei. Limits of aerobic metabolism in cancer cells. **Scientific Reports**, v. 7, 2017.

FERRO, Ana; PELETEIRO, Bárbara; MALVEZZI, Matteo; *et al.* Worldwide trends in gastric cancer mortality (1980-2011), with predictions to 2015, and incidence by subtype. **European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)**, v. 50, n. 7, p. 1330–1344, 2014.

FIGUEIREDO, Pablo Luis B.; PINTO, Laine C.; DA COSTA, Jamile S.; *et al.* Composition, antioxidant capacity and cytotoxic activity of Eugenia uniflora L. chemotype-oils from the Amazon. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 232, p. 30–38, 2019.

FIUME, Luigi; VETTRAINO, Marina; MANERBA, Marcella; *et al.* Inhibition of lactic dehydrogenase as a way to increase the anti-proliferative effect of multi-targeted kinase inhibitors. **Pharmacological Research**, v. 63, n. 4, p. 328–334, 2011.

GAO, Ping; TCHERNYSHYOV, Irina; CHANG, Tsung-Cheng; *et al.* c-Myc suppression of miR-23a/b enhances mitochondrial glutaminase expression and glutamine metabolism. **Nature**, v. 458, n. 7239, p. 762–765, 2009.

GATENBY, Robert A.; GILLIES, Robert J. A microenvironmental model of carcinogenesis. **Nature Reviews. Cancer**, v. 8, n. 1, p. 56–61, 2008.

GHANBARI MOVAHED, Zahra; RASTEGARI-POUYANI, Mohsen; MOHAMMADI, Mohammad hossein; *et al.* Cancer cells change their glucose metabolism to overcome increased ROS: One step from cancer cell to cancer stem cell? **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 112, p. 108690, 2019.

GOUBRAN, Hadi A.; KOTB, Rami R.; STAKIW, Julie; *et al.* Regulation of tumor growth and metastasis: the role of tumor microenvironment. **Cancer Growth and Metastasis**, v. 7, p. 9–18, 2014.

GRANCHI, Carlotta; FANCELLI, Daniele; MINUTOLO, Filippo. An update on therapeutic opportunities offered by cancer glycolytic metabolism. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 24, n. 21, p. 4915–4925, 2014.

GRANCHI, Carlotta; ROY, Sarabindu; GIACOMELLI, Chiara; *et al.* Discovery of N-hydroxyindole-based inhibitors of human lactate dehydrogenase isoform A (LDH-A) as

starvation agents against cancer cells. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 54, n. 6, p. 1599–1612, 2011.

GUAN, Xiangming. Cancer metastases: challenges and opportunities. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 5, n. 5, p. 402–418, 2015.

GUPTA, Anshu; DWIVEDI, Tanima. A Simplified Overview of World Health Organization Classification Update of Central Nervous System Tumors 2016. **Journal of Neurosciences in Rural Practice**, v. 8, n. 4, p. 629–641, 2017.

GUPTA, Chanchal; TIKOO, Kulbhushan. High glucose and insulin differentially modulates proliferation in MCF-7 and MDA-MB-231 cells. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 51, n. 1, p. 119–129, 2013.

HALLISSEY, M. T.; DUNN, J. A.; WARD, L. C.; *et al.* The second British Stomach Cancer Group trial of adjuvant radiotherapy or chemotherapy in resectable gastric cancer: five-year follow-up. **Lancet (London, England)**, v. 343, n. 8909, p. 1309–1312, 1994.

HAN, Jianjun; ZHANG, Lu; GUO, Hui; *et al.* Glucose promotes cell proliferation, glucose uptake and invasion in endometrial cancer cells via AMPK/mTOR/S6 and MAPK signaling. **Gynecologic oncology**, v. 138, n. 3, p. 668–675, 2015.

HAN, Liang; MA, Qingyong; LI, Junhui; *et al.* High Glucose Promotes Pancreatic Cancer Cell Proliferation via the Induction of EGF Expression and Transactivation of EGFR. **PLoS ONE**, v. 6, n. 11, 2011.

HANAHAH, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57–70, 2000.

HANAHAH, Douglas; WEINBERG, Robert A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011.

HARRINGTON, Kevin J. The biology of cancer. **Medicine**, v. 44, n. 1, p. 1–5, 2016.

HASSANPOUR, Seyed Hossein; DEHGHANI, Mohammadamin. Review of cancer from perspective of molecular. **Journal of Cancer Research and Practice**, v. 4, n. 4, p. 127–129, 2017.

HEID, C. A.; STEVENS, J.; LIVAK, K. J.; *et al.* Real time quantitative PCR. **Genome Research**, v. 6, n. 10, p. 986–994, 1996.

HEIDEN, Matthew G. Vander; CANTLEY, Lewis C.; THOMPSON, Craig B. Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. **Science**, v. 324, n. 5930, p. 1029–1033, 2009.

HEUSSEN, C.; DOWDLE, E. B. Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. **Analytical Biochemistry**, v. 102, n. 1, p. 196–202, 1980.

HOROBIN, R. W. How Romanowsky stains work and why they remain valuable — including a proposed universal Romanowsky staining mechanism and a rational troubleshooting scheme. **Biotechnic & Histochemistry**, v. 86, n. 1, p. 36–51, 2011.

- HU, Wenwei; ZHANG, Cen; WU, Rui; *et al.* Glutaminase 2, a novel p53 target gene regulating energy metabolism and antioxidant function. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 16, p. 7455–7460, 2010.
- HU, Xun; CHAO, Ming; WU, Hao. Central role of lactate and proton in cancer cell resistance to glucose deprivation and its clinical translation. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 2, n. 1, p. 1–8, 2017.
- HUME, D. A.; WEIDEMANN, M. J. Role and regulation of glucose metabolism in proliferating cells. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 62, n. 1, p. 3–8, 1979.
- ICARD, Philippe; FOURNEL, Ludovic; WU, Zherui; *et al.* Interconnection between Metabolism and Cell Cycle in Cancer. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 44, n. 6, p. 490–501, 2019.
- INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **O que é câncer?**. Rio de Janeiro, 2018. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/o-que-e-cancer>>. Acesso em: 15 novembro 2019.
- IRIGARAY, P.; BELPOMME, D. Basic properties and molecular mechanisms of exogenous chemical carcinogens. **Carcinogenesis**, v. 31, n. 2, p. 135–148, 2010.
- IURLARO, Raffaella; PÜSCHEL, Franziska; LEÓN-ANNICCHIARICO, Clara Lucía; *et al.* Glucose Deprivation Induces ATF4-Mediated Apoptosis through TRAIL Death Receptors. **Molecular and Cellular Biology**, v. 37, n. 10, 2017.
- JAN, Rehmat; CHAUDHRY, Gul-e-Saba. Understanding Apoptosis and Apoptotic Pathways Targeted Cancer Therapeutics. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 9, n. 2, p. 205–218, 2019.
- JEMAL, Ahmedin; WARD, Elizabeth M.; JOHNSON, Christopher J.; *et al.* Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, 1975-2014, Featuring Survival. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 109, n. 9, 2017.
- JEŽEK, Jan; COOPER, Katrina F.; STRICH, Randy. Reactive Oxygen Species and Mitochondrial Dynamics: The Yin and Yang of Mitochondrial Dysfunction and Cancer Progression. **Antioxidants**, v. 7, n. 1, 2018.
- JIANG, Peng; DU, Wenjing; WANG, Xingwu; *et al.* p53 regulates biosynthesis through direct inactivation of glucose-6-phosphate dehydrogenase. **Nature Cell Biology**, v. 13, n. 3, p. 310–316, 2011.
- JIANG, Wen G.; ABLIN, Richard J. Cancer metastasis, challenges, progress and the opportunities. **Frontiers in Bioscience (Elite Edition)**, v. 3, p. 391–394, 2011.
- JIN, Lin; ZHOU, Yanhong. Crucial role of the pentose phosphate pathway in malignant tumors (Review). **Oncology Letters**, 2019.
- JOHN, A.; TUSZYNSKI, G. The role of matrix metalloproteinases in tumor angiogenesis and tumor metastasis. **Pathology oncology research: POR**, v. 7, n. 1, p. 14–23, 2001.



KAJI, Masahiro; MORIYAMA, Satoru; SASAKI, Hidefumi; *et al.* Gelatinolytic activity of matrix metalloproteinase in lung cancer studied using film in situ zymography stamp method. **Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)**, v. 39, n. 2, p. 125–130, 2003.

KATADA, Natsuya; SAKURAMOTO, Shinichi; YAMASHITA, Keishi; *et al.* Comparison of the Heller-Toupet procedure with the Heller-Dor procedure in patients who underwent laparoscopic surgery for achalasia. **Surgery Today**, v. 44, n. 4, p. 732–739, 2014.

KIM, Jinchul; YU, Lili; CHEN, Wancheng; *et al.* Wild-Type p53 Promotes Cancer Metabolic Switch by Inducing PUMA-Dependent Suppression of Oxidative Phosphorylation. **Cancer Cell**, v. 35, n. 2, p. 191–203.e8, 2019.

KIM, Jung-whan; GAO, Ping; LIU, Yen-Chun; *et al.* Hypoxia-Inducible Factor 1 and Dysregulated c-Myc Cooperatively Induce Vascular Endothelial Growth Factor and Metabolic Switches Hexokinase 2 and Pyruvate Dehydrogenase Kinase 1. **Molecular and Cellular Biology**, v. 27, n. 21, p. 7381–7393, 2007.

KINZLER, K. W.; VOGELSTEIN, B. Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers. **Nature**, v. 386, n. 6627, p. 761, 763, 1997.

KLAUNIG, J. E.; KAMENDULIS, L. M.; XU, Y. Epigenetic mechanisms of chemical carcinogenesis. **Human & Experimental Toxicology**, v. 19, n. 10, p. 543–555, 2000.

KLIJN, Christiaan; DURINCK, Steffen; STAWISKI, Eric W.; *et al.* A comprehensive transcriptional portrait of human cancer cell lines. **Nature Biotechnology**, v. 33, n. 3, p. 306–312, 2015.

KO, Kyung Jai; SHIM, Jung Ho; YOO, Han Mo; *et al.* The clinical value of non-curative resection followed by chemotherapy for incurable gastric cancer. **World Journal of Surgery**, v. 36, n. 8, p. 1800–1805, 2012.

KOBAYASHI, Jun. Effect of diet and gut environment on the gastrointestinal formation of N-nitroso compounds: A review. **Nitric Oxide: Biology and Chemistry**, v. 73, p. 66–73, 2018.

KOUKOURAKIS, Michael I.; GIATROMANOLAKI, Alexandra. Warburg effect, lactate dehydrogenase, and radio/chemo-therapy efficacy. **International Journal of Radiation Biology**, v. 95, n. 4, p. 408–426, 2019.

LAMOUILLE, Samy; XU, Jian; DERYNCK, Rik. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, v. 15, n. 3, p. 178–196, 2014.

LAUREN, P. THE TWO HISTOLOGICAL MAIN TYPES OF GASTRIC CARCINOMA: DIFFUSE AND SO-CALLED INTESTINAL-TYPE CARCINOMA. AN ATTEMPT AT A HISTO-CLINICAL CLASSIFICATION. **Acta Pathologica Et Microbiologica Scandinavica**, v. 64, p. 31–49, 1965.

LEAL, Mariana Ferreira; CALCAGNO, Danielle Queiroz; BORGES DA COSTA, Joana de Fátima Ferreira; *et al.* MYC, TP53, and Chromosome 17 Copy-Number Alterations in Multiple Gastric Cancer Cell Lines and in Their Parental Primary Tumors. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2011, 2011.

LEAL, Mariana Ferreira; NASCIMENTO, José Luiz Martins do; SILVA, Carla Elvira Araújo da; *et al.* Establishment and conventional cytogenetic characterization of three gastric cancer cell lines. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, v. 195, n. 1, p. 85–91, 2009.

LEÓN-ANNICCHIARICO, Clara Lucía; RAMÍREZ-PEINADO, Silvia; DOMÍNGUEZ-VILLANUEVA, Dídac; *et al.* ATF4 mediates necrosis induced by glucose deprivation and apoptosis induced by 2-deoxyglucose in the same cells. **The FEBS journal**, v. 282, n. 18, p. 3647–3658, 2015.

LI, Xiaojuan; LI, Jun; CAI, Yi; *et al.* Hyperglycaemia-induced miR-301a promotes cell proliferation by repressing p21 and Smad4 in prostate cancer. **Cancer Letters**, v. 418, p. 211–220, 2018.

LI, Xue-bing; GU, Jun-dong; ZHOU, Qing-hua. Review of aerobic glycolysis and its key enzymes – new targets for lung cancer therapy. **Thoracic Cancer**, v. 6, n. 1, p. 17–24, 2015.

LIANG, Chun-Chi; PARK, Ann Y.; GUAN, Jun-Lin. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. **Nature Protocols**, v. 2, n. 2, p. 329–333, 2007.

LIBERTI, Maria V.; LOCASALE, Jason W. The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? **Trends in biochemical sciences**, v. 41, n. 3, p. 211–218, 2016.

LIMA, E. M.; RISSINO, J. D.; HARADA, M. L.; *et al.* Conventional cytogenetic characterization of a new cell line, ACP01, established from a primary human gastric tumor. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, n. 12, p. 1831–1838, 2004.

LIU, Wei; LE, Anne; HANCOCK, Chad; *et al.* Reprogramming of proline and glutamine metabolism contributes to the proliferative and metabolic responses regulated by oncogenic transcription factor c-MYC. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 23, p. 8983–8988, 2012.

LIU, Yewei; YIN, Ting; FENG, Yuanbo; *et al.* Mammalian models of chemically induced primary malignancies exploitable for imaging-based preclinical theragnostic research. **Quantitative Imaging in Medicine and Surgery**, v. 5, n. 5, p. 708–729, 2015.

LOWMAN, Xazmin H.; MCDONNELL, Maureen A.; KOSLOSKE, Ashley; *et al.* The proapoptotic function of Noxa in human leukemia cells is regulated by the kinase Cdk5 and by glucose. **Molecular Cell**, v. 40, n. 5, p. 823–833, 2010.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; *et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265–275, 1951.

LUENGO, Alba; GUI, Dan Y.; VANDER HEIDEN, Matthew G. Targeting Metabolism for Cancer Therapy. **Cell chemical biology**, v. 24, n. 9, p. 1161–1180, 2017.

LUKEY, Michael J.; KATT, William P.; CERIONE, Richard A. Targeting amino acid metabolism for cancer therapy. **Drug discovery today**, v. 22, n. 5, p. 796–804, 2017.

LUNT, Sophia Y.; VANDER HEIDEN, Matthew G. Aerobic Glycolysis: Meeting the Metabolic Requirements of Cell Proliferation. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 27, n. 1, p. 441–464, 2011.

- LUO, Jiao; XIANG, Yukai; XU, Xiangxiang; *et al.* High Glucose-Induced ROS Production Stimulates Proliferation of Pancreatic Cancer via Inactivating the JNK Pathway. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2018, p. 6917206, 2018.
- LUQUE, Raúl M.; LÓPEZ-SÁNCHEZ, Laura M.; VILLA-OSABA, Alicia; *et al.* Breast cancer is associated to impaired glucose/insulin homeostasis in premenopausal obese/overweight patients. **Oncotarget**, v. 8, n. 46, p. 81462–81474, 2017.
- MA, Junli; SHEN, Hong; KAPESA, Linda; *et al.* Lauren classification and individualized chemotherapy in gastric cancer (Review). **Oncology Letters**, v. 11, n. 5, p. 2959–2964, 2016.
- MA, Liwei; WEI, Jianwei; WAN, Junhu; *et al.* Low glucose and metformin-induced apoptosis of human ovarian cancer cells is connected to ASK1 via mitochondrial and endoplasmic reticulum stress-associated pathways. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 38, n. 1, p. 77, 2019.
- MA, Yi-Shing; YANG, I-Ping; TSAI, Hsiang-Lin; *et al.* High Glucose Modulates Antiproliferative Effect and Cytotoxicity of 5-Fluorouracil in Human Colon Cancer Cells. **DNA and Cell Biology**, v. 33, n. 2, p. 64–72, 2014.
- MACDONALD, J. S.; BENEDETTI, J.; SMALLEY, S.; *et al.* Chemoradiation of resected gastric cancer: A 10-year follow-up of the phase III trial INT0116 (SWOG 9008). **Journal of Clinical Oncology**, v. 27, n. 15\_suppl, p. 4515–4515, 2009.
- MACDONALD, J. S.; SMALLEY, S. R.; BENEDETTI, J.; *et al.* Chemoradiotherapy after surgery compared with surgery alone for adenocarcinoma of the stomach or gastroesophageal junction. **The New England Journal of Medicine**, v. 345, n. 10, p. 725–730, 2001.
- MAEDA, Hiromichi; KOBAYASHI, Michiya; SAKAMOTO, Junichi. Evaluation and treatment of malignant ascites secondary to gastric cancer. **World Journal of Gastroenterology : WJG**, v. 21, n. 39, p. 10936–10947, 2015.
- MAJMUNDAR, Amar J.; WONG, Waihay J.; SIMON, M. Celeste. Hypoxia-Inducible Factors and the Response to Hypoxic Stress. **Molecular Cell**, v. 40, n. 2, p. 294–309, 2010.
- MANNAVA, Sudha; GRACHTCHOUK, Vladimir; WHEELER, Linda J.; *et al.* Direct role of nucleotide metabolism in C-MYC-dependent proliferation of melanoma cells. **Cell Cycle (Georgetown, Tex.)**, v. 7, n. 15, p. 2392–2400, 2008.
- MARIE, Suely Kazue Nagahashi; SHINJO, Sueli Mieko Oba. Metabolism and brain cancer. **Clinics**, v. 66, p. 33–43, 2011.
- MARTIN, Hans-Jörg; KORNMANN, Frank; FUHRMANN, Günter Fred. The inhibitory effects of flavonoids and antiestrogens on the Glut1 glucose transporter in human erythrocytes. **Chemico-Biological Interactions**, v. 146, n. 3, p. 225–235, 2003.
- MARTINEZ-OUTSCHOORN, Ubaldo E.; PEIRIS-PAGÉS, Maria; PESTELL, Richard G.; *et al.* Cancer metabolism: a therapeutic perspective. **Nature Reviews. Clinical Oncology**, v. 14, n. 1, p. 11–31, 2017.
- MATOBA, Satoaki; KANG, Ju-Gyeong; PATINO, Willmar D.; *et al.* p53 regulates mitochondrial respiration. **Science (New York, N.Y.)**, v. 312, n. 5780, p. 1650–1653, 2006.

- MCCOLL, Kenneth E. L. Cancer of the gastric cardia. **Best Practice & Research. Clinical Gastroenterology**, v. 20, n. 4, p. 687–696, 2006.
- MELLO, Stephano S.; ATTARDI, Laura D. Deciphering p53 signaling in tumor suppression. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 51, p. 65–72, 2018.
- MEMON, Muhammed Ashraf; BUTLER, Nick; MEMON, Breda. The issue of lymphadenectomy during laparoscopic gastrectomy for gastric carcinoma. **World Journal of Gastrointestinal Oncology**, v. 2, n. 2, p. 65–67, 2010.
- MESQUITA, Felipe Pantoja; PINTO, Laine Celestino; SOARES, Bruno Moreira; *et al.* Small benzothiazole molecule induces apoptosis and prevents metastasis through DNA interaction and c-MYC gene suppression in diffuse-type gastric adenocarcinoma cell line. **Chemico-Biological Interactions**, v. 294, p. 118–127, 2018.
- MESQUITA, Felipe Pantoja; PINTO, Laine Celestino; SOARES, Bruno Moreira; *et al.* Small benzothiazole molecule induces apoptosis and prevents metastasis through DNA interaction and c-MYC gene suppression in diffuse-type gastric adenocarcinoma cell line. **Chemico-Biological Interactions**, v. 294, p. 118–127, 2018.
- MICHELAKIS, E D; WEBSTER, L; MACKEY, J R. Dichloroacetate (DCA) as a potential metabolic-targeting therapy for cancer. **British Journal of Cancer**, v. 99, n. 7, p. 989–994, 2008.
- MOISAN, Fabrizio; NORERO, Enrique; SLAKO, Milenko; *et al.* Completely laparoscopic versus open gastrectomy for early and advanced gastric cancer: a matched cohort study. **Surgical Endoscopy**, v. 26, n. 3, p. 661–672, 2012.
- MONTENEGRO, Raquel C.; CLARK, Peter G.K.; HOWARTH, Alison; *et al.* BET inhibition as a new strategy for the treatment of gastric cancer. **Oncotarget**, v. 7, n. 28, 2016.
- MONZAVI-KARBASSI, Behjatolah; GENTRY, Rhonda; KAUR, Varinder; *et al.* Pre-diagnosis blood glucose and prognosis in women with breast cancer. **Cancer & Metabolism**, v. 4, 2016.
- MORRIS, Luc G. T.; CHAN, Timothy A. Therapeutic targeting of tumor suppressor genes. **Cancer**, v. 121, n. 9, p. 1357–1368, 2015.
- MURPHY, Michael P. Mitochondrial Dysfunction Indirectly Elevates ROS Production by the Endoplasmic Reticulum. **Cell Metabolism**, v. 18, n. 2, p. 145–146, 2013.
- MYTAR, Bożenna; STEC, Małgorzata; SZATANEK, Rafał; *et al.* Characterization of human gastric adenocarcinoma cell lines established from peritoneal ascites. **Oncology Letters**, v. 15, n. 4, p. 4849–4858, 2018.
- NISHIKAWA, Makiya; HASHIDA, Mitsuru; TAKAKURA, Yoshinobu. Catalase delivery for inhibiting ROS-mediated tissue injury and tumor metastasis. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 61, n. 4, p. 319–326, 2009.
- OLIVEIRA, Carla; PINHEIRO, Hugo; FIGUEIREDO, Joana; *et al.* E-cadherin alterations in hereditary disorders with emphasis on hereditary diffuse gastric cancer. **Progress in Molecular Biology and Translational Science**, v. 116, p. 337–359, 2013.

- OLIVEIRA, Paula A.; COLAÇO, Aura; CHAVES, Raquel; *et al.* Chemical carcinogenesis. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 79, n. 4, p. 593–616, 2007.
- ORDITURA, Michele; GALIZIA, Gennaro; SFORZA, Vincenzo; *et al.* Treatment of gastric cancer. **World Journal of Gastroenterology : WJG**, v. 20, n. 7, p. 1635–1649, 2014.
- OSTHUS, R. C.; SHIM, H.; KIM, S.; *et al.* Deregulation of glucose transporter 1 and glycolytic gene expression by c-Myc. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 29, p. 21797–21800, 2000.
- OTTO, Tobias; SICINSKI, Piotr. Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy. **Nature reviews. Cancer**, v. 17, n. 2, p. 93–115, 2017.
- PANIERI, E.; SANTORO, M. M. ROS homeostasis and metabolism: a dangerous liason in cancer cells. **Cell Death & Disease**, v. 7, n. 6, p. e2253, 2016.
- PARK, J. G.; YANG, H. K.; KIM, W. H.; *et al.* Establishment and characterization of human gastric carcinoma cell lines. **International Journal of Cancer**, v. 70, n. 4, p. 443–449, 1997.
- PARK, Jae-Gahb; FRUCHT, Harold; LAROCCA, Renato V; *et al.* Characteristics of Cell Lines Established from Human Gastric Carcinoma. p. 9, 1990.
- PELIZZARI, Giacomo; BASILE, Debora; ZAGO, Silvia; *et al.* Lactate Dehydrogenase (LDH) Response to First-Line Treatment Predicts Survival in Metastatic Breast Cancer: First Clues for A Cost-Effective and Dynamic Biomarker. **Cancers**, v. 11, n. 9, 2019.
- PHOOMAK, Chatchai; VAETEEWOOTTACHARN, Kulthida; SILSIRIVANIT, Atit; *et al.* High glucose levels boost the aggressiveness of highly metastatic cholangiocarcinoma cells via O-GlcNAcylation. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 43842, 2017.
- PINTO, Laine Celestino; DE FÁTIMA AQUINO MOREIRA-NUNES, Caroline; SOARES, Bruno Moreira; *et al.* Mebendazole, an antiparasitic drug, inhibits drug transporters expression in preclinical model of gastric peritoneal carcinomatosis. **Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA**, v. 43, p. 87–91, 2017.
- PINTO, Laine Celestino; MESQUITA, Felipe Pantoja; SOARES, Bruno Moreira; *et al.* Mebendazole induces apoptosis via C-MYC inactivation in malignant ascites cell line (AGP01). **Toxicology in Vitro**, v. 60, p. 305–312, 2019.
- PINTO, Laine Celestino; SOARES, Bruno Moreira; PINHEIRO, João de Jesus Viana; *et al.* The anthelmintic drug mebendazole inhibits growth, migration and invasion in gastric cancer cell model. **Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA**, v. 29, n. 8, p. 2038–2044, 2015.
- PLUMB, Jane A. Cell sensitivity assays: clonogenic assay. **Methods in Molecular Medicine**, v. 88, p. 159–164, 2004.
- POPE, Evans D.; KIMBROUGH, Erinmarie O.; VEMIREDDY, Lalitha Padmanabha; *et al.* Aberrant lipid metabolism as a therapeutic target in liver cancer. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, v. 23, n. 6, p. 473–483, 2019.

PUSCH, O.; SOUCEK, T.; HENGSTSCHLÄGER-OTTNAD, E.; *et al.* Cellular targets for activation by c-Myc include the DNA metabolism enzyme thymidine kinase. **DNA and cell biology**, v. 16, n. 6, p. 737–747, 1997.

RAMOS, Marcus Fernando Kodama Pertille; RIBEIRO JÚNIOR, Ulysses; VISCONDI, Juliana Kodaira Yukari; *et al.* Risk factors associated with the development of gastric cancer — case-control study. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 64, n. 7, p. 611–619, 2018.

REBUCCI, Magali; MICHIELS, Carine. Molecular aspects of cancer cell resistance to chemotherapy. **Biochemical Pharmacology**, v. 85, n. 9, p. 1219–1226, 2013.

REN, Zongli; CHEN, Juanjuan; KHALIL, Raouf A. Zymography as a Research Tool in the Study of Matrix Metalloproteinase Inhibitors. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 1626, p. 79–102, 2017.

ROBEY, R. B.; HAY, N. Mitochondrial hexokinases, novel mediators of the antiapoptotic effects of growth factors and Akt. **Oncogene**, v. 25, n. 34, p. 4683–4696, 2006.

ROY, Debmalya; SHENG, Gao Ying; HERVE, Semukunzi; *et al.* Interplay between cancer cell cycle and metabolism: Challenges, targets and therapeutic opportunities. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 89, p. 288–296, 2017.

SAKURAMOTO, Shinichi; SASAKO, Mitsuru; YAMAGUCHI, Toshiharu; *et al.* Adjuvant chemotherapy for gastric cancer with S-1, an oral fluoropyrimidine. **The New England Journal of Medicine**, v. 357, n. 18, p. 1810–1820, 2007.

SCHAEFFER, Daneen; SOMARELLI, Jason A.; HANNA, Gabi; *et al.* Cellular Migration and Invasion Uncoupled: Increased Migration Is Not an Inexorable Consequence of Epithelial-to-Mesenchymal Transition. **Molecular and Cellular Biology**, v. 34, n. 18, p. 3486–3499, 2014.

SCHMITTGEN, Thomas D.; LIVAK, Kenneth J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C T method. **Nature Protocols**, v. 3, n. 6, p. 1101–1108, 2008.

SCHWARTZENBERG-BAR-YOSEPH, Fabiana; ARMONI, Michal; KARNIELI, Eddy. The tumor suppressor p53 down-regulates glucose transporters GLUT1 and GLUT4 gene expression. **Cancer Research**, v. 64, n. 7, p. 2627–2633, 2004.

SCHWARZ, Roderich E.; ZAGALA-NEVAREZ, Kathryn. Recurrence patterns after radical gastrectomy for gastric cancer: prognostic factors and implications for postoperative adjuvant therapy. **Annals of Surgical Oncology**, v. 9, n. 4, p. 394–400, 2002.

SEMENZA, G. L.; ROTH, P. H.; FANG, H. M.; *et al.* Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 38, p. 23757–23763, 1994.

SEMENZA, Gregg L. Targeting HIF-1 for cancer therapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 10, p. 721–732, 2003.

SHARMA, Sreenath V.; HABER, Daniel A.; SETTLEMAN, Jeff. Cell line-based platforms to evaluate the therapeutic efficacy of candidate anticancer agents. **Nature Reviews. Cancer**, v. 10, n. 4, p. 241–253, 2010.

SHIM, H.; DOLDE, C.; LEWIS, B. C.; *et al.* c-Myc transactivation of LDH-A: implications for tumor metabolism and growth. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 13, p. 6658–6663, 1997.

SINGH, Davinder; ARORA, Rohit; KAUR, Pardeep; *et al.* Overexpression of hypoxia-inducible factor and metabolic pathways: possible targets of cancer. **Cell & Bioscience**, v. 7, n. 1, p. 62, 2017.

SITARZ, Robert; SKIERUCHA, Małgorzata; MIELKO, Jerzy; *et al.* Gastric cancer: epidemiology, prevention, classification, and treatment. **Cancer Management and Research**, v. 10, p. 239–248, 2018.

SPITZ, Douglas R.; SIM, Julia E.; RIDNOUR, Lisa A.; *et al.* Glucose Deprivation-Induced Oxidative Stress in Human Tumor Cells: A Fundamental Defect in Metabolism? **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 899, n. 1, p. 349–362, 2006.

STROBER, Warren. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. **Current protocols in immunology**, v. 111, p. A3.B.1-A3.B.3, 2015.

SU, Chen-Hsuan; KUO, Chao-Lin; LU, Kung-Wen; *et al.* Fisetin-induced apoptosis of human oral cancer SCC-4 cells through reactive oxygen species production, endoplasmic reticulum stress, caspase-, and mitochondria-dependent signaling pathways. **Environmental Toxicology**, v. 32, n. 6, p. 1725–1741, 2017.

SUN, Ramon C.; FADIA, Mitali; DAHLSTROM, Jane E.; *et al.* Reversal of the glycolytic phenotype by dichloroacetate inhibits metastatic breast cancer cell growth in vitro and in vivo. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 120, n. 1, p. 253–260, 2010.

SUN, Shichao; SUN, Yao; RONG, Xiaoping; *et al.* High glucose promotes breast cancer proliferation and metastasis by impairing angiotensinogen expression. **Bioscience Reports**, v. 39, n. 6, 2019.

TATEISHI, K.; IAFRATE, A. J.; HO, Q.; *et al.* Myc-Driven Glycolysis Is a Therapeutic Target in Glioblastoma. **Clinical Cancer Research**, v. 22, n. 17, p. 4452–4465, 2016.

THORÉN, Matilda Munksgaard; VAAPIL, Marica; STAAF, Johan; *et al.* Myc-induced glutaminolysis bypasses HIF-driven glycolysis in hypoxic small cell lung carcinoma cells. **Oncotarget**, v. 8, n. 30, p. 48983–48995, 2017.

TOMASETTI, Cristian; LI, Lu; VOGELSTEIN, Bert. Stem cell divisions, somatic mutations, cancer etiology, and cancer prevention. **Science (New York, N.Y.)**, v. 355, n. 6331, p. 1330–1334, 2017.

VARGAS, Fabiano; D. O. DE ALMEIDA, Patrícia; ARANHA, Elenn; *et al.* Biological Activities and Cytotoxicity of Diterpenes from *Copaifera* spp. Oleoresins. **Molecules**, v. 20, n. 4, p. 6194–6210, 2015.

- VASCONCELOS, Zanair Soares; RALPH, Ana Carolina Lima; CALCAGNO, Danielle Queiroz; *et al.* Anticancer potential of benzothiazolic derivative (E)-2-((2-(benzo[d]thiazol-2-yl)hydrazono)methyl)-4-nitrophenol against melanoma cells. **Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA**, v. 50, p. 225–235, 2018.
- VOGELSTEIN, Bert; PAPADOPOULOS, Nickolas; VELCULESCU, Victor E.; *et al.* Cancer genome landscapes. **Science (New York, N.Y.)**, v. 339, n. 6127, p. 1546–1558, 2013.
- VOLLMERS, H. Peter; STULLE, Konrad; DÄMMRICH, Jobst; *et al.* Characterization of four new gastric cancer cell lines. **Virchows Archiv B Cell Pathology Including Molecular Pathology**, v. 63, n. 1, p. 335–343, 1993.
- WANG, Duowei; RAI, Bikash; QI, Feng; *et al.* Influence of the Twist gene on the invasion and metastasis of colon cancer. **Oncology Reports**, 2017.
- WANG, Li-Hui; WU, Chun-Fu; RAJASEKARAN, Nirmal; *et al.* Loss of Tumor Suppressor Gene Function in Human Cancer: An Overview. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 51, n. 6, p. 2647–2693, 2018.
- WANG, Yaming; ZHU, Wei; LEVY, David E. Nuclear and cytoplasmic mRNA quantification by SYBR green based real-time RT-PCR. **Methods**, v. 39, n. 4, p. 356–362, 2006.
- WEISS, Leon Paul. Binding of Acid and Basic Dye at Varied pH by Blood and Bone Marrow Cells of Man With Observations of Blood and Bone Marrow Stained with Serra's Method for Arginine. **Blood**, v. 8, n. 3, p. 249–261, 1953.
- WILDING, Jennifer L.; BODMER, Walter F. Cancer Cell Lines for Drug Discovery and Development. **Cancer Research**, v. 74, n. 9, p. 2377–2384, 2014.
- WIRTZ, Denis; KONSTANTOPOULOS, Konstantinos; SEARSON, Peter C. The physics of cancer: the role of physical interactions and mechanical forces in metastasis. **Nature Reviews Cancer**, v. 11, n. 7, p. 512–522, 2011.
- WISE, David R.; DEBERARDINIS, Ralph J.; MANCUSO, Anthony; *et al.* Myc regulates a transcriptional program that stimulates mitochondrial glutaminolysis and leads to glutamine addiction. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 48, p. 18782–18787, 2008.
- WLODKOWIC, Donald; TELFORD, William; SKOMMER, Joanna; *et al.* Apoptosis and Beyond: Cytometry in Studies of Programmed Cell Death. **Methods in Cell Biology**, v. 103, p. 55–98, 2011.
- WU, Jiayan; CHEN, Jiayi; XI, Yang; *et al.* High glucose induces epithelial-mesenchymal transition and results in the migration and invasion of colorectal cancer cells. **Experimental and Therapeutic Medicine**, 2018.
- XINTAROPOULOU, Chrysi; WARD, Carol; WISE, Alan; *et al.* A comparative analysis of inhibitors of the glycolysis pathway in breast and ovarian cancer cell line models. **Oncotarget**, v. 6, n. 28, p. 25677–25695, 2015.



YANG, Haotian; VILLANI, Rehan M; WANG, Haolu; *et al.* The role of cellular reactive oxygen species in cancer chemotherapy. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research : CR**, v. 37, 2018..

YIN, Zhongping; BAI, Ling; LI, Wei; *et al.* Targeting T cell metabolism in the tumor microenvironment: an anti-cancer therapeutic strategy. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 38, n. 1, p. 403, 2019.

YOKOZAKI, Hiroshi. Molecular characteristics of eight gastric cancer cell lines established in Japan. **Pathology International**, v. 50, n. 10, p. 767–777, 2000.

YONEMURA, Yutaka; KAWAMURA, Taiichi; BANDO, Etsuro; *et al.* The natural history of free cancer cells in the peritoneal cavity. **Recent Results in Cancer Research. Fortschritte Der Krebsforschung. Progres Dans Les Recherches Sur Le Cancer**, v. 169, p. 11–23, 2007.

YUN, Jihye; RAGO, Carlo; CHEONG, Ian; *et al.* Glucose Deprivation Contributes to the Development of KRAS Pathway Mutations in Tumor Cells. **Science (New York, N.Y.)**, v. 325, n. 5947, p. 1555, 2009.

ZHANG, Cen; LIU, Juan; WU, Rui; *et al.* Tumor suppressor p53 negatively regulates glycolysis stimulated by hypoxia through its target RRAD. **Oncotarget**, v. 5, n. 14, p. 5535–5546, 2014.

ZHANG, Wenjia; HU, Xianglong; SHEN, Qi; *et al.* Mitochondria-specific drug release and reactive oxygen species burst induced by polyprodrug nanoreactors can enhance chemotherapy. **Nature Communications**, v. 10, 2019.

ZHANG, Y.; CHEN, Q. Relationship between matrix metalloproteinases and the occurrence and development of ovarian cancer. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 50, n. 6, 2017.

ZHAO, Wei; CHEN, Rui; ZHAO, Mei; *et al.* High glucose promotes gastric cancer chemoresistance in vivo and in vitro. **Molecular Medicine Reports**, v. 12, n. 1, p. 843–850, 2015.

ZHAO, Y.; BUTLER, E. B.; TAN, M. Targeting cellular metabolism to improve cancer therapeutics. **Cell Death & Disease**, v. 4, p. e532, 2013.

ZHU, Bo; WU, Xiaomei; WU, Bo; *et al.* The relationship between diabetes and colorectal cancer prognosis: A meta-analysis based on the cohort studies. **PLoS ONE**, v. 12, n. 4, 2017.

ZHU, Chunpeng; HU, Wei; WU, Hao; *et al.* No evident dose-response relationship between cellular ROS level and its cytotoxicity – a paradoxical issue in ROS-based cancer therapy. **Scientific Reports**, v. 4, n. 1, p. 5029, 2015.

ZHUANG, Yongxian; CHAN, Daniel K.; HAUGRUD, Allison B.; *et al.* Mechanisms by Which Low Glucose Enhances the Cytotoxicity of Metformin to Cancer Cells Both In Vitro and In Vivo. **PLOS ONE**, v. 9, n. 9, p. e108444, 2014.

