



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

ARLENE ALMEIDA LIMA

MIF COMO POSSÍVEL ALVO TERAPÊUTICO DO CÂNCER GÁSTRICO

FORTALEZA
2025

ARLENE ALMEIDA LIMA

MIF COMO POSSÍVEL ALVO TERAPÊUTICO DO CÂNCER GÁSTRICO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Farmacologia. Área de concentração: Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Raquel Carvalho Montenegro.

Coorientador: Prof. Dr. Felipe Pantoja Mesquita.

FORTALEZA

2025

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

L696u Lima, Arlene Almeida.
MIF como possível alvo terapêutico do câncer gástrico / Arlene Almeida Lima. – 2025.
67 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2025.

Orientação: Prof. Dr. Raquel Carvalho Montenegro.

Coorientação: Prof. Dr. Felipe Pantoja Mesquita.

1. Câncer Gástrico. 2. MIF. 3. Terapia Alvo. 4. Análise Proteômica. I. Título.

CDD 615.1

ARLENE ALMEIDA LIMA

MIF COMO POSSÍVEL ALVO TERAPÊUTICO DO CÂNCER GÁSTRICO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Farmacologia.
Área de concentração: Farmacologia.

Aprovada em: 17/03/2025.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Raquel Carvalho Montenegro (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dr. Felipe Pantoja Mesquita (Coorientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^a. Dr^a Nylane Maria Nunes de Alencar
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dr^a. Manoela de Oliveira Rebouças
Instituto do Câncer do Ceará (ICC)

Ao meu avô Antônio que enfrentou duas vezes
essa árdua batalha que tanto nos vulnerabiliza.

AGRADECIMENTOS

À princípio, agradeço minha família de sangue: à minha avó Cleonice (*in memoriam*) e ao meu avô Antônio. Aos meus pais, Claudia e Claudio, e às minhas irmãs Aline e Alane, agradeço o apoio e o suporte que me proporcionam a cada capítulo de minha vida.

Às minhas irmãs de quatro patas, Lady, Gigi e Meg. Alegam minha vida e me proporcionam motivos para sempre continuar. Ao meu cunhado Lucas por todos esses anos que trocamos experiências e fatos sobre ciência.

À minha família por escolha: Ana Carolina, Alyne, Guilherme, Gabrielly, Lara e Thiago. Vocês são minha família que escolho todos os dias. Obrigada por serem minha força e porto seguro nos momentos difíceis.

À minha psicóloga Lilian Marinho, serei eternamente grata pelo trabalho em conjunto que tivemos durante anos de minha vida.

Aos meus amigos Analina Barros, Ana Cristina, Aylana Barros, Beatriz Sousa, Gabriel Reis, Larissa Viana, Manoel Azevedo, Marina Stella, Sofia Garcia e Vitória Ferreira. Vocês fazem diferença em minha vida.

À minha família da biotec e querido gabinete: um agradecimento especial a cada integrante desse grupo que durante anos foram responsáveis por cafés e “papos cabeças” sobre futuro, decisões e aleatoriedades da vida.

À professora Raquel Montenegro, pelo voto de confiança em aceitar me orientar, além dos conselhos e aprendizados que recebi nesses dois anos de trabalho.

A todos os integrantes do Laboratório de Farmacogenética da UFC, que de forma direta ou indiretamente, contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho. Em especial, agradeço ao Emerson Lucena pelos ensinamentos que me fizeram crescer e desenvolver meu olhar científico.

Aos amigos que ultrapassaram a barreira do trabalho e conquistaram um espaço em minha vida pessoal, meus companheiros de almoço e risadinhas: Caterine, Isadora, Talia e Vinícius. Trabalhar com vocês é incrível.

À UFC, CAPES e CNPq, agradeço o apoio estrutural e financeiro para a realização de projetos de pesquisa de excelência. Um agradecimento especial à Biblioteca Estadual do Ceará, as bibliotecas da UFC (em especial à do curso de Física) e aos espaços de co-working em shoppings que foram meu refúgio e me proporcionaram inúmeras horas de escrita.

“Part of growing up and moving to new chapters of your life is about catch and release. What I mean by that is, knowing what things to keep and what things to let it go.” (SWIFT, 2022).

RESUMO

O câncer gástrico (CG) é a quinta neoplasia mais incidente e letal no mundo, sendo caracterizado por sua heterogeneidade e natureza multifatorial. O diagnóstico, na maioria dos casos, ocorre em estágios avançados, o que dificulta o tratamento da malignidade. A abordagem terapêutica é definida a partir do estadiamento pré-operatório do tumor, sendo a quimioterapia com ressecção cirúrgica a principal escolha de tratamento, porém restritiva para casos que o tumor está localizado. Apesar de amplamente utilizada, a quimioterapia convencional enfrenta limitações significativas, como efeitos adversos graves e a ocorrência de quimiorresistência, que restringe sua eficácia. Nesse contexto, a terapia-alvo vem ganhando destaque nos últimos anos, com o objetivo de superar a quimiorresistência e minimizar os efeitos colaterais, oferecendo tratamentos mais específicos e eficazes. Uma estratégia promissora para a identificação de novos biomarcadores e alvos terapêuticos é o *target fishing*, que consiste em explorar novos alvos a partir de drogas previamente desenvolvidas, permitindo a descoberta de alvos ainda inexplorados, mas com potencial clínico relevante. Dessa forma, o presente trabalho teve como principal objetivo a identificação de um novo alvo molecular como alternativa terapêutica para tratamento de CG. Para isso, um painel com 28 inibidores moleculares foi testado em duas linhagens celulares gástricas de CG, sendo selecionado o inibidor molecular de melhor ação citotóxica em ambos os modelos. O inibidor selecionado foi o BTZO-1, um inibidor seletivo para o fator inibitório de migração de macrófagos (MIF). Em seguida, foram avaliados a expressão gênica diferencial de *MIF* a partir do *dataset* transcriptômico do TCGA para CG, a expressão gênica de *MIF* nas linhagens gástricas tumorais, a inibição do MIF após o tratamento com BTZO-1 e seus efeitos na integridade de membrana, migração celular, alterações no ciclo celular, ativação das caspases 3/7 e na expressão proteica. As análises de bioinformática do *MIF* no CG mostraram que *MIF* apresenta expressão aumentada no CG, especialmente no subtipo intestinal. Além disso, o aumento da expressão de *MIF* foi correlacionada com a sobrevida dos pacientes, o tamanho do tumor, a ausência de metástase em linfonodos regionais e a presença de metástase à distância. A análise de expressão gênica revelou que o gene *MIF* tem sua expressão aumentada nas 3 linhagens gástricas neoplásicas avaliadas (AGP-01, ACP-02 e ACP-03). A linhagem AGP-01, derivada de uma metástase do subtipo intestinal, apresentou a maior expressão de *MIF* e foi a mais sensível ao inibidor BTZO-1 ($CI_{50} = 1,1 \mu M$). Já a linhagem ACP-03, originária de um tumor primário do mesmo subtipo, exibiu a menor expressão de *MIF* e uma resistência três vezes maior ao inibidor ($CI_{50} = 3,1 \mu M$). A inibição de MIF na linhagem AGP-01 resultou em altos níveis de comprometimento da

integridade de membrana, redução da migração celular a partir de 6h de tratamento, acúmulo de células na fase G2/M no ciclo celular e um impacto significativo em processos biológicos essenciais, conforme demonstrado na análise proteômica. Os principais processos biológicos incluíram a regulação metabólica mRNA, *splicing* do RNA e sua regulação, e o dobramento de proteínas. A avaliação da função molecular das proteínas diferencialmente expressas revelou que muitas delas atuam como constituintes estruturais da cromatina e chaperonas envolvidas no dobramento de proteínas. Além disso, o inibidor BTZO-1 demonstrou-se um candidato promissor como estratégia terapêutica para a neoplasia. Os achados desse trabalho indicam que o MIF é um potencial alvo terapêutico para o CG, dada a sua importância clínica e seu papel na progressão tumoral. A inibição afetou diferentes processos biológicos essenciais para o desenvolvimento do tumor.

Palavras-chave: Câncer Gástrico; MIF; Terapia Alvo; Análise Proteômica.

ABSTRACT

MIF AS A POSSIBLE THERAPEUTIC TARGET IN GASTRIC CANCER

Gastric cancer (GC) is the fifth most common and lethal neoplasm worldwide, characterized by its heterogeneity and multifactorial nature. In most cases, diagnosis occurs at advanced stages, making malignancy treatment challenging. The therapeutic approach is defined based on the tumor's preoperative staging, with chemotherapy combined with surgical resection being the primary treatment choice, though it is restrictive to cases where the tumor is localized. Despite its widespread use, conventional chemotherapy faces significant limitations, such as severe adverse effects and the occurrence of chemoresistance, which restricts its efficacy. In this context, targeted therapy has gained prominence in recent years, aiming to overcome chemoresistance and minimize side effects, offering more specific and effective treatments. A promising strategy for identifying new biomarkers and therapeutic targets is target fishing, which involves exploring new targets from previously developed drugs, enabling the discovery of unexplored targets with relevant clinical potential. Thus, the main objective of this study was to identify a new molecular target as a therapeutic alternative for GC treatment. To achieve this, a panel of 28 molecular inhibitors was tested in two GC cell lines, selecting the molecular inhibitor with the best cytotoxic action in both models. The selected inhibitor was BTZO-1, a selective inhibitor of macrophage migration inhibitory factor (MIF). Subsequently, we evaluated MIF's differential gene expression using the TCGA transcriptomic dataset for GC, MIF gene expression in gastric tumor cell lines, MIF inhibition after treatment with BTZO-1, and its effects on membrane integrity, cell migration, cell cycle alterations, caspase-3/7 activation, and protein expression. Bioinformatics analyses of MIF in GC showed that MIF is overexpressed in GC, particularly in the intestinal subtype. Furthermore, increased MIF expression correlated with patient survival, tumor size, absence of metastasis in regional lymph nodes, and the presence of distant metastases. Gene expression analysis revealed that the MIF gene is upregulated in all three evaluated gastric neoplastic cell lines (AGP-01, ACP-02, and ACP-03). The AGP-01 cell line, derived from a metastasis of the intestinal subtype, showed the highest MIF expression and was the most sensitive to the BTZO-1 inhibitor ($IC_{50} = 1.1 \mu M$). In contrast, the ACP-03 cell line, originating from a primary tumor of the same subtype, exhibited the lowest MIF expression and was three times more resistant to the inhibitor ($IC_{50} = 3.1 \mu M$). MIF inhibition in the AGP-01 cell line resulted in high levels of membrane integrity impairment, reduced cell migration after 6 hours of treatment, accumulation of cells in the

G2/M phase of the cell cycle, and a significant impact on essential biological processes, as demonstrated by proteomic analysis. The main biological processes affected included mRNA metabolic regulation, RNA splicing and its regulation, and protein folding. The functional evaluation of differentially expressed proteins revealed that many act as structural chromatin constituents and chaperones involved in protein folding. Additionally, the BTZO-1 inhibitor proved to be a promising candidate as a therapeutic strategy for this neoplasm, further reinforcing the need for additional studies to validate its efficacy. The findings of this study indicate that MIF is a potential therapeutic target for GC, given its clinical significance and role in tumor progression. Its inhibition affected different biological processes essential for tumor development.

Keywords: Gastric Cancer; MIF; Target Therapy; Proteomic Analysis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 — Estágios da Carcinogênese	17
Figura 2 — Características do Câncer	18
Figura 3 — Principais classificações para o Câncer Gástrico.	22
Figura 4 — Análise da inibição do crescimento celular das linhagens celulares ACP-02 (subtipo difuso) e ACP-03 (subtipo intestinal) após o tratamento com 28 diferentes inibidores químicos.	39
Figura 5 — Análise de sobrevida entre alta e baixa expressão de MIF nos dados do TCGA. .	42
Figura 6 — Expressão de mRNA do gene MIF antes e após o tratamento com o inibidor BTZO-1 nas linhagens gástricas utilizadas no estudo.	44
Figura 7 — Análise do efeito do inibidor BTZO-1 na integridade da membrana das células AGP-01.	46
Figura 8 — Análise do efeito do inibidor BTZO-1 na integridade da membrana das células ACP-03.	47
Figura 9 — Inibição da citocina MIF influencia o perfil migratório das linhagens neoplásicas gástricas AGP-01 e ACP-03.	49
Figura 10 — Análise do ciclo celular das células neoplásicas AGP-01 e ACP-03 após o tratamento com o inibidor BTZO-1 e o fármaco 5-FU.	50
Figura 11 — Ativação de Caspase-3/7 em células AGP-01 e ACP-03 após tratamento com BTZO-1.	51
Figura 12 — Perfil proteômico de células AGP-01 tratadas com BTZO-1.	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 — Comparativo entre os sistemas de classificação de Lauren (1965) e da OMS (2010) para tumores gástricos.	23
Tabela 2 — Classificação TNM para câncer gástrico do tipo carcinoma.....	25
Tabela 3 — Características funcionais das proteínas alvo dos inibidores químicos disponíveis no painel de inibidores do Programa de Doação de Sondas Químicas do Consórcio de Genômica Estrutural.	31
Tabela 4 — Características das linhagens celulares utilizadas no estudo.	32
Tabela 5 — Sequências de oligonucleotídeos usados na RT-qPCR.	35
Tabela 6 — Comparação da expressão diferencial do gene MIF entre adenocarcinoma gástrico e diferentes subtipos de câncer em relação ao grupo de amostras pareadas de mucosa gástrica não-neoplásica.	40
Tabela 7 — Comparação da expressão diferencial do gene MIF entre o grupo de amostras pareadas de mucosa gástrica não-neoplásica e as subcategorias da classificação TNM para tumores gástricos.	41
Tabela 8 — Determinação da CI_{50} do inibidor BTZO-1 e do fármaco 5-FU nas linhagens gástricas AGP-01, ACP-02 e ACP-03.	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-FU	5-Fluorouracil
ACP-02	Linhagem gástrica originária de adenocarcinoma gástrico primário do subtipo difuso
ACP-03	Linhagem gástrica originária de adenocarcinoma gástrico primário do subtipo intestinal
ACVR1B	Receptor do tipo 1B da ativina
AGP-01	Linhagem gástrica originária de fluido ascético de adenocarcinoma gástrico
AICR	Instituto Americano de Pesquisa do Câncer
AJCC	Comitê Conjunto Americano sobre Câncer
ALOX5AP	Proteína ativadora de 5-lipoxigenase
ARID1A	Domínio de Interação Rico em AT Contendo a Subunidade 1A
Bcl-2	Proteína linfoma de células B 2
Bcl-xL	Proteína linfoma de células B extra grande
CAS	Sociedade Americana do Câncer
CCR1	Receptor de quimiocina do motivo CC1
CD44	Antígeno de diferenciação CD44
CD74	Cadeia invariante associado à classe II do Complexo Principal de Histocompatibilidade
CDC	Centro de Controle e Prevenção de Doenças
CDH1	E-caderina
CDK	Proteína quinase dependente de ciclina
CG	Câncer Gástrico
CI ₅₀	Concentração inibitória média
CKI	Inibidor de quinase dependente de ciclina
CLDN18	Proteína Claudina-18
CN	Controle Negativo
CNR1	Receptor de canabinoide 1
CO ₂	Dióxido de carbono
CREBBP	Proteína de ligação ao CREB
CTLA-4	Antígeno-4 de linfócitos T citotóxico

CTNNA1	Catenina alfa-1
CXCR2	Receptor 2 de quimiocina do motivo C-X-C
CXCR4	Receptor 4 de quimiocina do motivo C-X-C
CXCR7	Receptor 7 de quimiocina do motivo C-X-C
DGE	Expressão gênica diferencial
DMEM	Meio Eagle - Modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DRD4	Receptor de dopamina D4
DTT	Ditiotreitol
EAS	Eventos adversos graves
EBV	Vírus Epstein-Barr
EBVaGC	Câncer gástrico associado ao vírus Epstein-Barr
EDNRA	Receptor de endotelina-1
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidérmico
EMR	Ressecção endoscópica da mucosa
ENPP2	Pirofosfatase/Fosfodiesterase de ectonucleotídeo 2
EP300	Proteína de ligação à E1A P300
EPHX2	Epóxido hidrolase 2
ERBB2/ HER2	Receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano
ESD	Dissecção endoscópica da submucosa
FASN	Enzima sintase de ácidos graxos
FDA	Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos
FDR	Taxa de Descoberta Falsa
FGFR2	Receptor do fator de crescimento de fibroblastos
GNRHR	Receptor do hormônio liberador de gonadotropina
GO	Ontologia genética
GPR52	Receptor 52 acoplado à proteína G
HDGC	Câncer gástrico difuso hereditário
HIF-1	Fator induzível por hipóxia 1
HSP	Chaperonas de choque térmico
IAA	Iodoacetamida

IARC	Agência Internacional de Pesquisa em Câncer
ICI	Inibidores do ponto de verificação imunológico
IDH	Índice de Desenvolvimento Humano
IKBKE	Inibidor do fator nuclear kappa B quinase subunidade épsilon
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
ITGAL	Subunidade alfa L da integrina
JAB1	Subunidade 5 do sinalossomo COP9 (CSN5)
JAK2	Janus quinase 2
KRAS	Proteína <i>kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
LRKK2	Quinase 2 com repetições ricas em leucina
MAPK14	Quinase 14 de proteína ativada por mitógenos
MDSC	Células supressoras derivadas de mieloides
MET	Receptor do fator de crescimento hepático
MGAT2	Manosil (Alfa-1,3-) Glicoproteína Beta-1,2-N-Acetilglucosaminiltransferase 2
MIF	Fator inibitório da migração de macrófagos
MLH1	Proteína MutL homólogo 1
MMP	Metaloproteinase de matriz
MNP-01	Linhagem gástrica originária de mucosa estomacal não neoplásica
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
NF-κB	Fator nuclear kappa B
NIH	Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos
NR3C1	Receptor nuclear subfamília 3 grupo C membro 1
NUDT1	Hidrolase nudix 1
OMS	Organização Mundial da Saúde
PARP1	Poli ADP-ribose polimerase
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PD-1	Proteína de morte celular programada 1
PD-L1/2	Ligante da proteína de morte celular programada ½
PI	Iodeto de propídio
PIK3CA	Fosfatidilinositol-3-quinase subunidade catalítica alfa
PSEN1	Presenilina 1

PSM	<i>Peptide Spectrum Matching</i>
RHOA	Proteína RhoA
RNA	Ácido ribonucleico
RPLP0	Proteína ribossômica P0
RT-qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real
SBF	Soro Bovino Fetal
SCF	Complexo
SGC	Consórcio de Genômica Estrutural
SOS1	Fator de troca de nucleotídeos em proteínas Ras
SPE	Extração de fase sólida
SRC3	Receptor de esteroides 3
SYK	Quinase de tirosina do baço
TAM	Macrófagos associados a tumores
TBK1	Quinase 1 ligada ao TANK
TCGA	Atlas do Genoma do Câncer
TME	Microambiente tumoral
TMM	Método <i>trimmed mean of M-values</i>
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TNBC	Câncer de mama triplo negativo
TNM	Sistema de classificação tumor, nódulo e metástase
TP53	Proteína supressora de tumor p53
TRPM8	Canal de cátions da subfamília M do receptor transiente membro 8
UICC	União Internacional para o Controle do Câncer
UniProt	Recurso universal de proteínas
WCRF	Fundo Mundial de Pesquisa do Câncer
XIC	<i>Extracte Ion Chromatogram</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

- © Copyright
- ® Marca Registrada

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	CÂNCER	16
1.2	Epidemiologia e Etiologia do Câncer Gástrico	18
1.3	Classificação do Câncer Gástrico	21
1.4	Tratamento do Câncer Gástrico	26
1.4.1	<i>Estratégias cirúrgicas</i>	26
1.4.2	<i>Quimioterapia</i>	26
1.4.3	<i>Terapia alvo direcionada</i>	27
2	JUSTIFICATIVA	29
3	OBJETIVOS	30
3.1	Objetivo Geral	30
3.2	Objetivos Específicos	30
4	MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1	Painel de inibidores moleculares	31
4.2	Cultivo celular	32
4.3	Ensaio de Citotoxicidade pelo método de Alamar Blue	32
4.4	Análise de expressão gênica diferencial (DGE) e sobrevivência	33
4.5	Determinação da Concentração de Inibição (CI ₅₀) do inibidor BTZO-1	34
4.6	Análise de expressão gênica por RT-qPCR	34
4.7	Ensaio de Integridade da Membrana	35
4.8	Ensaio de Migração Celular	35
4.9	Análise de ciclo celular por citometria de fluxo	36
4.10	Ensaio de Ativação de Caspase-3/7	36
4.11	Preparação das amostras para análise proteômica	37
4.12	Extração, digestão, análise dos dados proteômicos e enriquecimento funcional de ontologia genética (GO)	37

4.13	Análise Estatística	38
5	RESULTADOS.....	39
5.1	Triagem do painel de inibidores químicos.....	39
5.2	Expressão Gênica Diferencial (DGE) do gene <i>MIF in silico</i>	40
5.3	Análise da sobrevida de pacientes com alta expressão do gene <i>MIF</i>	42
5.4	Determinação da CI_{50} do inibidor BTZO-1	43
5.5	Análise da expressão de mRNA do gene <i>MIF</i> nas linhagens celulares gástricas antes e após o tratamento com o inibidor BTZO-1	43
5.5	Avaliação da integridade da membrana celular	45
5.6	Ensaio de Migração Celular	48
5.7	Avaliação de alterações no ciclo celular	50
5.8	Avaliação da ativação das Caspases 3 e 7	51
5.9	Análise do perfil proteômico	52
6	DISCUSSÃO	54
7	CONCLUSÃO.....	59
	REFERÊNCIAS	60

1 INTRODUÇÃO

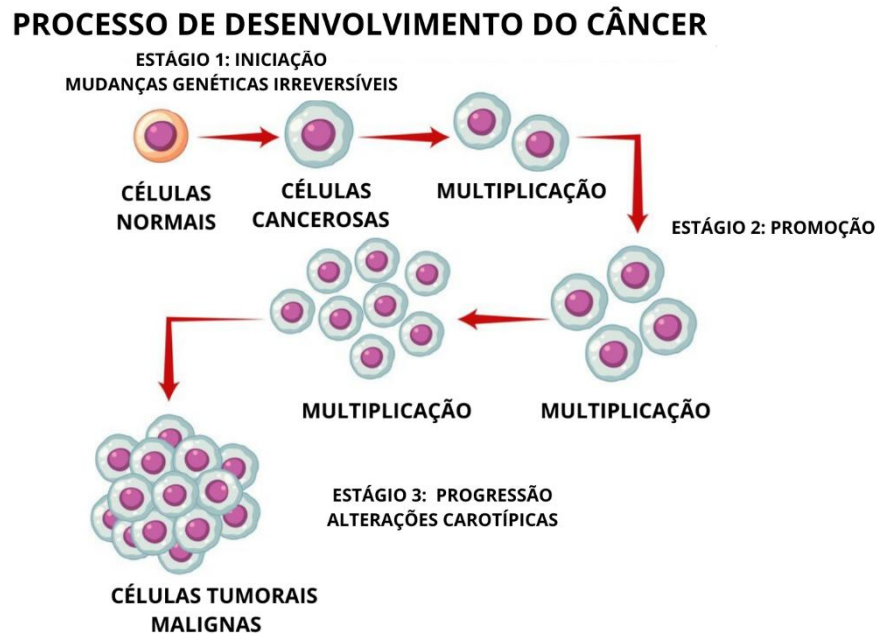
1.1 CÂNCER

O câncer é um conjunto de doenças caracterizadas por um crescimento anormal de células devido a alterações dinâmicas e complexas na homeostase celular, gerando alterações no genoma, no metabolismo e no microambiente celular. Os diferentes tipos de câncer podem ser classificados de acordo com o tipo de célula originária: são denominados carcinomas os tumores que tiveram origem de células epiteliais, como pele e mucosa; sarcomas são os tumores de origem do tecido conjuntivo; e leucemias, linfomas/mielomas, os tumores que derivam de células hematopoiéticas e de células do sistema imune, respectivamente (WALDUM; MJØNES, 2021).

A formação de células tumorais (carcinogênese) é um processo multifatorial que, macroscopicamente, pode se desenvolver a partir de lesões que progridem a estados pré-malignos e metástases. Os agentes carcinógenos são agentes químicos, físicos ou biológicos que podem ser endógenos ou exógenos, e podem ativar ou afetar indiretamente a carcinogênese, devido a uma exposição prolongada ou excessiva a esses agentes (IRIGARAY; BÉLPOMME, 2010; LIU *et al.*, 2015).

Sob um olhar celular, a carcinogênese pode ser dividida em 3 principais estágios: a iniciação, a promoção e a progressão (Figura 1). A iniciação é caracterizada por uma mudança genética irreversível, através da ligação covalente de iniciadores em macromoléculas, como o DNA. Diferentemente, a próxima etapa, a etapa de promoção, geralmente é caracterizada pela ligação não-covalente de promotores específicos ou inespecíficos para receptores celulares, a fim de influenciar a expressão gênica para uma maior proliferação celular das células que sofreram a iniciação. Por fim, a etapa de progressão refere-se a alterações, majoritariamente cariotípicas, que progridem de um tumor benigno para um tumor maligno/neoplasia (LIU *et al.*, 2015).

Figura 1 — Estágios da Carcinogênese



Fonte: Adaptado de freepik.com.

Ao longo das últimas décadas, Hanahan e Weinberg (HANAHAN, 2022; HANAHAN; WEINBERG, 2000, 2011) descreveram as principais características que as células tumorais possuem entre si e que permitem o seu desenvolvimento e disseminação, chamando-as de *Hallmarks* do câncer. Os primeiros *Hallmarks* do câncer foram a evasão da via apoptótica, a autossuficiência em sinais de crescimento celular, a insensibilidade a sinais que impedem o crescimento, a invasão tecidual e metástase, o potencial replicativo ilimitado e a capacidade das células cancerosas em criar vasculaturas para a nutrição do tumor (HANAHAN; WEINBERG, 2000).

Em uma nova revisão dos *Hallmarks* do câncer, os autores destacaram a relevância do microambiente tumoral para a tumorigênese, visto que a constituição e sinalização desse microambiente formam uma rede integrada de apoio para o desenvolvimento do tumor. Os mesmos autores também adicionaram mais dois grandes fenômenos, denominados de marcas registradas emergentes, que fazem parte da caracterização tumoral: a reprogramação do metabolismo celular das células tumorais e o escape da destruição imunológica. Além disso, mais duas características facilitadoras foram adicionadas: a instabilidade de mutação do genoma e a inflamação motora de tumores (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Em 2022, após o avanço de evidências científicas nas áreas molecular e celular do câncer, Hanahan consolidou, em sua nova revisão científica, a reprogramação do metabolismo celular,

o escape imunológico, a instabilidade de mutação do genoma e a inflamação motora de tumores como essenciais *Hallmarks* do câncer (HANAHAN, 2022). O autor também propõe que mais quatro novas características sejam analisadas e, posteriormente, incorporadas como *Hallmarks* do câncer, sendo elas: o desbloqueio da plasticidade fenotípica, a reprogramação epigenética não mutacional, os microbiomas polimórficos e as células senescentes (Figura 2).

Figura 2 — Características do Câncer



Fonte: Adaptada de HANAHAN, 2022.

1.2 Epidemiologia e Etiologia do Câncer Gástrico

O câncer tornou-se um dos mais significativos problemas de saúde pública do século 21. De acordo com o projeto GLOBOCAN (2022) da Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC, do inglês *International Agency for Research on Cancer*) da Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2022 foram declarados 18.741.966 novos casos de câncer no mundo, com exceção do câncer de pele não-melanoma (FERLAY J *et al.*, 2024).

O câncer gástrico (CG) é o 5º câncer com maior incidência de casos no mundo, sendo responsável por 968.784 novos casos (4.8% do total de novos casos). Ademais, ele também é reconhecido como o 5º câncer com maior número de mortes no mundo, ocasionando 660.175 mortes (6.8% do total de mortes) (FERLAY J *et al.*, 2024). O continente americano possui a 3ª maior prevalência de CG no mundo (FERLAY J *et al.*, 2024). A Sociedade Americana do Câncer (CAS) estima que em 2024, 26.890 novos casos e 10.880 mortes sejam relatadas por

câncer apenas em território norte-americano (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2024). De acordo com o Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (NIH), a taxa de sobrevivência relativa de 5 anos para pacientes de CG é de 36,4%, sendo observada uma maior taxa em pacientes do sexo feminino (41,7%) em relação ao sexo masculino (32,9%). Além disso, a taxa de sobrevivência também varia a depender do estágio no qual o tumor é classificado. Os tumores localizados possuem o melhor prognóstico, com uma taxa de sobrevivência relativa de 5 anos de 75,4%. Após a disseminação do tumor pelos gânglios linfáticos ou órgãos próximos, a taxa cai para 35,8% e com metástase à distância 7% de sobrevivência (SURVEILLANCE RESEARCH PROGRAM, 2024).

No Brasil, a estimativa para o triênio 2023-2025 é de 21.480 casos de CG no país, com uma maior prevalência de casos em homens (SANTOS *et al.*, 2023). As regiões com maiores taxas de incidência por 100 mil habitantes são as regiões Norte (8,65%) e Nordeste (7,47%) do país. A região Norte apresenta o dobro da taxa ajustada observada na região Sudeste (4,18%), de modo a destacar um mesmo padrão observado na incidência do CG entre países ou continentes de menor e maior Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) (SANTOS *et al.*, 2023). Com relação ao tratamento, a região Norte apresentou, diferente das demais regiões, um longo período entre o diagnóstico da malignidade e o início do tratamento, além de também possuir uma maior média de duração de tratamento, diminuindo a sobrevida e a eficácia do tratamento (SOUZA *et al.*, 2024).

O CG é um câncer multifatorial que, em sua maioria, possui seu diagnóstico inicial tardio. Isso acontece devido a muitos pacientes serem assintomáticos durante as fases iniciais da doença (XIA; AADAM, 2022). Quando se inicia às manifestações de sintomas, como perda de peso inespecífica, dor abdominal persistente e anemia com ou sem deficiência de ferro, muitos pacientes já são diagnosticados em estágios avançados ou metastáticos da doença (MUKKAMALLA SKR; RECIO-BOILES A; BABIKER HM, 2024; YUSEFI *et al.*, 2018). Em relação a heterogeneidade de fatores de risco, que podem contribuir na incidência ou agravamento do quadro clínico, seus principais são dieta e hábitos alimentares, estilo de vida não-saudável, fatores genéticos, histórico familiar e infecções por *H. pylori* ou Epstein-Barr (EBV) (MUKKAMALLA SKR; RECIO-BOILES A; BABIKER HM, 2024; YUSEFI *et al.*, 2018).

Em 2023, TRINH e colaboradores analisaram a influência dos fatores de risco relacionados ao estilo de vida no CG em adultos coreanos, além da sua associação com a adesão de comportamentos de rastreamento da doença. Foram avaliados seis fatores de risco, incluindo

tabagismo, uso excessivo de bebidas alcoólicas, inatividade física, obesidade, ingestão de carne e ingestão de alimentos salgados. Observou-se que homens tendem a exibir mais agrupamento de múltiplos fatores de risco do que mulheres. Além disso, quando o paciente exibia mais de 3 fatores de risco, menos propenso ele era de aderir ao programa de rastreamento do câncer de estômago. No estudo, o fator mais frequente entre os pacientes foi a inatividade física.

Outro fator de risco dietético importante é o consumo excessivo de sal. O Fundo Mundial de Pesquisa do Câncer e o Instituto Americano de Pesquisa do Câncer (WCRF/AICR) classificou o sal como um dos fatores de risco mais importantes para o CG. Na revisão sistemática de Ge e colaboradores (2012), observou-se que a alta ingestão de sal foi significativamente associada a um risco 105% maior de câncer de estômago em comparação a uma baixa ingestão de sal. Os potenciais mecanismos que sugerem essa relação de risco são a destruição da barreira mucosa do estômago e estímulo da produção de mucina na mucosa gástrica, gerando um aumento da síntese de DNA e proliferação celular que leva a uma inflamação e gastrite atrófica, além da criação de um ambiente favorável para a colonização por *H. pylori* (GE *et al.*, 2012; XIA; AADAM, 2022).

O histórico familiar e os fatores genéticos são fatores de risco importantes para a escolha da abordagem clínica e terapêutica de pacientes com CG. A herança genética pode influenciar a prevalência da doença, com uma suscetibilidade de 2 a 10 vezes mais em pessoas com histórico familiar (YAGHOUBI *et al.*, 2004). Entretanto, os casos hereditários são responsáveis por apenas 1-3% do número de casos globais de CG (OLIVEIRA *et al.*, 2015). O rastreio genético das síndromes hereditárias baseia-se, principalmente, na idade do paciente no momento do diagnóstico (câncer de início precoce é definido como câncer entre 18 e 49 anos), raridade do tipo de tumor e/ou histórico familiar de câncer. Na principal síndrome hereditária do CG, o câncer gástrico difuso hereditário (HDGC), seu diagnóstico também é associado ao sequenciamento de mutações nos genes da E-caderina (*CDH1*) e da alfa-E-catenina (*CTNNA1*) (OLIVEIRA *et al.*, 2015; RUSTGI; CHING; KASTRINOS, 2021).

Em 1994, a IARC classificou a infecção por *H. pylori* como um carcinógeno humano de classe 1, devido a sua relação com o surgimento de lesões gástricas e suas progressões à gastrite e úlceras (International Agency for Research on Cancer, 1994). A infecção por *H. pylori* é reconhecida pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC, do inglês *Centers for Disease Control and Prevention*) como uma das infecções bacterianas crônicas mais comuns no mundo, principalmente em países em desenvolvimento (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2024). A capacidade da *H. pylori* de neutralizar o pH ácido

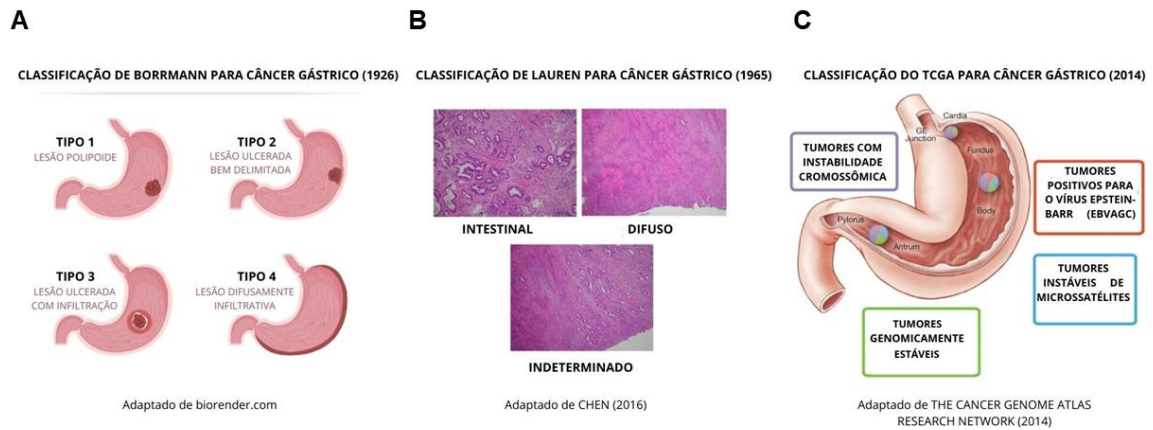
do estômago auxilia no seu processo de colonização, gerando um processo inflamatório que inicialmente pode progredir para uma gastrite não atrófica.

Outra infecção associada como um fator de risco para o CG é a infecção pelo vírus Epstein-Barr (EBV). Conhecido como câncer gástrico associado ao EBV (EBVaGC), esse subtipo de CG foi caracterizado na classificação do Atlas do Genoma do Câncer (TCGA, do inglês *The Cancer Genome Atlas*) para malignidades gástricas devido as suas particularidades moleculares e clínicas (THE CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK, 2014). A transmissão do EBV ocorre principalmente via saliva, sendo possível o vírus ficar em estado de latência por anos e ser posteriormente reativado. As primeiras detecções de infecção de EBV em células do trato digestivo foi realizada por Burke e colaboradores (1990) e Shibata & Weiss (1992), demonstrando a presença de genoma de EBV em células cancerosas e displásicas, e não-infecção em células normais circundantes. A infecção de células digestivas é sustentada por duas teorias: o EBV infecta células B e células epiteliais orais, de modo que à medida que a saliva percorre o trato digestivo, o EBV infecta as células do estômago. A outra teoria é que o EBV é reativado pelas células B no estômago, de forma ainda não elucidada, e torna-se disponível para infecção das células epiteliais do estômago (SALNIKOV; MACNEIL; MYMRYK, 2024; SUN *et al.*, 2020).

1.3. Classificação do Câncer Gástrico

Diferentes sistemas de classificação para o adenocarcinoma gástrico foram propostos nas últimas décadas, com o objetivo de compreender os diferentes fenótipos histopatológicos e suas particularidades genômicas da malignidade. As classificações mais comumente utilizadas são de Borrmann, de Lauren, da OMS e a classificação TNM para estadiamento.

Figura 3 — Principais classificações para o Câncer Gástrico.



Fonte: Elaborado pela autora.

A classificação de Borrmann (Figura 3 – A) foi descrita em 1926 e considera as características macroscópicas do tumor para dividi-lo em 4 grupos: lesão polipoide sem ulceração (tipo I), lesão ulcerada bem delimitada e com bordas elevadas (tipo II), lesão ulcerada com infiltração difusa em partes ou na base (tipo III) e lesão difusamente infiltrativa (tipo IV) (SMYTH *et al.*, 2020). No estudo retrospectivo de Li e colaboradores (2009), observou-se que os tipos I e II possuem comportamentos biológicos semelhantes e não apresentaram diferença significativa de sobrevida, profundidade de invasão e envolvimento nodal. Em contrapartida, os tipos III e IV tiveram pior prognóstico, alta proporção de tecido diferencialmente pobre e maiores taxas de metástase em linfonodos quando comparados com os tipos I e II.

Em 1965, propõe-se a classificação de Lauren (Figura 3 – B), no qual compreende as características histopatológicas dos adenocarcinomas gástricos em 3 distintos tipos: tipo intestinal, tipo difuso e tipo indeterminado (LAURÉN, 1965). O tipo intestinal é o mais frequente nos casos de CG e caracteriza-se pela similaridade morfológica com adenocarcinomas de origem intestinal, assim como glândulas e componentes tubulares, além de haver coesão entre as células (BOSMAN *et al.*, 2010; LEE *et al.*, 2018). Sua predisposição está associada majoritariamente à exposição ambientais, como infecção por *H. pylori*. O tipo difuso está relacionado a fatores familiares e genéticos, e caracteriza-se pela ausência de aderência entre as células, além de pouca ou nenhuma formação de glândulas. Por fim, o tipo indeterminado abrange os demais tipos que não se enquadram nos tipos histológicos anteriores (LAURÉN, 1965; LEE *et al.*, 2018).

Em razão da identificação de novos tipos de adenocarcinomas gástricos que não se enquadram na classificação de Lauren, a OMS, em 2010, sugeriu um novo sistema de

classificação que abrange tipos mais raros da malignidade (BOSMAN *et al.*, 2010). As classificações são feitas entre os tipos carcinoma tubular, mucinoso, mal coeso, papilar e misto. Os tumores classificados em tipo difuso na classificação de Lauren podem ser classificados como tipo mal coeso de células em anel de sinete. Já o tipo intestinal de Lauren, compartilham semelhanças com os tipos tubular, papilar e mucinoso (Tabela 1) (YAKIREVICH; RESNICK, 2013). Em 2019, a OMS adicionou novos tipos para a classificação de adenocarcinoma gástrico: adenocarcinoma micro papilar, adenocarcinoma gástrico do tipo glândula fúndica e gastroblastoma (KUSHIMA, 2022).

Tabela 1 — Comparativo entre os sistemas de classificação de Lauren (1965) e da OMS (2010) para tumores gástricos.

Classificação de Lauren (1965)	Classificação da Organização Mundial da Saúde (2010)
Subtipo Intestinal	Adenocarcinoma Mucinoso Adenocarcinoma Papilar Adenocarcinoma Tubular
Subtipo Difuso	Subtipo mal coeso de células em anel de sinete
Subtipo Indeterminado	Carcinoma Indiferenciado Carcinoma Adenoescamoso Carcinoma com estroma linfoide (Carcinoma Medular) Adenocarcinoma Hepatoide Carcinoma de células escamosas

Fonte: Adaptado de YAKIREVICH e RESNICK (2013)

Apesar dos avanços na classificação histológica de tumores gástricos para uma melhor especificação dos diferentes tipos existentes, apenas as características histopatológicas são insuficientes para compreender a vasta heterogeneidade do tumor gástrico. Desse modo, a classificação molecular do TCGA propõe uma classificação morfo-molecular (Figura 3 – C), no qual por meio de características moleculares, como mutações e fusões gênicas, divide-se em tumores positivos para o vírus Epstein-Barr (EBVaGC), tumores instáveis de microssatélites, tumores genomicamente estáveis e tumores com instabilidade cromossômica (KUSHIMA, 2022; THE CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK, 2014).

Os tumores EBVaGC apresentam hiper metilação no DNA, frequentemente na ilha CpG e nos genes *PIK3CA* e *ARID1A*. Amplificações elevadas também foram observadas em *JAK2* e *PD-L1/2*. Os tumores instáveis de microssatélites são caracterizados por um fenótipo metilador de ilha CpG e silenciamento do gene *MLH1*. Os tumores genomicamente estáveis possuem características histológicas de pouca coesão e mutações nos genes *CDH1*, *RHOA* e *CLDN18*. E

os tumores de instabilidade cromossômica possuem uma histologia tubular/papilar, semelhante também à histologia intestinal de Lauren, alta frequência de mutações no gene *TP53* e elevada amplificação de tirosinas quinases ERBB2, EGFR, MET, FGFR2 e KRAS (KUSHIMA, 2022; RÖCKEN, 2023; THE CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK, 2014).

O estadiamento é uma classificação que objetiva categorizar o grau de disseminação do tumor e é bastante empregada no diagnóstico pré-operatório, pois auxilia no processo de escolha terapêutica para o paciente (WITTEKIND, 2015). O sistema mais utilizado é o sistema de classificação TNM para tumores malignos, proposto pela União Internacional para o Controle do Câncer (UICC, do inglês *Union for International Cancer Control*) e pelo Comitê Conjunto Americano sobre Câncer (AJCC, do inglês *American Joint Committee on Cancer*). O sistema TNM baseia-se na extensão anatômica da doença em três categorias: a categoria T descreve a localidade e o tamanho do tumor (T0-T4 ou Tis), a categoria N descreve o comprometimento dos linfonodos regionais (N0-N3) e a categoria M descreve a presença ou ausência de metástases à distância (M0 ou M1). Essas categorias podem ser subclassificadas em graduações alfabéticas. Após estabelecer a classificação TNM, o tumor é classificado em estágios que variam de I a IV (AMIN *et al.*, 2017). A definição de cada uma das categorias e subcategorias baseado na 8ª edição do Sistema TNM para câncer gástrico da AJCC são apresentadas na tabela 2.

Tabela 2 — Classificação TNM para câncer gástrico do tipo carcinoma.

Estágio Clínico	Classificação TNM
Estágio 0 (TisN0M0)	Tis: Tumor intraepitelial sem invasão da lâmina própria, displasia de alto grau. N0: Sem metástase de linfonodos regionais. M0: Ausência de metástase à distância.
Estágio I (T1N0M0) (T2N0M0)	T1: Tumor invade a lâmina própria, muscular da mucosa ou submucosa. T2: Tumor invade a muscular própria. N0: Sem metástase de linfonodos regionais. M0: Ausência de metástase à distância.
Estágio IIA (T1N1-3M0) (T2N1-3M0)	T1: Tumor invade a lâmina própria, muscular da mucosa ou submucosa. T2: Tumor invade a muscular própria. N1-3: Pode ser classificado em N1 (metástase em um ou dois linfonodos regionais), N2 (metástase de em três a seis linfonodos regionais), N3a (metástase em sete a 15 linfonodos regionais) ou N3b (metástase em 16 ou mais linfonodos regionais). M0: Ausência de metástase à distância.
Estágio IIB (T3N0M0) (T4aN0M0)	T3: Tumor penetra no tecido conjuntivo da subserosa sem invasão do peritônio visceral ou estruturas adjacentes. T4a: Tumor invade a serosa (peritônio visceral). N0: Sem metástase de linfonodos regionais. M0: Ausência de metástase à distância.
Estágio III (T3N1-3M0) (T4aN1-3M0)	T3: Tumor penetra no tecido conjuntivo da subserosa sem invasão do peritônio visceral ou estruturas adjacentes. T4a: Tumor invade a serosa (peritônio visceral). N1-3: Pode ser classificado em N1 (metástase em um ou dois linfonodos regionais), N2 (metástase de em três a seis linfonodos regionais), N3a (metástase em sete a 15 linfonodos regionais) ou N3b (metástase em 16 ou mais linfonodos regionais). M0: Ausência de metástase à distância.
Estágio IVA (T4bN1-3M0)	T4b: Tumor invade estruturas/órgãos adjacentes N1-3: Pode ser classificado em N1 (metástase em um ou dois linfonodos regionais), N2 (metástase de em três a seis linfonodos regionais), N3a (metástase em sete a 15 linfonodos regionais) ou N3b (metástase em 16 ou mais linfonodos regionais). M0: Ausência de metástase à distância.
Estágio IVB (T1-4N1-3M1)	T1-4: Pode ser classificado em T1, T2, T3 ou T4. N1-3: Pode ser classificado em N1, N2, N3a ou N3b. M1: Metástase a distância.

Fonte: Adaptado de *TNM Classification of Malignant Tumours 8th edition*.

1.4 Tratamento do Câncer Gástrico

1.4.1 Estratégias cirúrgicas

A escolha da abordagem terapêutica para o câncer de estômago varia a partir do estadiamento pré-operatório do tumor. A principal abordagem em casos de intenção curativa é a ressecção cirúrgica, que pode ser uma ressecção endoscópica ou uma gastrectomia. A ressecção endoscópica é um método minimamente invasivo que pode ser classificado em ressecção endoscópica da mucosa (EMR) e dissecação endoscópica da submucosa (ESD). Essa abordagem pode ser considerado um tratamento definitivo em casos de pacientes com câncer gástrico superficial, além de não haver metástase nos linfonodos, ulceração e diferenciação pobre do tecido. Devido ao diagnóstico tardio da malignidade, muitos casos já são diagnosticados com espalhamento de lesões e comprometimento dos linfonodos, o que diminui a taxa de sucesso da ressecção endoscópica (CONITEC, 2018; MUKKAMALLA SKR *et al.*, 2024).

A gastrectomia tem como objetivo a ressecção local radical, sendo classificada em gastrectomia distal, ressecção de dois terços distais do estômago e anastomose do estômago proximal ao intestino delgado, ou em gastrectomia total, com anastomose do esôfago ao intestino delgado. Quando surge o comprometimento dos linfonodos, a linfadenectomia D2 (ressecção de todos os linfonodos regionais) é recomendada para complementar a estratégia terapêutica de pacientes com tumor ressecável (MUKKAMALLA SKR *et al.*, 2024).

1.4.2 Quimioterapia

A quimioterapia é uma estratégia que consiste na utilização de medicamentos para o tratamento de pacientes com câncer. Ela é comumente utilizada em combinação com a ressecção cirúrgica, sendo conhecida como quimioterapia perioperatória, e pode ser realizada na fase pré-operatória (neoadjuvante) ou na fase pós-operatória (adjuvante). Diferentes regimes de quimioterápicos podem ser utilizados para o CG, a depender do estadiamento e heterogeneidade do tumor. Por esse motivo, a depender da região geográfica, diferentes abordagens são consideradas padrão ouro (SATO *et al.*, 2023).

A quimioterapia neoadjuvante é altamente recomendada para casos em que o tumor está localmente avançado, de modo a diminuir o tamanho do tumor primário, seu estágio e garantir

uma melhor sobrevida para o paciente (MACHLOWSKA *et al.*, 2020). Essa abordagem é considerada padrão ouro no hemisfério ocidental e em partes da região Ásia-Pacífico (SMYTH *et al.*, 2020). Por exemplo, nos Estados Unidos da América (EUA), a quimioterapia neoadjuvante é a mais aceita como diretriz para pacientes de CG, sendo os principais quimioterápicos utilizados a cisplatina e o 5-fluorouracil (5-FU). Na Europa, o regime padrão é a combinação ECF perioperatória (epirrubicina, cisplatina e 5-FU) (ARAI; NAKAJIMA, 2020). Em contrapartida, no Leste Asiático, os principais regimes de tratamento são baseados na quimioterapia adjuvante em diferentes combinações de S-1, capecitabina e docetaxel (ARAI; NAKAJIMA, 2020; JOSHI; BADGWELL, 2021).

1.4.3 Terapia alvo direcionada

Em virtude dos avanços nos estudos moleculares de tumores gástricos e do aumento no número de casos de resistência à quimioterapia, a terapia alvo direcionada torna-se uma abordagem promissora para uma melhor especificidade para o tratamento da neoplasia, reduzindo efeitos adversos da terapia citotóxica convencional. O primeiro medicamento alvo direcionado aprovado para CG foi o anticorpo monoclonal direcionado ao receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2), Trastuzumabe. Seu uso é recomendado para pacientes de CG avançado com superexpressão de HER2 e em combinação com a quimioterapia. Em um estudo clínico realizado em 2010, a adição de Trastuzumabe à quimioterapia melhorou a sobrevida de pacientes em comparação com a quimioterapia sozinha (BANG *et al.*, 2010).

Atualmente, conjugações anticorpo-fármaco são alternativas promissoras de fármacos mais específicos, devido seu mecanismo de ação estar direcionado às células tumorais que expressam esses determinados antígenos (Arai & Nakajima, 2020). Além disso, eles são estudados como uma opção de segunda linha, ou seja, um regime para pacientes que não responderam à terapia anterior (SKÓRZEWSKA; GEÇA; POLKOWSKI, 2023). A exemplo, o Trastuzumabe-Deruxtecan, um conjugado anticorpo-fármaco de Trastuzumabe com um inibidor da topoisomerase I aprovado pelo Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos (FDA). No entanto, estudos subsequentes, como Shitara e colaboradores (2020), foi observado eventos adversos graves (EAS) (grau 3 ou superior) no grupo de tratamento com Trastuzumabe Deruxtecan, sendo esses principalmente toxicidades hematológicas, doença pulmonar intersticial e pneumonite.

O microambiente tumoral (TME) é de grande importância para o desenvolvimento de um tumor, sendo composto por células estromais, fibroblastos, células endoteliais e células do sistema imune inato e adaptativo. Desse modo, a imunoterapia surge como uma alternativa de estimulação do próprio sistema imunológico do paciente para o tratamento do câncer. Uma das principais estratégias de imunoterapia é o uso de inibidores de *checkpoint* imunológico (ICI) (LI *et al.*, 2021; TRIANTAFILLIDIS; KONSTADOULAKIS; PAPALLOIS, 2024). Em geral, os ICI inibem a ativação excessiva da interação ligante-receptor de pontos de verificação, mantendo as células do sistema imunológico ativadas. Os principais exemplos de ICI são os inibidores de PD-1/PD-L1 e CTLA-4. Atualmente, a imunoterapia é utilizada em combinação com a quimioterapia, com o objetivo de intensificar a resposta terapêutica do paciente, visto é uma abordagem que utiliza diferentes mecanismos de ação (TRIANAFILLIDIS; KONSTADOULAKIS; PAPALLOIS, 2024). Para o CG avançado, os principais anticorpos anti-PD-1/PD-L1 aprovados como primeira linha de tratamento são pembrolizumabe, nivolumabe e sintilimabe (NARITA; MURO, 2023).

Apesar das diferentes abordagens terapêuticas apresentadas acima, a resistência terapêutica adquirida tornou-se um dos maiores gargalos para o sucesso da terapia de neoplasias. Os mecanismos de resistência surgem como uma resposta do organismo em reverter a ação de medicamentos, diminuindo sua eficácia. Os principais mecanismos de resistência são efluxo de drogas, inativação de fármacos, alterações no microambiente tumoral e escape do processo de morte celular (SHI; GAO, 2016). A título de exemplo, Yu e colaboradores (2013) constataram que o silenciamento do gene *Bcl-2*, uma família de proteínas regulatórias do processo de apoptose, aumentou a apoptose celular e diminuiu a resistência ao 5-FU em células de adenocarcinoma gástrico, sugerindo que a expressão do gene pode afetar a quimiossensibilidade ao fármaco.

Desse modo, a busca por novos alvos terapêuticos para CG torna-se cada vez mais promissora, visto que com o avanço dos estudos moleculares da neoplasia e a evolução tecnológica das ômicas, pode-se desenvolver terapias alvos mais específicas e agentes farmacológicos mais potentes, proporcionando menos efeitos adversos ao paciente e uma melhor eficácia da resposta terapêutica. Dentre os métodos existentes para a descoberta de novos alvos terapêuticos, encontra-se o método de *target fishing*.

Target fishing ou identificação de alvos é um método para a predição de alvos biológicos, a partir de ferramentas de bioinformática, como algoritmos baseados em espectros de bioatividade ou similaridade de estrutura química, ou de ensaios experimentais, como a triagem

de bibliotecas de compostos químicos e análise de potência de ligação ou viabilidade. (WANG; XIE, 2014). Esse método, apesar de ser comumente empregado em estudos de triagem virtual, a abordagem experimental é incentivada principalmente por iniciativas de validação de alvos terapêuticos, a exemplo o Programa de Doação de Sondas Químicas, um recurso público e gratuito de alta qualidade que visa a seleção e validação de sondas químicas de alvo pré-determinado para a descoberta de novas estratégias terapêuticas (ANTOLIN *et al.*, 2023). A exemplo, Mesquita e colaboradores (2020) identificaram MAPK14 como um potencial biomarcador e alvo terapêutico para o CG, através de uma triagem de alto rendimento de uma biblioteca de 17 inibidores de quinases, no qual o inibidor de MAPK14, SB-245392, resultou em percentuais significativos de inibição da proliferação celular e induziu o processo de apoptose em células tumorais.

Portanto, o presente trabalho tem como objetivo a identificação de inibidores com potencial terapêutico no CG, através de uma triagem de alto rendimento de um painel constituído de inibidores com alvos específicos diversificados e definidos, de modo a selecionar a molécula com maior potencial citotóxico e investigar seus efeitos antitumorais da molécula escolhida em linhagens tumorais gástricas.

2 JUSTIFICATIVA

O câncer gástrico (CG) é o quinto câncer com maior incidência no mundo, sendo responsável por mais de 600 mil mortes, segundo a Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC). No Brasil, a estimativa para o triênio 2023-2025 é de 21.480 casos de CG, sendo as maiores taxas de incidência nas regiões norte e nordeste do país. O CG é um câncer multifatorial caracterizado por uma heterogeneidade morfo-molecular, sendo seus principais fatores de risco, os fatores dietéticos, estilo de vida não-saudável, infecções por *H. pylori* e Epstein-Barr, e fatores genéticos. A escolha da abordagem terapêutica depende do estadiamento pré-operatório do tumor, no qual muitas vezes o tumor é diagnosticado em estágios avançados, o que pode diminuir a taxa de sucesso do tratamento, principalmente pelo surgimento resistência quimioterápica. Devido ao CG ser de natureza heterogênea, a combinação de terapias e a identificação de novos alvos moleculares tornam-se abordagens promissoras para desenvolver terapias mais eficientes e com menos efeitos adversos aos pacientes.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Identificar novos alvos moleculares como alternativa terapêutica para tratamento de câncer gástrico.

3.2 Objetivos Específicos

- Realizar uma triagem *in vitro* em uma biblioteca de inibidores químicos para a seleção do inibidor mais relevante na inibição do crescimento celular tumoral de células de câncer gástrico;
- Avaliar a citotoxicidade do inibidor selecionado em linhagens gástricas;
- Avaliar a expressão gênica diferencial do alvo molecular do inibidor selecionado no *dataset* transcriptômico de câncer gástrico;
- Avaliar o efeito do inibidor na expressão gênica do seu alvo em células tumorais gástricas;
- Analisar o efeito do inibidor na integridade de membrana celular, no perfil migratório, no ciclo celular e na ativação de caspases 3 e 7 em linhagens gástricas;
- Analisar o efeito do inibidor selecionado no perfil de expressão proteica em linhagens gástricas;

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Painel de inibidores moleculares

Um painel de 28 inibidores moleculares fora disponibilizado pelo programa Doação de Sondas Químicas do Consórcio de Genômica Estrutural (SGC, do inglês *Structural Genomics Consortium*) através da colaboração com a Dr^a Susanne Müller-Knapp da Universidade Goethe de Frankfurt. Os inibidores foram enviados em soluções estoques de 1mM e de 10mM, diluídos DMSO e posteriormente diluídos para as concentrações desejadas. As características funcionais das proteínas-alvo de cada inibidor químico utilizado foram descritas na tabela 3.

Tabela 3 — Características funcionais das proteínas alvo dos inibidores químicos disponíveis no painel de inibidores do Programa de Doação de Sondas Químicas do Consórcio de Genômica Estrutural.

Inibidores	Proteína Alvo	Função da Proteína Alvo
A-485	EP300, CREBBP	Histonas acetiltransferases
ABT-546	EDNRA	Receptor de endotelina-1
ABT-724	DRD4	Receptor de dopamina
BAY-1797	P2RX4	Receptor purinérgico P2X 4
BAY-293	SOS1	Fator de troca de nucleotídeos em proteínas Ras
BAY-474	MET	Receptor de tirosina quinase
BAY-707	NUDT1	Hidrolase de nucleosídeos oxidados
BAY-7598	MMP12	Metaloproteinase de matriz 12
BAY-784	GNRHR	Receptor do hormônio liberador de gonadotrofina
BAY-985	TBK1, IKBKE	Serina/treonina quinase
BI-1935	EPHX2	Hidrolase de compostos epóxidos
BI-1950	ITGAL	Subunidade alfa L de Integrina
BI-2545	ENPP2	Lisofosfolipase D
BI-4394	MMP13	Metaloproteinase de matriz 13
BI-639667	CCR1	Receptor de quimiocina do motivo CC1
BI-653048	NR3C1	Receptor nuclear de glicocorticóides
BI-665915	ALOX5AP	Proteína ativadora da 5-lipoxigenase
BI-99179	FASN	Sintetase de ácido graxo
BTZO-1	MIF	Fator inibitório de migração de macrófagos (Citocina)
Mli-2	LRKK2	Serina/treonina quinase
MRK-560	PSEN1	Subunidade catalítica do complexo gama-secretase (Presenilina 1)
MRL 650	CNR1	Receptor de canabinoides endógenos
MRL-SYKi	SYK	Tirosina quinase não receptora
PF-05105679	TRPM8	Canal iônico dependente de voltagem
R-9s	ADRA1D	Receptor alfa1 de adrenérgicos
TP-008	ACV1B, TGFBR1	Receptor de treonina/serina quinases
TP-020	MGAT2	Transferase da n-glicosilação de proteínas
TP-024	GPR52	Receptor 52 acoplado à proteína G

Fonte: Elaborada pela autora (2025)

4.2 Cultivo celular

Foram utilizadas três linhagens celulares de adenocarcinoma gástrico estabelecidas pelo grupo de pesquisa: as linhagens ACP-02, ACP-03 e AGP-01, sendo respectivamente derivadas de tumor primário do tipo difuso, tumor primário do tipo intestinal e fluido ascítico gástrico do tipo intestinal (LEAL *et al.*, 2009). Foi utilizada também a linhagem gástrica não-neoplásica MNP-01 (MESQUITA *et al.*, 2018). As linhagens celulares foram cultivadas em meio DMEM (Meio Eagle - Modificado por Dulbecco), suplementado com 10% de SBF (Soro Bovino Fetal) e 1% de antibiótico (penicilina/estreptomicina 5000U/5000µg/mL), sendo mantidas em estufa de cultura com atmosfera de CO₂ a 5% e temperatura de 37°C.

Tabela 4 — Características das linhagens celulares utilizadas no estudo.

Linhagem celular	Classificação histológica	Origem	Referência
ACP-02	Difuso	Adenocarcinoma gástrico primário	(LEAL <i>et al.</i> , 2009)
ACP-03	Intestinal	Adenocarcinoma gástrico primário	(LEAL <i>et al.</i> , 2009)
AGP-01	Intestinal	Fluido ascético de adenocarcinoma gástrico	(LEAL <i>et al.</i> , 2009)
MNP-01	-	Mucosa estomacal não neoplásica	(MESQUITA <i>et al.</i> , 2018)

Fonte: Elaborada pela autora (2025).

4.3 Ensaio de Citotoxicidade pelo método de Alamar Blue

As linhagens neoplásicas ACP-02 e ACP-03 foram semeadas em uma placa de 384 poços na concentração de 3×10^2 células/poço. Após a aderência celular, as células foram tratadas com 1 µM de cada um dos inibidores moleculares disponibilizados pelo SGC. DMSO 0.1% foi utilizado como controle negativo. Após 72 horas, adicionou-se o reagente alamarBlue™ HS Cell Viability Reagent da Invitrogen™ seguindo as recomendações do fabricante. A leitura de fluorescência foi realizada no leitor de placas Beckman Coulter Microplate Reader DTX 880 (Ex/Em: 560/590nm). Os dados foram analisados pela média ± desvio padrão 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 *software* GraphPad Prism® (v.8.0).

4.4 Análise de expressão gênica diferencial (DGE) e sobrevida

Dados de expressão gênica de RNA *Sequencing* (RNA-Seq) de 412 amostras de adenocarcinoma gástrico e 36 amostras pareadas de mucosa gástrica não-neoplásica foram extraídos do banco de dados do TCGA (STAD TCGA - GDC v.18.0) no *XenaBrowser* (<https://xenabrowser.net/datapages/>). Os dados clínicos (n=375) foram baixados pelo Portal cBio (<https://www.cbioportal.org/datasets>). As amostras que não havia dados clínicos pareados foram excluídas da análise (n=37). A normalização foi feita pelo método *trimmed mean of M-values* (TMM) com a função “normLibSizes” do pacote *edgeR* (v.3.40.2) (CHEN *et al.*, 2024). O pacote *limma* (v.3.54.2) (RITCHIE *et al.*, 2015) do *software R* (v.4.2.3) foi utilizado para a análise dos valores de contagem de RNA-Seq (GENTLEMAN *et al.*, 2004; SMYTH, 2005). Foi considerado para FDR o valor de corte $< 0,05$ e um $|\log_{2}FC|$ (\log_{2} fold-change) $\geq 0,5$; como observado em análises semelhantes em Wang e colaboradores, (2017) e Liang e colaboradores, (2020).

Nas análises de expressão gênica diferencial (DGE) dos subtipos de adenocarcinoma gástrico foi realizado um reagrupamento dessas classificações a partir das suas principais características, a fim de otimizar a análise dos resultados. A correlação das classificações de Lauren e da OMS foi realizada a partir da semelhança de morfologia entre os subtipos (YAKIREVICH; RESNICK, 2013). O grupo de amostras do subtipo intestinal para classificação de Lauren foi composto pelas amostras classificadas no banco de dados como “adenocarcinoma gástrico do tipo intestinal (do inglês, *intestinal type stomach adenocarcinoma*)”, “adenocarcinoma gástrico papilar (do inglês, *papillary stomach adenocarcinoma*)”, “adenocarcinoma gástrico tubular (do inglês, *tubular stomach adenocarcinoma*)” e “adenocarcinoma gástrico mucinoso (do inglês, *mucinous stomach adenocarcinoma*)”. O grupo de amostras do subtipo difuso para classificação de Lauren foi composto por amostras classificadas como “adenocarcinoma gástrico tipo difuso (do inglês, *diffuse type stomach adenocarcinoma*)” e “carcinoma gástrico de células em anel de sinete (do inglês, *signet ring cell carcinoma of the stomach*)”. O grupo de amostras de tumores com baixa adesão na classificação da OMS foi composto por amostras classificadas como “adenocarcinoma gástrico tipo difuso (do inglês, *diffuse type stomach adenocarcinoma*)” e “carcinoma gástrico de células em anel de sinete (do inglês, *signet ring cell carcinoma of the stomach*)”.

Para as análises da classificação TNM de tumores malignos, tumores classificados com T1, T1a e T1b foram agrupados no grupo T1; T2, T2a e T2b no grupo T2 e T4, T4a e T4b no

grupo T4 para classificação de tamanho do tumor e disseminação. Na classificação de disseminação do tumor para os linfonodos regionais, os tumores classificados em N3, N3a e N3b foram agrupados no grupo N3. Por fim, para o estadiamento do tumor, foram agrupados os grupos “*Stage III*”, “*Stage IIIA*”, “*Stage IIIB*” e “*Stage IIIC*” no grupo “*Stage III*”; “*Stage II*”, “*Stage IIA*” e “*Stage IIB*” no grupo “*Stage II*”; “*Stage I*”, “*Stage IA*” e “*Stage IB*” em “*Stage I*”.

A análise e elaboração de gráficos de sobrevida, usando o método de Kaplan-Meier (KM), foram realizadas a partir dos pacotes *survival* (v.3.5-8) e *survminer* (v.0.4.9) do *software R* (v.4.2.3). Valores de $p < 0,05$ foram definidos como estatisticamente significativos.

4.5 Determinação da Concentração de Inibição (CI₅₀) do inibidor BTZO-1

As linhagens neoplásicas ACP-02, ACP-03 e AGP-01 foram semeadas em uma placa de 384 poços na concentração de 3×10^2 células/poço. Após a aderência celular, foi realizada uma curva de concentração-resposta (0.1 μ M - 10 μ M) com o inibidor BTZO-1. DMSO 0.1% foi utilizado como controle negativo. Após 72 horas, utilizou-se o *AlamarBlue™ HS Cell Viability Reagent* da Invitrogen™ para a medição da fluorescência. A concentração de inibição de 50% do crescimento celular (CI₅₀) do inibidor molecular foi estimada com o software GraphPad Prism® (v.8.0). Os ensaios foram realizados em triplicata independentes. Os resultados foram normalizados e apresentados em regressão não linear. Diferenças significativas foram consideradas com intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$).

4.6 Análise de expressão gênica por RT-qPCR

As linhagens neoplásicas AGP-01, ACP-02, ACP-03 e a linhagem não-neoplásica MNP-01 foram coletadas e seus RNA totais foram extraídos usando TRIzol® Reagent (Life Technologies®, USA). A quantificação de mRNA foi determinada usando NanoDrop® (Thermo Scientific) e todas as amostras foram normalizadas para a concentração de 20ng/uL. Em seguida, foi realizado a transcrição reversa usando o kit *High Capacity cDNA Reverse Transcriptase®* (Thermo Scientific, EUA) e a PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR) foi executada pelo kit SYBR® Green Master Mix (Life Technologies, EUA) no equipamento QuantStudio™ 5 (Applied Biosystems, USA). O nível de expressão relativa de *MIF* (NM_002415.2) foi normalizado usando o gene *RPLP0* (NM_001002.4) como um controle endógeno e calculado usando o método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (SCHMITTGEN; LIVAK, 2008). A linhagem

celular MNP-01 foi utilizada com calibradora do experimento e 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 GraphPad Prism® (v.8.0).

Tabela 5 — Sequências de oligonucleotídeos usados na RT-qPCR.

GENE	Forward Primer (5'-3')	Reverse Primer (5'-3')
<i>MIF</i>	GAACCGCTCCTACAGCAAG	GGCGAAGGTGGAGTTGTT
<i>RPLP0</i>	GCAATGTTGCCAGTGTCTG	GCCTTGACCTTTTCAGCAA

Fonte: Elaborada pela autora (2025).

4.7 Ensaio de Integridade da Membrana

As linhagens neoplásicas AGP-01 e ACP-03 foram semeadas na concentração de $2,5 \times 10^3$ células/poço em placa de 96 poços. Após atingir uma monocamada celular, as células foram tratadas com BTZO-1 (1 μ M) e 5-FU (1 μ M) para os poços de controle positivo. Células sem tratamento foram utilizadas como controle negativo do experimento. A metodologia do experimento foi realizada a partir do trabalho de Pei e colaboradores (2020). Após 72 horas de tratamento, os poços foram lavados com PBS 1x e adicionado 80 μ L de uma solução de Hoechst 33342 (20 μ M) (Thermo Scientific, EUA) (Ex/Em: 350/461 nm) e iodeto de propídio (PI) (5 μ g/mL) (Thermo Scientific, EUA) (Ex/Em: 493/636 nm) em cada poço. A placa foi incubada por 20 minutos no escuro, seguido por uma centrifugação a 500 RPM por 5 minutos. As imagens e a intensidade de fluorescência foram mensuradas no leitor de placas Cytation™3 (BioTek®) e o número de células positivas para PI foi quantificado com auxílio do programa ImageJ® (SÁ *et al.*, 2015). Os dados foram analisados pela média \pm desvio padrão de 3 experimentos independentes. Para verificar a ocorrência de diferença significativa entre os grupos, realizou-se tratamentos por Análise de Variância (ANOVA), seguida pelo pós-teste de Bonferroni, com nível de significância de 95% ($p < 0,05$) no *software* GraphPad Prism® (v.8.0).

4.8 Ensaio de Migração Celular

As linhagens neoplásicas AGP-01 e ACP-03 foram semeadas em placa de 96 poços na concentração de 2×10^4 células/poço. Após atingir uma monocamada celular, foi realizado um risco no fundo do poço com auxílio de uma ponteira de 10 μ L estéril. Em seguida, os poços foram lavados com PBS 1x e adicionados meio DMEM e BTZO-1 (1 μ M). O processo migratório foi acompanhado e fotografado nos intervalos de 0, 6, 12, 18 e 24 horas. A análise

das imagens foi realizada com o programa ImageJ® (CAPPIELLO; CASCIARO; MANGONI, 2018; YUE *et al.*, 2010). Os dados foram analisados pela média \pm desvio padrão 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 *software* GraphPad Prism® (v.8.0).

4.9 Análise de ciclo celular por citometria de fluxo

As linhagens neoplásicas AGP-01 e ACP-03 foram semeadas em placa de 96 poços ($2,5 \times 10^3$ células/poço) e após atingir uma monocamada celular, células foram tratadas com BTZO-1 (1 μ M) e 5-FU (2 μ M) para controle positivo. Células sem tratamento foram utilizadas como controle negativo do experimento. Após 72 horas, cada grupo de células foi lavado com PBS 1x e centrifugado a 2000 RPM por 5 minutos a 4°C. Em seguida, o pellet de células foi ressuscitado em álcool etanol 80% e incubado a -20°C por 30 minutos. Após uma nova centrifugação a 2500 RPM por 10 minutos a 4°C, foi adicionado iodeto de propídio (PI) 5 μ g/mL (Thermo Scientific, EUA) e incubado por 30 minutos a 4°C. Uma nova centrifugação foi realizada e o pellet foi ressuscitado em PBS 1x. As análises foram realizadas no citômetro de fluxo Attune NxT (Thermo Scientific, EUA). A porcentagem de células em cada fase do ciclo celular foi avaliada através da fluorescência do Iodeto de Propídio e extraídas utilizando o *software* FlowJo® (v10.10.0). Os dados foram analisados pela média \pm desvio padrão de 3 experimentos independentes. Utilizou-se tratamentos por Análise de Variância (ANOVA), seguida pelo pós-teste de Bonferroni, com nível de significância de 95% ($p < 0,05$) no *software* GraphPad Prism® (v.8.0).

4.10 Ensaio de Ativação de Caspase-3/7

As linhagens neoplásicas AGP-01 e ACP-03 foram semeadas em placa de 96 poços ($2,5 \times 10^3$ células/poço) e após atingir uma monocamada celular, células foram tratadas com BTZO-1 (1 μ M) e 5-FU (1 μ M) para controle positivo. Células sem tratamento foram utilizadas como controle negativo do experimento. Após 72 horas, cada grupo de células foi lavado com PBS 1x e centrifugado a 2000 RPM por 5 minutos a 4°C. Em seguida, o pellet de células foi ressuscitado em uma solução contendo o reagente CellEvent™ Caspase-3/7 3 μ M (Thermo Scientific, EUA) em 5% de SBF e PBS 1x, sendo posteriormente incubado a 37°C por 30 minutos. As análises foram realizadas no citômetro de fluxo Attune NxT (Thermo Scientific, EUA) e avaliadas pelo *software* FlowJo® (v10.10.0). A análise estatística foi realizada por

Análise de Variância (ANOVA), seguida pelo pós-teste de Bonferroni, com nível de significância de 95% ($p < 0,05$) no *software* GraphPad Prism® (v.8.0).

4.11 Preparação das amostras para análise proteômica

Em uma placa de 6 poços, a linhagem celular AGP-01 foi semeada por 24 horas a uma concentração de 5×10^5 células/poço e posteriormente tratada com $1 \mu\text{M}$ do inibidor BTZO-1. Após 48 horas de tratamento, as células foram coletadas e submetidas a 3 ciclos de lavagens com tampão acetato de sódio 50mM em pH 5,2, e por fim, ressuspensas e armazenadas em -20°C por 24 horas. Em seguida, as amostras foram sonicadas por 60 minutos e armazenadas novamente em -20°C por 24 horas. Após o término do intervalo, as amostras foram submetidas a uma nova sonicação, centrifugação e coleta do sobrenadante para a quantificação total de proteínas no NanoDrop® (Thermo Scientific).

A digestão das proteínas foi iniciada a partir da adição do agente redutor ditioneitol (DTT) 10mM e incubadas no escuro por 60 minutos a 37°C em banho maria seco. Nas mesmas condições, foi adicionado iodoacetamida (IAA) 15mM por 30 minutos, seguido da digestão proteica com tripsina $20 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ por 17 horas. Os peptídeos digeridos foram dessalinizados em um dispositivo de vácuo acoplado a uma coluna de extração de fase sólida (SPE) C_{18} e concentrados no concentrador de vácuo SpeedVac. Por fim, os peptídeos foram ressuspensos em ácido fórmico (0,1%), quantificados usando o Qubit Protein Assay Kit™ (ThermoFisher) e injetados em um cromatógrafo UHPLC (Thermo Scientific) com uma coluna capilar acoplada ao espectrômetro de massas Q Exactive Plus Orbitrap® (Thermo Scientific).

4.12 Extração, digestão, análise dos dados proteômicos e enriquecimento funcional de ontologia genética (GO)

A análise dos dados gerados pela espectrometria de massas foi realizada através do protocolo de Carvalho e colaboradores (2015) para utilização do *software* ParttenLab®. Utilizou-se dados de referência de proteoma humano do banco de dados UniProt (<https://www.uniprot.org/>). A digestão com tripsina, a modificação fixa da carbamidometilação da cisteína e a modificação variável da oxidação da metionina foram incluídas na análise. Foi realizado a *Peptide Spectrum Matching* (PSM) e o *Extracte Ion Chromatogram* (XIC), obtendo uma tolerância máxima de 10 ppm. O SEPro2 foi escolhido para selecionar os resultados com maior confiança, mantendo uma Taxa de Descoberta Falsa (FDR) de 1%. A análise foi baseada no trabalho de (SOUZA *et al.*, 2025).

Considerou-se para as proteínas encontradas em ambos os grupos um valor de corte <0.05 e *fold-change* $> 1,5$ para aumento na regulação proteica, *fold-change* $< 0,5$ para diminuição da regulação proteica e *fold-change* entre 0.5 e 1.5 para proteínas que não obtiveram alterações significativas. Uma análise de enriquecimento funcional foi realizada considerando o proteoma humano do banco de dados UniProt. As proteínas mais reguladas de cada grupo e as proteínas em comum dos dois grupos foram determinadas e suas principais vias foram caracterizadas quanto à sua função molecular, processo biológico e localização subcelular através do *software R* (v.4.2.3) no qual os resultados com valor de corte $< 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4.13 Análise Estatística

Em todas as análises, os resultados foram apresentados como média \pm desvio padrão de experimentos independentes, utilizando o *software* GraphPad Prism® (v.8.0) para análises estatísticas dos ensaios experimentais, enquanto o *software R* (v.4.2.3) foi empregado para análise transcriptômica e proteômica. Para análise de significância, foram utilizados a análise de variância (ANOVA) one-way e 2way, de acordo com o número de condições avaliadas, seguido pelo pós-teste de Bonferroni, considerando um nível de significância de 95%.

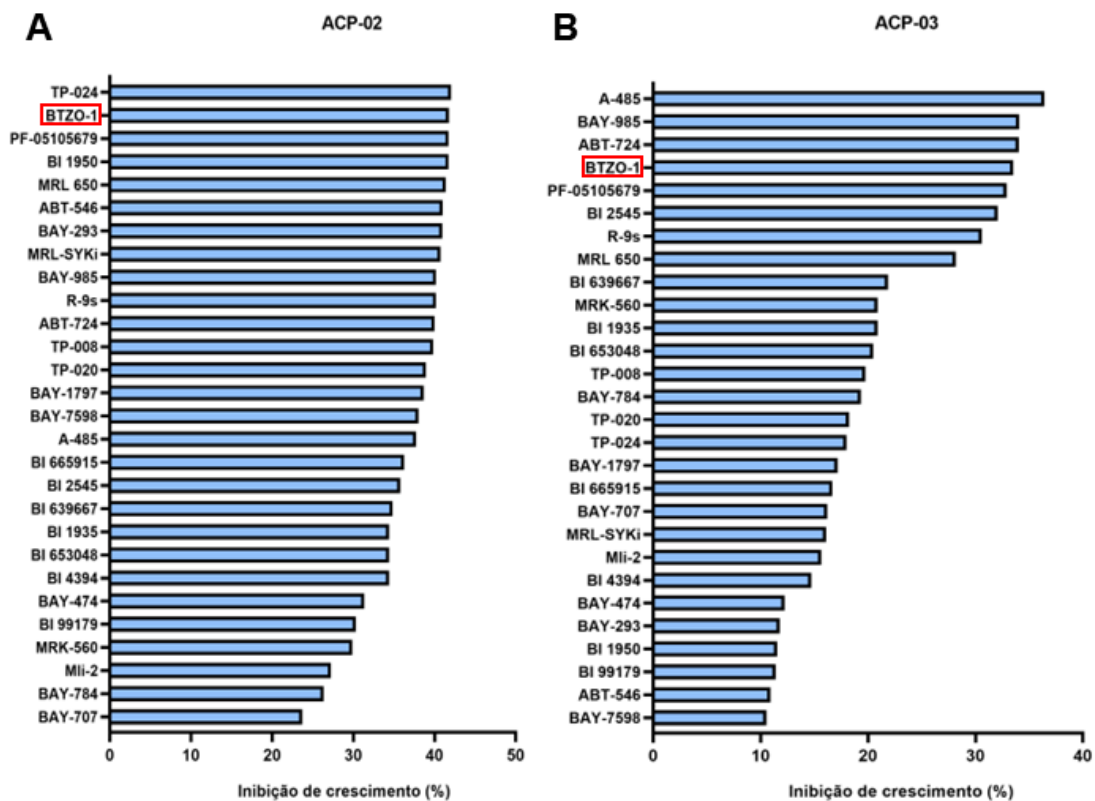
5 RESULTADOS

5.1 Triagem do painel de inibidores químicos

A triagem dos inibidores químicos foi realizada a partir da análise de Alamar Blue, estimando o percentual de inibição da biblioteca de inibidores avaliada. Todos os inibidores foram testados nas linhagens neoplásicas gástricas de tumor primário do subtipo difuso (ACP-02) e de tumor primário do subtipo intestinal (ACP-03), a fim de investigar a diferença de resposta nos dois principais subtipos de adenocarcinoma gástrico.

Na linhagem ACP-02, os inibidores TP-024, BTZO-1, PF-05105679 e BI-1950 tiveram os melhores percentuais de inibição do crescimento celular (Figura 4 – A), enquanto na linhagem ACP-03 foram os inibidores A-485, BAY-985, ABT-724 e BTZO-1 (Figura 4 – B). O inibidor BTZO-1 se destaca como o único entre os inibidores que apresentaram os maiores percentuais de inibição do crescimento celular em ambas as linhagens gástricas. Por isso, foi selecionado para as próximas análises, visando avaliar seu potencial como uma nova estratégia terapêutica para o câncer gástrico.

Figura 4 — Análise da inibição do crescimento celular das linhagens celulares ACP-02 (subtipo difuso) e ACP-03 (subtipo intestinal) após o tratamento com 28 diferentes inibidores químicos.



Fonte: Dados da pesquisa. Representação gráfica das linhagens celulares ACP-02 (A) e ACP-03 (B) tratadas com 28 inibidores após 72 horas de exposição na concentração 1 μ M.

5.2 Expressão Gênica Diferencial (DGE) do gene *MIF* *in silico*

O alvo molecular do inibidor BTZO-1 é a citocina MIF. Desse modo, prosseguiu-se com a caracterização *in silico* da expressão gênica diferencial de *MIF* no câncer gástrico a partir de dados do Atlas do Genoma do Câncer (TCGA, do inglês *The Cancer Genome Atlas Program*). Para obter uma maior confiabilidade nos dados de expressão gênica diferencial (DGE), foram utilizados os valores de FDR $< 0,05$ e um $|\logFC| \geq 0,5$ para a classificação de resultados estatisticamente significativos (LIANG *et al.*, 2020; WANG *et al.*, 2017). Os resultados mostraram que o gene *MIF* tem um aumento de expressão estatisticamente significativo no grupo de amostras de adenocarcinoma gástrico (AG) em relação ao grupo de amostras pareadas de mucosa gástrica não-neoplásica, com $|\logFC| = 0,5063$ e FDR $< 0,05$ (Tabela 6).

Quando analisado a DGE nas classificações de subtipos de CG por histologia e pela classificação da OMS (2010), apenas o subtipo intestinal e o subtipo mucinoso apresentaram um aumento estatisticamente significativo de expressão do gene *MIF* em comparação com as amostras pareadas não-neoplásicas (Tabela 6).

Tabela 6 — Comparação da expressão diferencial do gene MIF entre adenocarcinoma gástrico e diferentes subtipos de câncer em relação ao grupo de amostras pareadas de mucosa gástrica não-neoplásica.

Grupos	logFC	FDR
Adenocarcinoma gástrico vs não-neoplásica	0.5063	1,09E-02
Subtipo difuso vs não-neoplásica	0.2704	2,72E-01
Subtipo intestinal vs não-neoplásica	0.6241	4,38E-03
Subtipo Papilar vs não-neoplásica	0.5351	3,40E-01
Subtipo mal coeso de células em anel de sinete vs não-neoplásica	0.2704	2,72E-01
Subtipo mucinoso vs não-neoplásica	0.6729	3,05E-02
Subtipo Tubular vs não-neoplásica	0.3839	8,34E-02

Fonte: Dados da pesquisa.

Os valores de logFC indicam o aumento ou redução da expressão do gene *MIF*, enquanto os valores de FDR indicam a significância estatística.

Na classificação TNM para tumores gástricos, os tumores classificados como estágio I, II e IV, e as subclassificações T3, N0 e M1 mostraram um aumento na expressão do gene *MIF* em comparação ao grupo de amostras pareadas não-neoplásicas (Tabela 7). Entretanto, não houve diferença estatisticamente significativa entre os estágios e entre suas subclassificações.

Tabela 7 — Comparação da expressão diferencial do gene *MIF* entre o grupo de amostras pareadas de mucosa gástrica não-neoplásica e as subcategorias da classificação TNM para tumores gástricos.

Localidade e tamanho do tumor (T)	LogFC	FDR
T1 vs não-neoplásica	0.6324	5,05E-02
T2 vs não-neoplásica	0.4523	3,64E-02
T3 vs não-neoplásica	0.5723	3,36E-03
T4 vs não-neoplásica	0.4112	7,11E-02
T1 vs T2	0.1579	7,43E-01
T1 vs T3	0.0276	9,56E-01
T1 vs T4	0.1761	7,01E-01
T2 vs T3	-0.088	8,55E-01
T2 vs T4	0.0834	7,93E-01
T3 vs T4	0.1581	4,47E-01
Comprometimento dos linfonodos (N)		
N0 vs não-neoplásica	0.5684	8,98E-03
N1 vs não-neoplásica	0.4944	3,94E-02
N2 vs não-neoplásica	0.4159	2,52E-02
N3 vs não-neoplásica	0.4674	3,57E-02
N0 vs N1	0.0934	9,89E-01
N0 vs N2	0.1780	8,28E-01
N0 vs N3	0.1423	8,12E-01
N1 vs N2	0.0825	1,00E+01
N1 vs N3	0.0462	9,98E-01
N2 vs N3	-0.036	1,00E+01
Metástase à distância (M)		
M0 vs não-neoplásica	0.4969	1,19E-02
M1 vs não-neoplásica	0.7992	6,87E-03
M0 vs M1	0.2666	1,00E+00
Estágio do tumor		
Estágio 1 vs não-neoplásica	0.5273	4,10E-02
Estágio 2 vs não-neoplásica	0.5662	4,99E-03
Estágio 3 vs não-neoplásica	0.4548	2,53E-02
Estágio 4 vs não-neoplásica	0.5464	4,22E-02
Estágio 1 vs Estágio 2	-0.046	7,85E-01
Estágio 1 vs Estágio 3	0.0762	8,30E-01
Estágio 1 vs Estágio 4	-0.021	9,89E-01
Estágio 2 vs Estágio 3	0.1327	6,15E-01
Estágio 2 vs Estágio 4	0.0262	9,74E-01
Estágio 3 vs Estágio 4	-0.087	9,16E-01

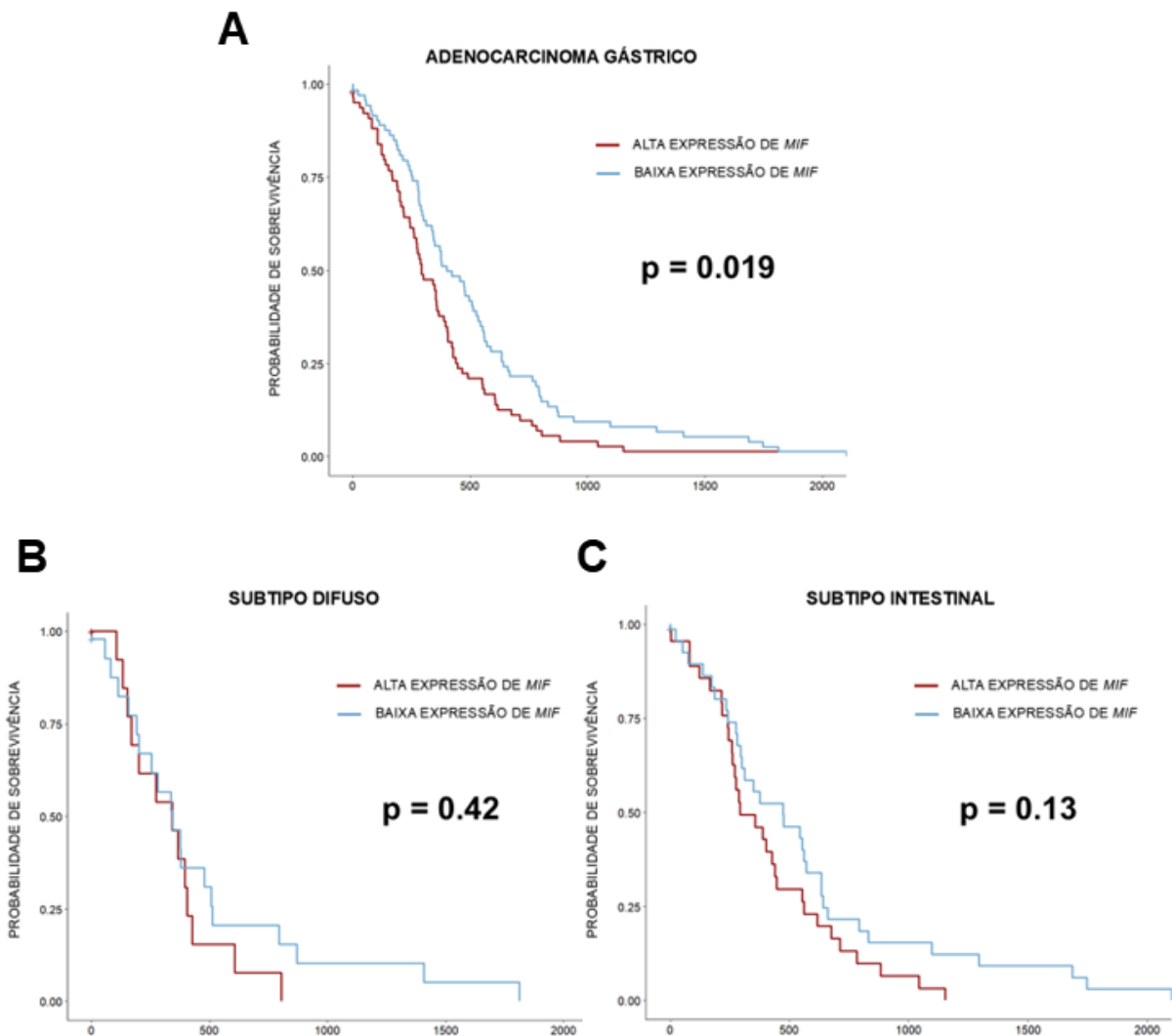
Fonte: Dados da pesquisa.

Os valores de logFC indicam o aumento ou redução da expressão do gene *MIF*, enquanto os valores de FDR indicam a significância estatística.

5.3 Análise da sobrevida de pacientes com alta expressão do gene *MIF*

Em seguida, para verificar a relação da expressão do gene *MIF* com a sobrevida dos pacientes com adenocarcinoma gástrico, foi realizada a análise da taxa de sobrevida dos pacientes com alta e baixa expressão de *MIF* com dados do TCGA. O aumento da expressão do gene *MIF* impactou significativamente na sobrevida de pacientes diagnosticados com adenocarcinoma gástrico ($p = 0,019$) (Figura 5 — A), mostrando que pacientes com alta expressão desse alvo tem menor expectativa de vida. Entretanto, por meio de análises individuais de pacientes portadores dos subtipos difuso e intestinal em grupos separados, não foi verificada uma correlação entre o aumento de expressão do gene e a sobrevida dos pacientes (Figura 5 — B,C).

Figura 5 — Análise de sobrevida entre alta e baixa expressão de MIF nos dados do TCGA.



Fonte: Dados da pesquisa. Representação gráfica da variação da sobrevida entre amostras com alta e baixa expressão do gene *MIF* classificadas em adenocarcinoma gástrico (A), subtipo difuso (B) e subtipo intestinal (C).

5.4 Determinação da CI_{50} do inibidor BTZO-1

Após a caracterização de MIF no banco de dados TCGA, prosseguiu-se com a caracterização do MIF em linhagens gástricas tumorais. Devido aos resultados encontrados na análise de bioinformática, adicionou-se a linhagem neoplásica metastática de subtipo intestinal, AGP-01. Dessa forma, determinou-se a concentração inibitória média (CI_{50}) do inibidor BTZO-1 nas linhagens ACP-02, ACP-03 e AGP-01. O inibidor obteve uma maior potência inibitória na linhagem AGP-01 (metastática subtipo intestinal) (1,1 μ M), seguida pelas linhagens ACP-02 (tumor primário subtipo difuso) (1,9 μ M) e ACP-03 (tumor primário subtipo intestinal) (3,1 μ M) (Tabela 8).

Tabela 8 — Determinação da CI_{50} do inibidor BTZO-1 e do fármaco 5-FU nas linhagens gástricas AGP-01, ACP-02 e ACP-03.

Linhagem Celular	CI_{50} BTZO-1 [μ M] (CI 95%)	CI_{50} 5-FU [μ M] (CI 95%)
AGP-01	1,116 (0,895 – 1,285)	0,323 (0,214 – 0,487)
ACP-02	1,992 (1,265 – 3,411)	0,203 (0,103 – 0,402)
ACP-03	3,132 (1,518 – 6,417)	0,271 (0,151 – 0,486)

Fonte: Dados da pesquisa.

Tabela com os valores da concentração inibitória média (CI_{50}) e seu intervalo de confiança, do inibidor de MIF, BTZO-1, e do fármaco 5-fluorouracil (5-FU) após 72 horas de tratamento nas linhagens neoplásicas AGP-01, ACP-02 e ACP-03.

5.5 Análise da expressão de mRNA do gene *MIF* nas linhagens celulares gástricas antes e após o tratamento com o inibidor BTZO-1

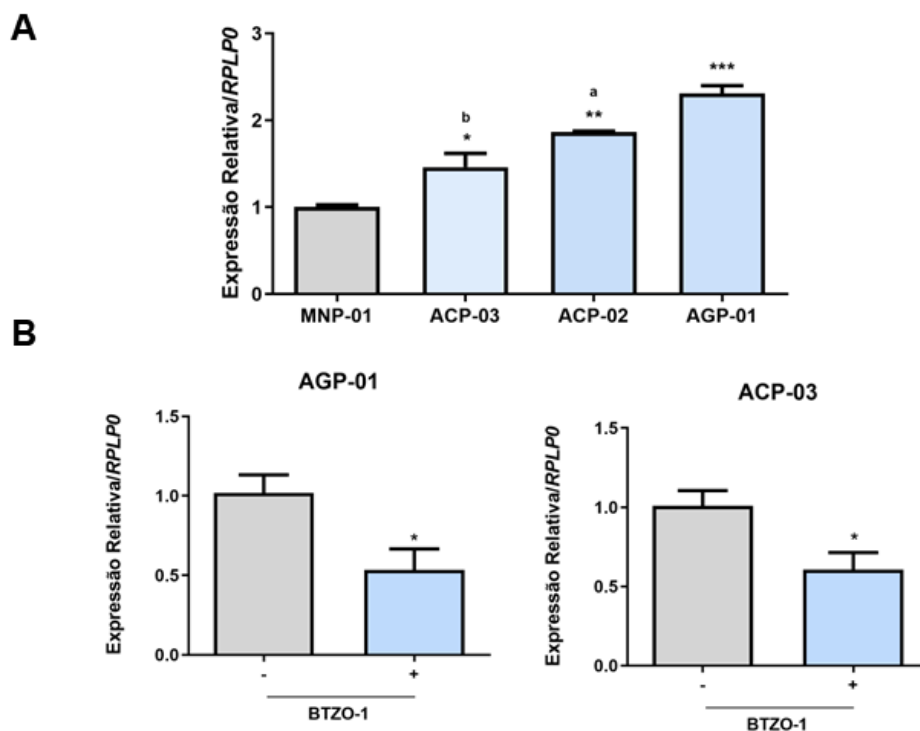
Por conseguinte, avaliou-se o perfil de expressão de mRNA do *MIF* nas linhagens ACP-02, ACP-03, AGP-01 e na linhagem de mucosa gástrica não-neoplásica, MNP-01. Todas as linhagens tumorais gástricas mostraram um aumento significativo na expressão do mRNA do gene *MIF* em comparação a linhagem não neoplásica (Figura 6 – A). A linhagem metastática de subtipo intestinal, AGP-01, foi a linhagem com maior aumento na expressão gênica do *MIF* ($p < 0,001$), seguida respectivamente pela ACP-02 ($p < 0,05$) e ACP-03 ($p < 0,01$).

A partir desses resultados, nota-se os resultados de expressão gênica obtidos no TCGA e os resultados nas linhagens gástricas foram semelhantes, demonstrando que o estágio de metástase tumoral está relacionado com uma maior expressão gênica de MIF. Vale ressaltar que a linhagem AGP-01, representativa de adenocarcinomas gástricos metastáticos do subtipo intestinal, além de ter uma maior expressão de mRNA de *MIF*, mostrou-se também uma maior

sensibilidade ao inibidor BTZO-1. Sua sensibilidade foi quase três vezes maior do que a observada na linhagem originária de tumor primário de mesmo subtipo (ACP-03). Dessa forma, após verificar a relevância do processo metastático nos dados *in silico* e *in vitro* aumento da expressão de *MIF* no CG, as linhagens AGP-01 e ACP-03 foram selecionadas para as próximas etapas do projeto, com o objetivo de compreender as particularidades celulares e moleculares do inibidor, assim como do alvo molecular entre esses dois diferentes estágios de desenvolvimento do câncer gástrico.

Por conseguinte, avaliou-se resposta das linhagens AGP-01 e ACP-03, a nível gênico, após 24 horas de tratamento com o inibidor BTZO-1. As duas linhagens apresentaram uma redução significativa na expressão do *MIF* ($p < 0,01$). Vale destacar que, embora a linhagem ACP-03 tenha exibido menor expressão basal de *MIF* e maior resistência ao inibidor, o nível de redução da expressão gênica foi semelhante ao observado na linhagem AGP-01 (Figura 6 – B).

Figura 6 — Expressão de mRNA do gene *MIF* antes e após o tratamento com o inibidor BTZO-1 nas linhagens gástricas utilizadas no estudo.



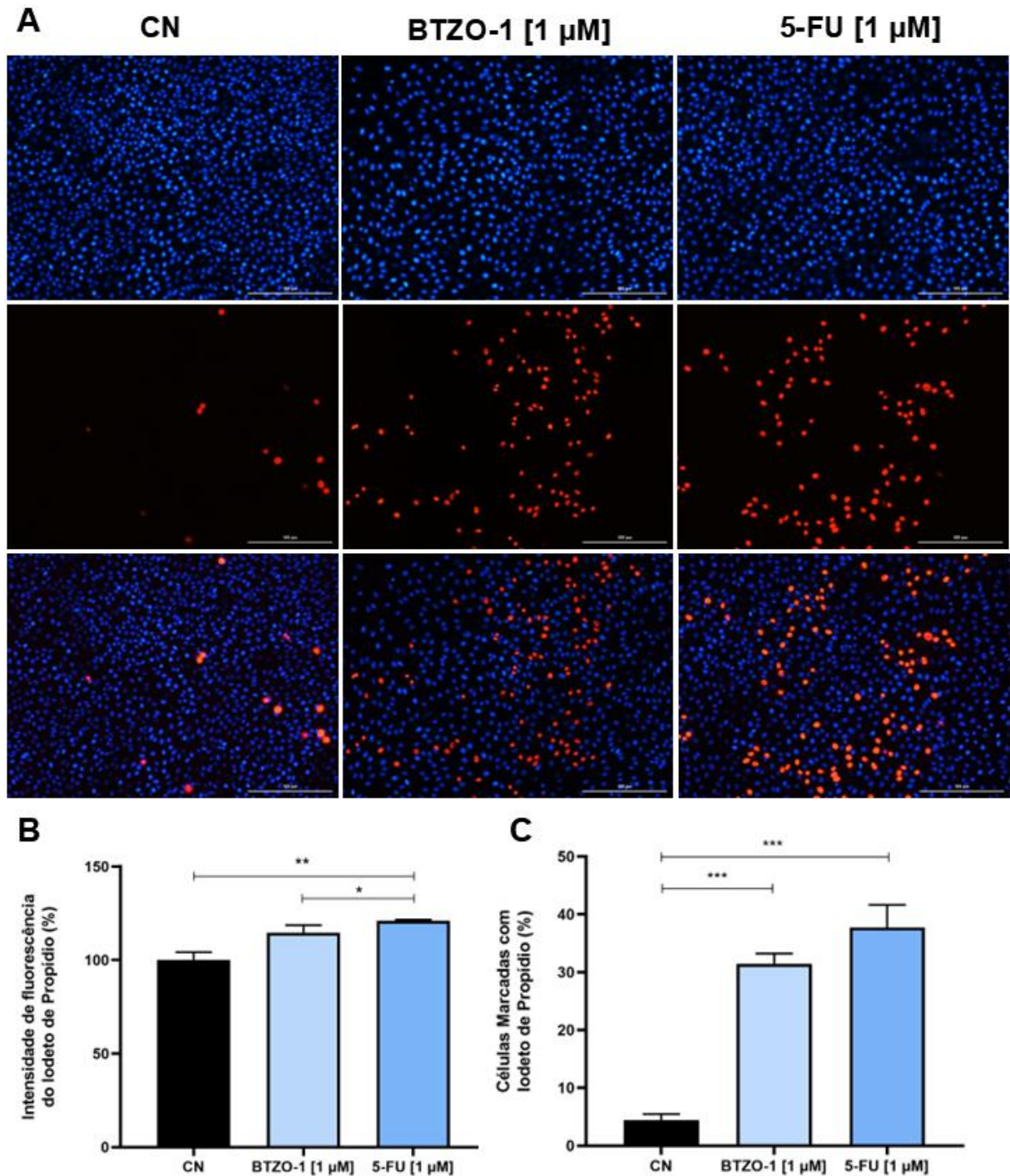
Fonte: Dados da pesquisa. **(A)** Representação gráfica da expressão de mRNA de *MIF* nas linhagens gástricas ACP-02, ACP-03, AGP-01 e MNP-01. As barras representam a média \pm desvio padrão da média da triplicata. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ quando comparadas a linhagem gástrica não-neoplásica MNP-01. a,b representam $p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente, quando comparadas a linhagem AGP-01. **(B)** Representação gráfica da expressão de mRNA de *MIF* nas linhagens AGP-01 e ACP-03 após o tratamento (+) de 24 horas com o inibidor BTZO-1 em relação ao grupo controle (-). As barras representam a média \pm desvio padrão da média da triplicata. * $p < 0,05$ quando comparadas com CN. A comparação de ambos os gráficos foi realizada por 1way ANOVA seguida por teste de Bonferroni, com nível de significância de 95% ($p < 0,05$).

5.5 Avaliação da integridade da membrana celular

Para análise e quantificação de células com dano na integridade da membrana celular após o tratamento com BTZO-1, foi utilizada a marcação com o fluoróforo não permeável em células viáveis, iodeto de propídio (IP), e o marcador de DNA, HOECHST-33342. Como controle positivo, utilizou-se o fármaco 5-FU.

A linhagem AGP-01 apresentou um aumento significativo na detecção da fluorescência do IP ($p < 0,05$) e na quantificação de células marcadas com IP ($p < 0,001$) após o tratamento com BTZO-1, sendo esse aumento no percentual de células com dano na membrana celular semelhante ao observado no grupo de tratamento com o fármaco 5-FU (Figura 7). Por outro lado, na linhagem ACP-03, não foram detectadas diferenças estatisticamente significativas entre o grupo tratado com BTZO-1 e o grupo controle (Figura 8).

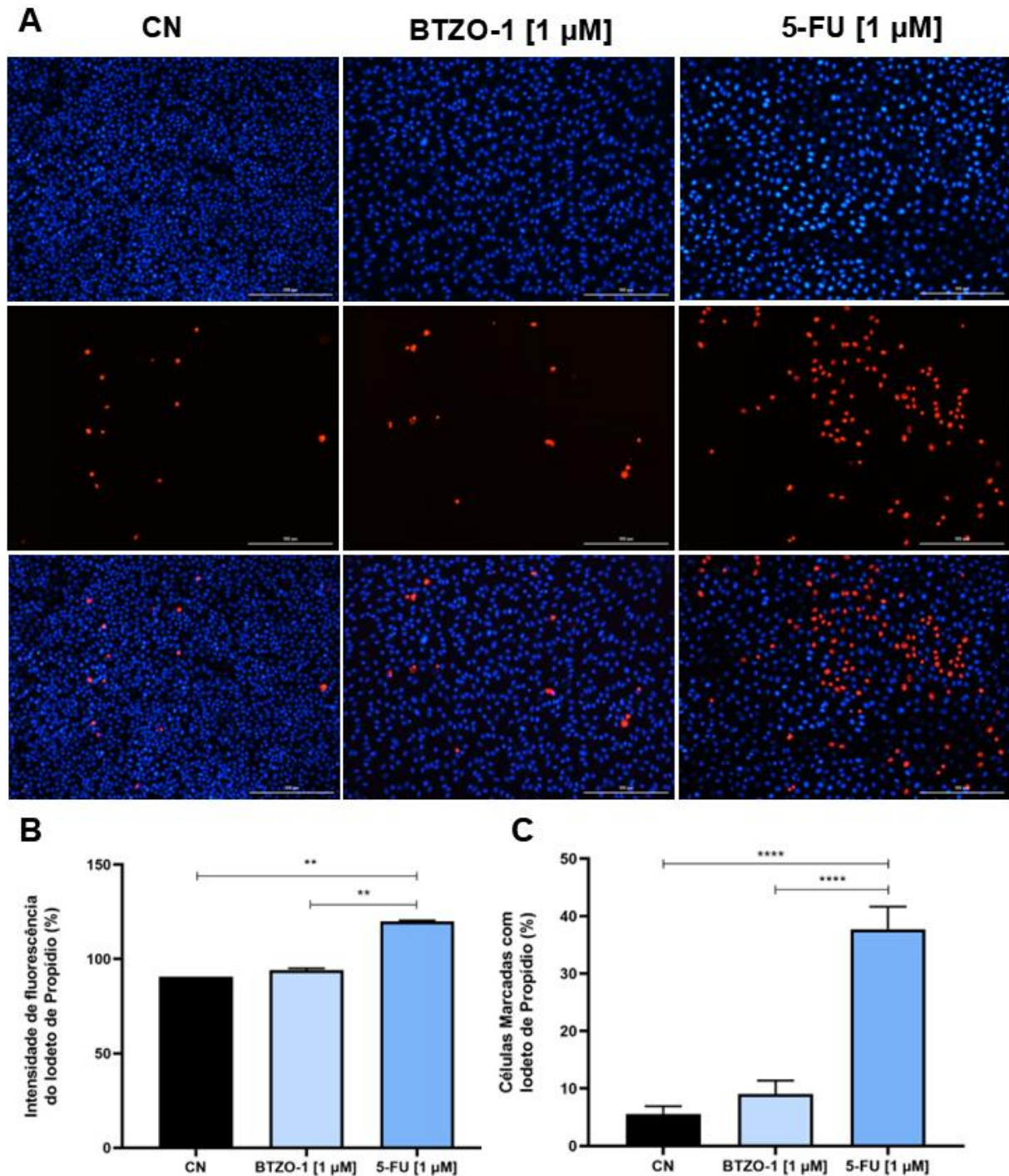
Figura 7 — Análise do efeito do inibidor BTZO-1 na integridade da membrana das células AGP-01.



Fonte: Dados da pesquisa.

(A) Imagem de marcação com HOECHST 33342 (azul), iodeto de propídio (vermelho) e dupla-marcação em células de AGP-01 sem tratamento (CN), tratadas com 1 μ M de BTZO-1 e com 1 μ M de 5-fluorouracil (5-FU) após 72 horas de tratamento. (B) Representação gráfica da intensidade de fluorescência do iodeto de propídio e (C) representação gráfica da quantificação de células marcadas com iodeto de propídio. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ quando comparado com o controle negativo. As análises foram realizadas por 1way ANOVA seguida por teste de Bonferroni, com nível de significância de 95% ($p < 0,05$).

Figura 8 — Análise do efeito do inibidor BTZO-1 na integridade da membrana das células ACP-03.



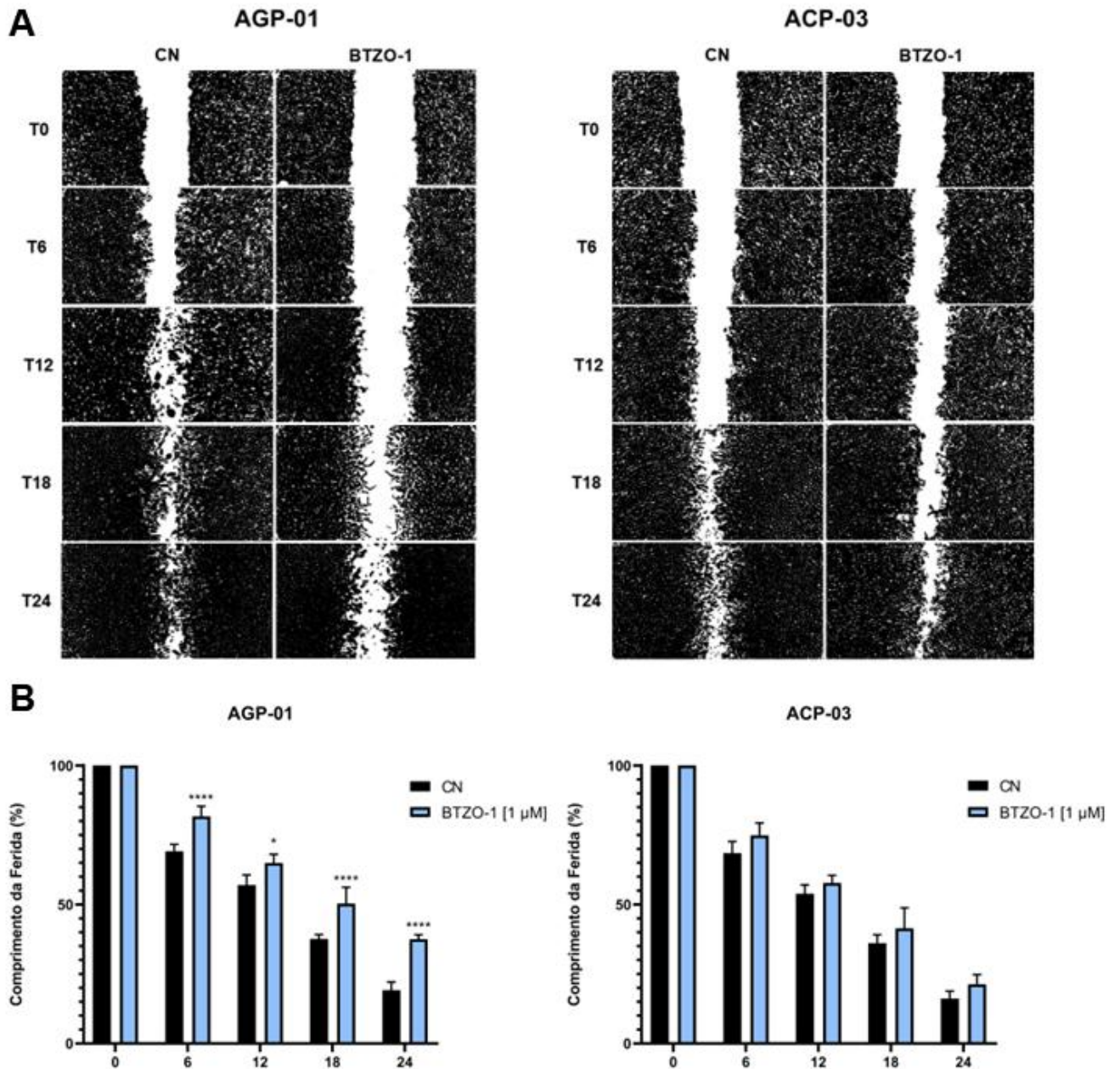
Fonte: Dados da pesquisa.

(A) Imagem de marcação com HOECHST 33342 (azul), iodeto de propídio (vermelho) e dupla-marcação em células de ACP-03 sem tratamento (CN), tratadas com 1 μ M de BTZO-1 e com 1 μ M de 5-fluorouracil (5-FU) após 72 horas de tratamento. (B) Representação gráfica da intensidade de fluorescência do iodeto de propídio e (C) representação gráfica da quantificação de células marcadas com iodeto de propídio. ** $p < 0,01$ e **** $p < 0,0001$ quando comparado com o controle negativo. As análises foram realizadas por 1way ANOVA seguida por teste de Bonferroni, com nível de significância de 95% ($p < 0,05$).

5.6 Ensaio de Migração Celular

A fim de verificar possíveis alterações no perfil migratório das linhagens AGP-01 e ACP-03 após o tratamento com o inibidor BTZO-1, analisou-se a migração celular em cinco diferentes tempos: 0, 6, 12, 18 e 24 horas. A partir de 6 horas de tratamento, a linhagem metastática AGP-01 apresentou uma redução estatisticamente significativa em seu perfil migratório em comparação ao grupo controle, efeito que se manteve até o último tempo analisado - 24 horas. Por outro lado, embora a linhagem ACP-03 tenha exibido uma redução na migração em relação ao controle, essa diferença não atingiu significância estatística (Figura 9).

Figura 9 — Inibição da citocina MIF influencia o perfil migratório das linhagens neoplásicas gástricas AGP-01 e ACP-03.



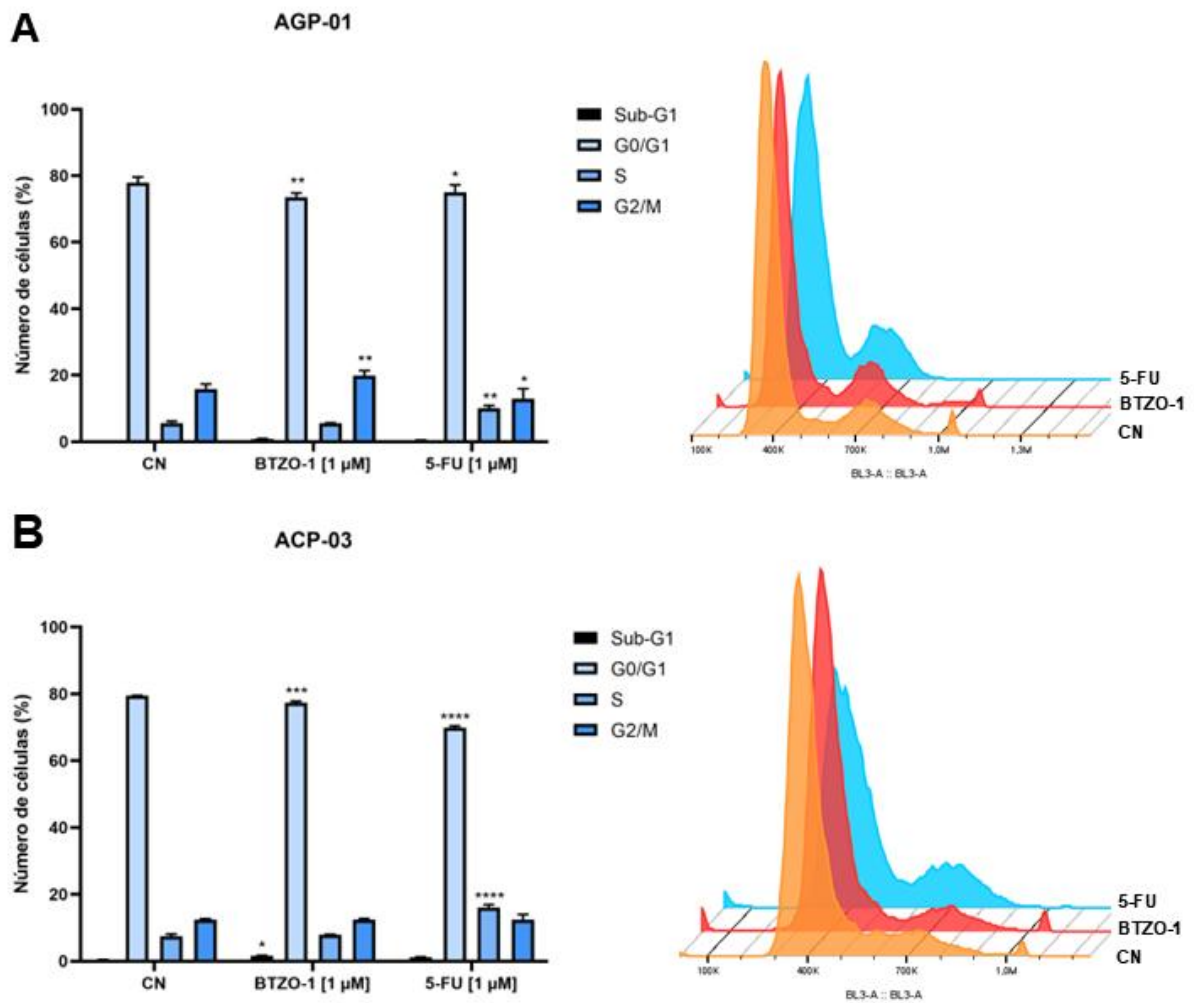
Fonte: Dados da pesquisa.

(A) Imagens nos tempos 0, 6, 12, 18 e 24 horas após exposição ao inibidor BTZO-1 mostrando o processo de migração celular caracterizado pelo fechamento da área “arranhada” nas linhagens AGP-01 e ACP-03. (B) Representação gráfica da migração celular nas linhagens AGP-01 e ACP-03. O comprimento do arranhão nos diferentes tempos foi estimado através programa ImageJ®. As barras representam a média ± desvio padrão da média de 3 experimentos independentes. * $p < 0,05$ e **** $p < 0,0001$ quando comparado com o respectivo tempo no controle negativo. As análises foram realizadas por 2way ANOVA seguida de teste de Bonferroni, com nível de significância de 95% ($p < 0,05$).

5.7 Avaliação de alterações no ciclo celular

Para avaliar os efeitos do inibidor BTZO-1 na progressão do ciclo celular, realizou-se uma análise por citometria de fluxo nas linhagens AGP-01 e ACP-03 após 72 horas de tratamento. Na linhagem AGP-01, o tratamento com o inibidor resultou em um acúmulo de células diploides, ou seja, nas fases G2/M do ciclo celular ($p < 0,01$) (Figura 10 - A). Em relação a linhagem ACP-03, o inibidor não apresentou alterações significativas no ciclo celular (Figura 10 - B).

Figura 10 — Análise do ciclo celular das células neoplásicas AGP-01 e ACP-03 após o tratamento com o inibidor BTZO-1 e o fármaco 5-FU.



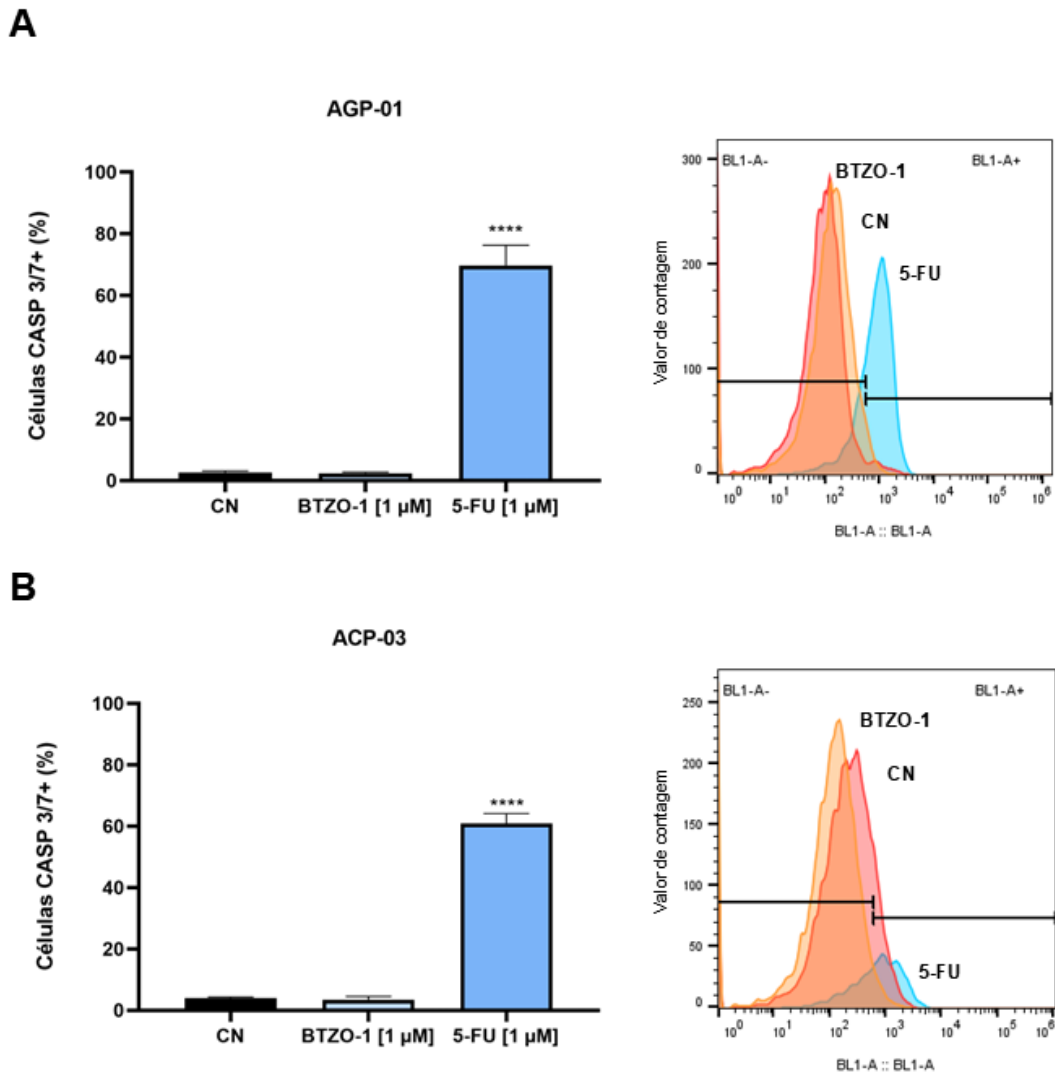
Fonte: Dados da pesquisa.

Representação gráfica e histograma da distribuição de células das linhagens AGP-01 (A) e ACP-03 (B) nas fases do ciclo celular após o tratamento com 1 µM de BTZO-1, 1 µM de 5-fluorouracil (5-FU) e sem tratamento (grupo controle - CN). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e **** $p < 0,0001$ quando comparadas ao grupo controle. As análises foram realizadas por 2way ANOVA seguida de teste de Bonferroni, com nível de significância de 95% ($p < 0,05$).

5.8 Avaliação da ativação das Caspases 3 e 7

Para avaliar a indução de apoptose em células tratadas com BTZO-1, realizou-se uma análise de citometria de fluxo nas linhagens AGP-01 e ACP-03 para a determinação do nível de ativação das caspases 3 e 7, proteases essenciais na via apoptótica em resposta a sinais de morte celular. Como controle positivo, foi utilizado o fármaco 5-FU. O tratamento com 5-FU induziu um aumento significativo na ativação das enzimas, enquanto a inibição de MIF não apresentou efeito significativo (Figura 11), o que sugere que outra via de morte celular pode estar sendo ativada com a inibição de MIF.

Figura 11 — Ativação de Caspase-3/7 em células AGP-01 e ACP-03 após tratamento com BTZO-1.



Fonte: Dados da pesquisa.

Representação gráfica da porcentagem de células positivas para caspase-3/7 ativada (CASP 3/7+) nas linhagens de câncer gástrico AGP-01 (**A**) e ACP-03 (**B**) após tratamento com 5-FU ou BTZO-1. **** $p < 0,0001$ quando comparado com o controle negativo (CN). As análises foram realizadas por 1way ANOVA seguida de teste de Bonferroni, com nível de significância de 95% ($p < 0,05$). Os histogramas de citometria de fluxo mostram a fluorescência associada à ativação da caspase-3/7, indicando apoptose celular.

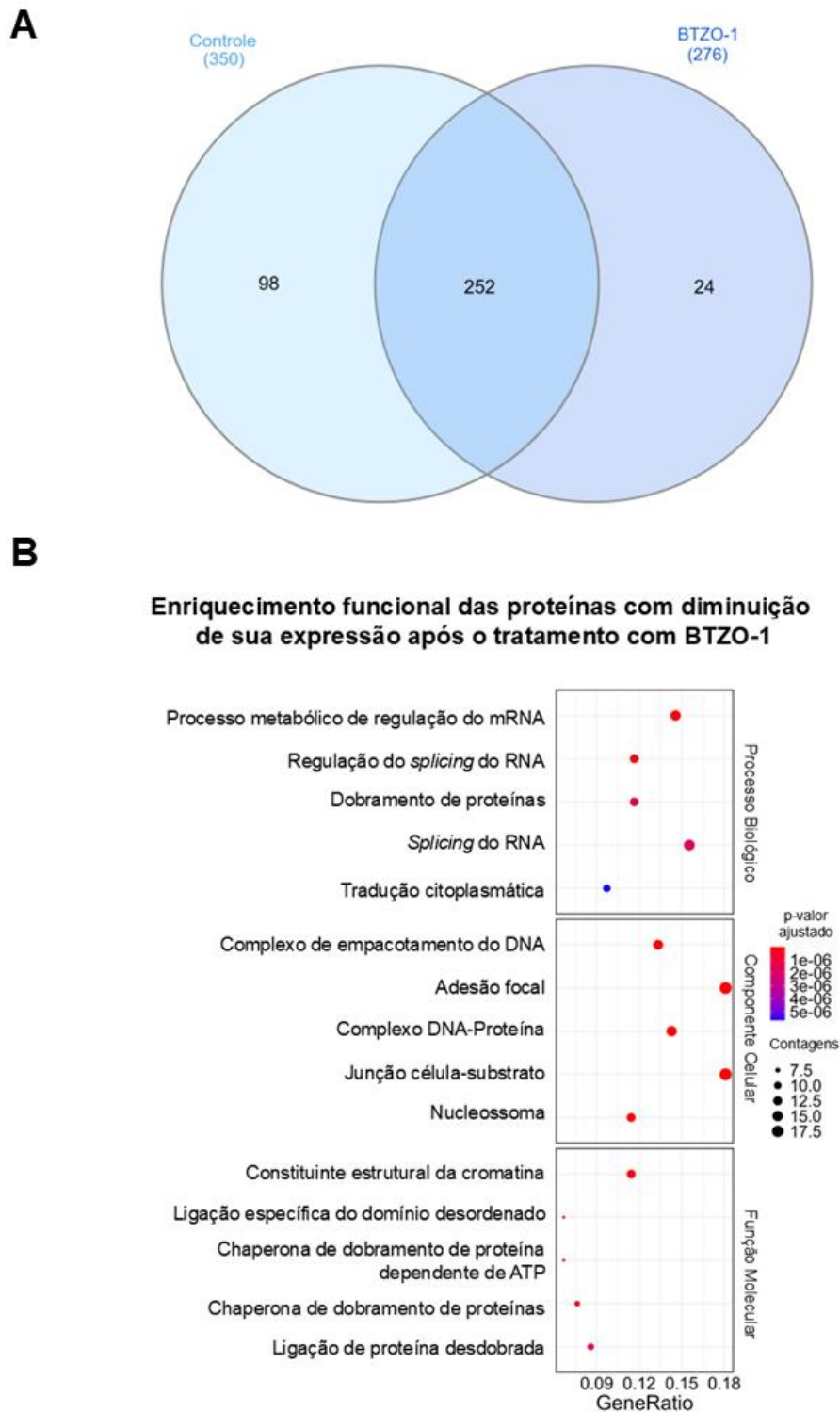
5.9 Análise do perfil proteômico

As proteínas são importantes elementos reguladores dos processos biológicos que, em resposta ao estresse, podem ter sua expressão afetada. Uma análise proteômica pode refletir essas alterações e prever resultados importantes sobre a resposta celular a uma condição específica. Desse modo, realizou-se uma espectrometria de massas de alto rendimento das células metastáticas AGP-01 com e sem tratamento com BTZO-1.

Foram identificadas 626 proteínas, sendo 350 no grupo controle, composto de células de AGP-01 sem tratamento, e 276 proteínas no grupo de células AGP-01 tratadas com BTZO-1 (Figura 12 — A). 98 proteínas foram identificadas como exclusivas do grupo controle e 24 proteínas no grupo tratado. Um total de 252 proteínas foi identificado em ambos os grupos e classificado com base no aumento ou na diminuição de sua expressão.

Na análise das proteínas com expressão reduzida após o tratamento com BTZO-1, os principais componentes celulares afetados estão relacionados à migração e diferencial celular, incluindo adesão focal e junção célula-substrato, além do empacotamento do DNA. Em relação aos processos biológicos impactados pelo tratamento, os principais foram o processo metabólico de regulação do mRNA, *splicing* do RNA e sua regulação, e o dobramento de proteínas. A avaliação da função molecular dessas proteínas revelou que elas atuam como constituintes estruturais da cromatina, chaperonas envolvidas no dobramento de proteínas e proteínas com função de ligação à proteína desdobrada (Figura 12 — B).

Figura 12 — Perfil proteômico de células AGP-01 tratadas com BTZO-1.



Fonte: Dados da pesquisa.

(A) Representação em diagrama de Venn mostrando as proteínas em comum e exclusivas do grupo controle e do grupo tratado com BTZO-1. (B) Análise de enriquecimento funcional de proteínas com expressão reduzida entre o grupo controle e o grupo tratado, enfatizando o processo biológico, o componente celular e a função molecular.

6 DISCUSSÃO

Após a avaliação do potencial citotóxico de uma biblioteca de 28 inibidores em linhagens tumorais gástricas, identificou-se o fator inibitório da migração de macrófagos (MIF) como um promissor alvo terapêutico para o câncer gástrico, além de constatar a potencialidade do inibidor específico de MIF, BTZO-1, na inibição celular de células derivadas dos dois principais subtipos de câncer gástrico: subtipos difuso e intestinal. O MIF é uma molécula multifuncional que exerce atividade em diferentes vias de sinalização celular. Ele está localizado em compartimentos extracelulares e intracelulares, atuando de forma autócrina e parácrina por meio de quatro diferentes receptores: CD74/CD44, CXCR2, CXCR4 e CXCR7. Conhecido como um importante mediador pró-inflamatório, sua presença estimula a expressão de TNF- α , IL-1 e IL-6, além de estimular células supressoras derivadas de mieloides (MDSCs) e os macrófagos associados a tumores (TAMs), permitindo que as células tumorais escapem da imunidade antitumoral (NOE; MITCHELL, 2020; SUMAIYA *et al.*, 2022).

O inibidor químico BTZO-1 é uma molécula pequena específica para MIF que possui 240,28 g/mol de peso molecular, desenvolvida pela companhia farmacêutica Takeda e doada para o Programa de Doação de Sondas Químicas do Consórcio de Genômica Estrutural. A princípio, a molécula BTZO-1 foi descrita como um importante agente protetor de cardiomiócitos, devido a sua atividade ativadora da expressão de elementos de resposta oxidante (ARE) e a supressão da apoptose induzida por estresse oxidativo em cardiomiócitos (KIMURA *et al.*, 2010). No entanto, devido à ampla diversidade de atividades biológicas do MIF, alvo do inibidor BTZO-1, e seu papel regulador em diversas vias de sinalização celular, como a MAPK/PI3K/Akt, seu estudo tornou-se fundamental para compreender sua influência na promoção do desenvolvimento tumoral (NOBRE *et al.*, 2017).

Observou-se que a expressão de MIF é alterada em diversos tipos de neoplasias, incluindo neuroblastoma. (GARCIA-GERIQUE *et al.*, 2022), carcinoma de células escamosas do esôfago (REN *et al.*, 2005), carcinoma de células escamosas cervical (CHENG *et al.*, 2011), hepatocarcinoma (REN *et al.*, 2003), câncer de pulmão de células não pequenas (WHITE *et al.*, 2003), câncer pancreático (TAN *et al.*, 2014), câncer de mama (BANDO *et al.*, 2002; XU *et al.*, 2008), câncer no ovário (KROCKENBERGER *et al.*, 2012) e câncer gástrico, com destaque para a avaliação dos níveis de expressão do MIF no soro sanguíneo de pacientes com câncer gástrico (HE *et al.*, 2006; SHIMWELL *et al.*, 2012; ZHENG, 2012). Adicionalmente, têm sido investigado o aumento na expressão gênica do *MIF* no câncer gástrico e sua relação com

polimorfismos na região promotora do gene, os quais podem estar associados à progressão da inflamação da mucosa gástrica (ARISAWA *et al.*, 2008).

A correlação da expressão de MIF com a progressão do tumor ainda é controversa. No entanto, o estudo desenvolvido indicou que o aumento da expressão gênica de *MIF* foi identificado no processo de metástase tumoral, em dados *in silico* e *in vitro*, principalmente no subtipo intestinal. Outros trabalhos, como He e colaboradores (2015), demonstraram que o aumento da expressão gênica e proteica de MIF foi associado a estágios avançados do tumor, metástase nos linfonodos regionais e pouca diferenciação. No câncer de mama, o aumento da expressão de MIF foi associado com o subtipo HER-2 positivo (CHOI; JUNG; KOO, 2012). As variações observadas nos estudos mencionados acima podem estar relacionadas a diferentes metodologias, incluindo o tipo de análise realizada (gênica ou proteica) e a origem do material biológico (soro sanguíneo ou célula gástrica). Vale ressaltar que além das variações metodológicas, existe variabilidade nas características clínicas, moleculares e morfológicas de tumores de pacientes com localização geográfica diferente. Esse fenômeno acontece devido às diferenças étnicas e genéticas que influenciam na epidemiologia e na variação dos fatores de risco para câncer gástrico entre diferentes áreas geográficas (LÓPEZ *et al.*, 2023).

Diversos inibidores de MIF já foram investigados em modelos *in vitro* de diferentes tipos de câncer. O inibidor ISO-1, por exemplo, foi testado em células tumorais de carcinoma pancreático em concentrações de 400 e 800 μ M do inibidor (CHENG *et al.*, 2020). O CPSI-1306 foi avaliado em células de câncer de mama triplo negativo (TNBC), com concentrações de 0,5 e 2 μ M (CHARAN *et al.*, 2020), enquanto o 4-IPP foi testado em células de osteossarcoma em concentrações entre 5 e 40 μ M (ZHENG *et al.*, 2022). No presente estudo, a maior concentração inibitória média (CI_{50}) apresentada pelo inibidor BTZO-1 foi de 3,1 μ M, sendo essa concentração menor do que as observadas para outros inibidores de MIF nos estudos anteriores, mostrando que o inibidor BTZO-1 apresenta um melhor desempenho na inibição de MIF em células tumorais, necessitando de uma menor concentração para garantir uma atividade inibitória satisfatória. Entretanto, sabe-se que a diferença nos tipos de neoplasia pode influenciar na resposta aos inibidores, sendo assim, necessários estudos com o inibidor BTZO-1 em outras linhagens tumorais para confirmar seu desempenho em relação aos demais inibidores.

Nesse estudo, os dados obtidos sugerem que o MIF desempenha um papel fundamental no crescimento tumoral e na metástase, a partir do estudo da resposta das linhagens tumorais gástricas de tumor primário e metastático ao inibidor BTZO-1. A linhagem AGP-01, originária de células de tumor gástrico metastático de subtipo intestinal, apresentou maior expressão

gênica do *MIF* em comparação às linhagens originárias de tumor primário e de células da mucosa gástrica não neoplásica. Além disso, a AGP-01 demonstrou uma resposta inibitória aproximadamente três vezes maior ao BTZO-1 do que a linhagem derivada de tumor primário de mesmo subtipo (ACP-03). Durante o processo de desenvolvimento tumoral, diversas vias sofrem alterações, a exemplo das vias de crescimento e proliferação celular, vias de sobrevivência e resistência à apoptose, vias relacionadas à angiogênese e metástase e vias relacionadas ao microambiente tumoral (FEITELSON *et al.*, 2015). Estudos apontam que o aumento da expressão de MIF, uma característica observada na linhagem metastática AGP-01, está correlacionado também ao aumento do fator induzível por hipóxia 1 (HIF-1), a redução na expressão de E-caderina e o aumento na expressão de metaloproteinases de matriz (MMPs), fatores esses que favorecem a disseminação tumoral pela corrente sanguínea e sua invasão em outros órgãos, ou seja, favorecem o processo de desenvolvimento metastático (BABU; CHETAL; KUMAR, 2012).

No presente estudo, a inibição de MIF pelo inibidor BTZO-1 resultou em um comprometimento da integridade da membrana celular e a inibição da migração celular de células neoplásicas, sendo estatisticamente significativa na linhagem metastática AGP-01. Estudos relatam que a ligação do MIF ao seu receptor CD74 leva à ativação da via PI3K/AKT/mTOR, uma das principais vias de sinalização intracelular. Essa ativação ocorre após o receptor CD74 formar um complexo com o CD44 e fosforilar PI3K e AKT. Além disso, o eixo MIF/CD74 também ativa o fator nuclear kappa B (NF- κ B), um fator de transcrição crucial para a inflamação, sobrevivência celular e progressão tumoral (JANKAUSKAS *et al.*, 2019). Zheng e colaboradores (2022) identificaram uma inibição direta da via PI3K/AKT/NF- κ B após o tratamento de osteossarcomas com o inibidor de MIF, 4-IPP. Essa regulação é feita a nível transcricional e a ativação de NF- κ B via MIF está relacionada a ativação de genes antiapoptóticos, como *Bcl-2* e *Bcl-xL*, e na indução da migração pelo aumento da expressão de metaloproteinases da matriz (MMPs). Em Wang e colaboradores (2019), o silenciamento de MIF reduziu a proliferação e migração celular, assim como a diminuição da expressão das metaloproteinases MMP2 e MMP9, proteínas relacionadas com a migração e invasão celular, indicando, assim, que MMP2 e MMP9 são alvos a jusante de MIF. Desse modo, o comprometimento da integridade da membrana celular e a diminuição significativa da migração celular após a inibição de MIF pelo BTZO-1 pode estar relacionada a uma complexa cascata de sinalização intracelular e análises detalhadas precisam ser feitas para a confirmação das vias envolvidas.

Ademais, o presente trabalho mostrou que a inibição de MIF interrompeu a progressão do ciclo celular, gerando um acúmulo de células na fase G2/M. Um resultado semelhante foi encontrado por Kindt e colaboradores (2013) após a inibição de MIF com a molécula 4-IPP em células de carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço. Esse acúmulo de células na fase G2/M pode estar relacionado ao envolvimento de MIF com proteínas reguladoras do ciclo celular. Sabe-se que uma interação crucial do MIF na progressão do ciclo celular ocorre por meio de sua ligação física à proteína JAB1, conhecida também como subunidade 5 do sinalossomo COP9 (CSN5). JAB1 é uma proteína responsável pela regulação do processo de desneddilação das proteínas Cullin do complexo SCF. Com a inibição da atividade da JAB1 pela ligação com MIF, a regulação do ciclo celular pelo complexo SCF é comprometida, permitindo que ele permaneça ativo e promova uma proliferação celular descontrolada (BABU; CHETAL; KUMAR, 2012; KLEEMANN *et al.*, 2000). Devido à ativação contínua do complexo SCF, algumas proteínas reguladoras do ciclo celular são degradadas, como o inibidor de quinase dependente de ciclina (CKI) p27Kip1, permitindo que o complexo ciclina A/CDK2 permaneça ativo, e assim levando a um acúmulo de células na fase G2/M (JANKAUSKAS *et al.*, 2019). A interação de MIF com a proteína p53 também possui um impacto significativo na regulação do ciclo celular. Estudos já demonstraram que o MIF estabiliza a ligação entre a p53 e seu inibidor, Mdm2, bloqueando a fosforilação da p53 e, conseqüentemente, impedindo que a p53 desempenhe sua função no controle do ciclo celular (NOBRE *et al.*, 2017).

Diversos trabalhos relataram a relação da inibição de MIF com o processo de apoptose. Em linhagens de células de câncer de mama triplo negativo (TNBC), CHARAN *et al.*, (2020) identificaram resultados semelhantes aos achados neste trabalho, porém utilizando o inibidor CPSI-1306. Em seu trabalho, após a inibição de MIF, ocorreu a indução do processo de apoptose por meio da via mitocondrial, alterando o potencial de membrana mitocondrial, aumentando a expressão de proteínas pró-apoptóticas e diminuindo a expressão de proteínas anti-apoptóticas. Entretanto, no presente estudo, não foi observada ativação das Caspases 3 e 7, enzimas efetoras da via apoptótica, após o tratamento com BTZO-1, mesmo havendo inibição da proliferação celular e comprometimento da integridade da membrana celular. É possível que outro mecanismo de morte celular esteja sendo ativado após a inibição de MIF. Sugere-se então a autofagia, um mecanismo de morte celular conectado à apoptose que pode anteceder-la, aumentar ou inibir sua ocorrência. Um estudo com linhagens celulares de câncer de mama demonstrou que o receptor de esteroides 3 (SRC-3), um importante fator oncogênico, regula a expressão de MIF, e a supressão de MIF via SRC-3 aumentou a morte celular autofágica (EL BOUNKARI; BERNHAGEN, 2012; WU *et al.*, 2012). Além disso, os receptores de MIF, CD74

e CXCR4, já foram associados à autofagia. Dessa forma, são necessárias novas investigações para avaliar a ativação da morte celular por autofagia em células neoplásicas gástricas tratadas com BTZO-1, bem como a possível relação desses receptores com a via autofágica.

A análise proteômica também revelou que, após o tratamento com BTZO-1, houve uma redução na expressão de proteínas envolvidas no dobramento de proteínas, especialmente nas subunidades que compõem a chaperona HSP90. As chaperonas de choque térmico (HSPs) desempenham um papel essencial na regulação do processo de dobramento de complexos multiméricos, sendo a HSP90 responsável pela maturação de proteínas envolvidas na sinalização celular, incluindo fatores oncogênicos. A relação da HSP90 e MIF já fora descrita por Schulz e colaboradores (2012), que identificaram a HSP90 como uma proteína estabilizadora de MIF em câncer de mama, demonstrando que a inibição de HSP90 reduz a expressão de MIF e bloqueia a progressão tumoral. Estudos posteriores de Klemke e colaboradores (2021) em câncer colorretal mostraram que, após a estabilização de MIF pela HSP90, essa interação favorece a infiltração de macrófagos associados ao tumor (TAMs), além de promover a angiogênese e a proliferação das células tumorais. Além disso, a HSP90 também já foi associada com o processo de autofagia em células tumorais, fortalecendo a hipótese levantada anteriormente da ativação da via autofágica após o tratamento com o inibidor BTZO-1 (CHANG *et al.*, 2023; MORI *et al.*, 2014).

Outros processos biológicos que tiveram redução na expressão das suas proteínas foram o *splicing* do RNA e sua regulação, e o processo metabólico de regulação do mRNA. Como mencionado anteriormente, MIF pode ativar vias importantes para a regulação gênica, como as vias NF- κ B, MAPK/ERK e PI3K/AKT. Com a inibição de MIF, essas vias podem alterar a transcrição de genes relacionados à inflamação e sobrevivência celular (JANKAUSKAS *et al.*, 2019). Além disso, MIF pode afetar diretamente histonas ou proteínas associadas à cromatina, pois MIF também pode estar localizado no núcleo devido a sua atividade nucleásica. A atividade exonuclease 3' de MIF foi primeiramente relatado em lesão cerebral isquêmica (WANG *et al.*, 2016). Posteriormente, relatou-se que a atividade nuclease de MIF está associada com a enzima poli ADP-ribose polimerase (PARP1) que está relacionada ao processo de reparo do DNA (WANG *et al.*, 2021). Foi observado que o MIF endógeno é recrutado para o núcleo no momento da fase de replicação do DNA, através de sua relação com PARP1. Essa atividade nucleásica pode modificar a configuração da cromatina ou do seu complexo regulador, impactando processos biológicos fundamentais, como o *splicing* e a regulação do processo metabólico do mRNA.

7 CONCLUSÃO

Na triagem do painel de inibidores específicos, o inibidor BTZO-1 se destacou pelo seu potencial terapêutico no CG, demonstrando alta eficácia na inibição da proliferação de células tumorais gástricas. Paralelamente, seu alvo molecular, MIF, mostrou relevância nos estudos de expressão e sobrevida, reforçando sua importância como um potencial alvo terapêutico.

As análises de bioinformática confirmaram a relevância clínica de MIF no câncer gástrico, indicando que sua alta expressão está correlacionada a menor sobrevida dos pacientes, maior tamanho tumoral e a presença de metástase à distância. O efeito do tratamento da linhagem metastática AGP-01 com a molécula inibidora de MIF, BTZO-1, resultou em impactos significativos em mecanismos celulares essenciais para o desenvolvimento tumoral, como o comprometimento da integridade da membrana celular, redução da migração, alterações no ciclo celular e na expressão de proteínas envolvidas na regulação do RNA e no dobramento proteico.

A diversidade de mecanismos afetados pelo BTZO-1 pode estar associada à natureza multifuncional do MIF, que desempenha diferentes papéis conforme suas interações moleculares e sua localização celular. Diante disso, o presente estudo não apenas valida o MIF como um alvo terapêutico relevante, mas também destaca o BTZO-1 como um potencial agente terapêutico para o CG.

REFERÊNCIAS

- AMERICAN CANCER SOCIETY. **Cancer Facts & Figures 2024**. Disponível em: <<https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-statistics/annual-cancer-facts-and-figures/2024/2024-cancer-facts-and-figures-acf.pdf>>. Acesso em: 27 set. 2024.
- AMIN, M. B. *et al.* The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more “personalized” approach to cancer staging. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 67, n. 2, p. 93–99, 1 mar. 2017.
- ANTOLIN, A. A. *et al.* The Chemical Probes Portal: an expert review-based public resource to empower chemical probe assessment, selection and use. **Nucleic Acids Research**, v. 51, n. D1, p. D1492–D1502, 6 jan. 2023.
- ARAI, H.; NAKAJIMA, T. E. Recent Developments of Systemic Chemotherapy for Gastric Cancer. **Cancers 2020, Vol. 12, Page 1100**, v. 12, n. 5, p. 1100, 28 abr. 2020.
- ARISAWA, T. *et al.* Functional promoter polymorphisms of the macrophage migration inhibitory factor gene in gastric carcinogenesis. **Oncology Reports**, v. 19, n. 1, p. 223–228, 1 jan. 2008.
- BABU, S. N.; CHETAL, G.; KUMAR, S. Macrophage Migration Inhibitory Factor: a Potential Marker for Cancer Diagnosis and Therapy. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 13, n. 5, p. 1737–1744, 2012.
- BANDO, H. *et al.* Expression of Macrophage Migration Inhibitory Factor in Human Breast Cancer: Association with Nodal Spread. **Japanese Journal of Cancer Research**, v. 93, n. 4, p. 389–396, 2 abr. 2002.
- BANG, Y. J. *et al.* Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): A phase 3, open-label, randomised controlled trial. **The Lancet**, v. 376, n. 9742, p. 687–697, 28 ago. 2010.
- BOSMAN, F. T. *et al.* **WHO classification of tumours of the digestive system**. 4. ed. Geneva: World Health Organization, 2010.
- CAPPIELLO, F.; CASCIARO, B.; MANGONI, M. L. A Novel In Vitro Wound Healing Assay to Evaluate Cell Migration. **Journal of Visualized Experiments : JoVE**, v. 2018, n. 133, p. 56825, 17 mar. 2018.
- CARVALHO, P. C. *et al.* Integrated analysis of shotgun proteomic data with PatternLab for proteomics 4.0. **Nature Protocols 2015 11:1**, v. 11, n. 1, p. 102–117, 10 dez. 2015.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **CDC health information for international travel**. [s.l.: s.n.].
- CHARAN, M. *et al.* Macrophage migration inhibitory factor inhibition as a novel therapeutic

approach against triple-negative breast cancer. **Cell Death & Disease** **2020** **11:9**, v. 11, n. 9, p. 1–15, 17 set. 2020.

CHEN, Y. *et al.* edgeR 4.0: powerful differential analysis of sequencing data with expanded functionality and improved support for small counts and larger datasets. **bioRxiv**, p. 2024.01.21.576131, 24 jan. 2024.

CHENG, B. *et al.* MIF inhibitor, ISO-1, attenuates human pancreatic cancer cell proliferation, migration and invasion in vitro, and suppresses xenograft tumour growth in vivo. **Scientific Reports** **2020** **10:1**, v. 10, n. 1, p. 1–10, 21 abr. 2020.

CHENG, R. *et al.* Expression of Macrophage Migration Inhibitory Factor and CD74 in Cervical Squamous Cell Carcinoma. **International Journal of Gynecological Cancer**, v. 21, n. 6, p. 1004–1012, ago. 2011.

CHOI, J.; JUNG, W. H.; KOO, J. S. Metabolism-Related Proteins Are Differentially Expressed according to the Molecular Subtype of Invasive Breast Cancer Defined by Surrogate Immunohistochemistry. **Pathobiology**, v. 80, n. 1, p. 41–52, 1 ago. 2012.

CONITEC – COMISSÃO NACIONAL DE INCORPORAÇÃO DE TECNOLOGIAS NO SUS. **Diretrizes Diagnósticas e Terapêuticas para Adenocarcinoma de Estômago e Junção Gastroesofágica.** Disponível em: <https://www.gov.br/conitec/pt-br/midias/relatorios/2018/relatorio_ddt_adenocarcinoma_estomago.pdf/view>. Acesso em: 5 nov. 2024.

EL BOUNKARI, O.; BERNHAGEN, J. MIF and autophagy: a novel link beyond “eating”. **Cell Research** **2012** **22:6**, v. 22, n. 6, p. 950–953, 8 maio 2012.

FEITELSON, M. A. *et al.* Sustained proliferation in cancer: Mechanisms and novel therapeutic targets. **Seminars in Cancer Biology**, v. 35, p. S25–S54, 1 dez. 2015.

FERLAY J *et al.* **Global Cancer Observatory: Cancer Today.** Disponível em: <<https://gco.iarc.who.int/today>>. Acesso em: 27 set. 2024.

GARCIA-GERIQUE, L. *et al.* MIF/CXCR4 signaling axis contributes to survival, invasion, and drug resistance of metastatic neuroblastoma cells in the bone marrow microenvironment. **BMC Cancer**, v. 22, n. 1, p. 1–17, 1 dez. 2022.

GE, S. *et al.* Association between Habitual Dietary Salt Intake and Risk of Gastric Cancer: A Systematic Review of Observational Studies. **Gastroenterology research and practice**, v. 2012, p. 808120, 2012.

GENTLEMAN, R. C. *et al.* Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. **Genome Biology**, v. 5, n. 10, p. R80, 15 set. 2004.

HANAHAN, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. **Cancer Discovery**, v. 12, n. 1, p. 31–46, 1 jan. 2022.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The Hallmarks of Cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57–70, jan. 2000.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, mar. 2011.

HE, L. J. *et al.* Macrophage migration inhibitory factor as a potential prognostic factor in gastric cancer. **World Journal of Gastroenterology**, v. 21, n. 34, p. 9916–9926, 14 set. 2015.

HE, X. X. *et al.* Increased epithelial and serum expression of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in gastric cancer: potential role of MIF in gastric carcinogenesis. **Gut**, v. 55, n. 6, p. 797–802, 1 jun. 2006.

IRIGARAY, P.; BÉLPOMME, D. Basic properties and molecular mechanisms of exogenous chemical carcinogens. **Carcinogenesis**, v. 31, n. 2, p. 135–148, 1 fev. 2010.

JANKAUSKAS, S. S. *et al.* Evolving complexity of MIF signaling. **Cellular Signalling**, v. 57, p. 76–88, 1 maio 2019.

JOSHI, S. S.; BADGWELL, B. D. Current treatment and recent progress in gastric cancer. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 71, n. 3, p. 264–279, 1 maio 2021.

KIMURA, H. *et al.* BTZO-1, a Cardioprotective Agent, Reveals that Macrophage Migration Inhibitory Factor Regulates ARE-Mediated Gene Expression. **Chemistry & Biology**, v. 17, n. 12, p. 1282–1294, 22 dez. 2010.

KINDT, N. *et al.* Pharmacological inhibition of macrophage migration inhibitory factor interferes with the proliferation and invasiveness of squamous carcinoma cells. **International Journal of Oncology**, v. 43, n. 1, p. 185–193, jul. 2013.

KLEEMANN, R. *et al.* Intracellular action of the cytokine MIF to modulate AP-1 activity and the cell cycle through Jab1. **Nature** **2000 408:6809**, v. 408, n. 6809, p. 211–216, 9 nov. 2000.

KLEMKE, L. *et al.* Hsp90-stabilized MIF supports tumor progression via macrophage recruitment and angiogenesis in colorectal cancer. **Cell Death & Disease** **2021 12:2**, v. 12, n. 2, p. 1–16, 4 fev. 2021.

KROCKENBERGER, M. *et al.* Macrophage migration-inhibitory factor levels in serum of patients with ovarian cancer correlates with poor prognosis. **Anticancer research**, v. 32, n. 12, p. 5233–8, dez. 2012.

KUSHIMA, R. The updated WHO classification of digestive system tumours—gastric adenocarcinoma and dysplasia. **Der Pathologe**, v. 43, n. 1, p. 8–15, 22 fev. 2022.

LAURÉN, P. THE TWO HISTOLOGICAL MAIN TYPES OF GASTRIC CARCINOMA: DIFFUSE AND SO-CALLED INTESTINAL-TYPE CARCINOMA. **Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica**, v. 64, n. 1, p. 31–49, 30 set. 1965.

LEAL, M. F. *et al.* Establishment and conventional cytogenetic characterization of three gastric cancer cell lines. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, v. 195, n. 1, p. 85–91, 1 nov. 2009.

LEE, J. H. *et al.* Lauren Histologic Type Is the Most Important Factor Associated With Pattern

of Recurrence Following Resection of Gastric Adenocarcinoma. **Annals of surgery**, v. 267, n. 1, p. 105–113, jan. 2018.

LI, C. *et al.* Macroscopic Borrmann Type as a Simple Prognostic Indicator in Patients with Advanced Gastric Cancer. **Oncology**, v. 77, n. 3–4, p. 197–204, 2009.

LI, K. *et al.* Advances in clinical immunotherapy for gastric cancer. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer**, v. 1876, n. 2, p. 188615, 1 dez. 2021.

LIANG, W. *et al.* Identification of Susceptibility Modules and Genes for Cardiovascular Disease in Diabetic Patients Using WGCNA Analysis. **Journal of Diabetes Research**, v. 2020, p. 4178639, 2020.

LIU, Y. *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. 708–29, out. 2015.

LÓPEZ, M. J. *et al.* Characteristics of gastric cancer around the world. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 181, p. 103841, 1 jan. 2023.

MACHLOWSKA, J. *et al.* Gastric Cancer: Epidemiology, Risk Factors, Classification, Genomic Characteristics and Treatment Strategies. **International Journal of Molecular Sciences 2020, Vol. 21, Page 4012**, v. 21, n. 11, p. 4012, 4 jun. 2020.

MESQUITA, F. P. *et al.* Small benzothiazole molecule induces apoptosis and prevents metastasis through DNA interaction and c-MYC gene supression in diffuse-type gastric adenocarcinoma cell line. **Chemico-biological interactions**, v. 294, p. 118–127, 1 out. 2018.

MESQUITA, F. P. *et al.* MAPK14 (p38 α) inhibition effects against metastatic gastric cancer cells: A potential biomarker and pharmacological target. **Toxicology in Vitro**, v. 66, p. 104839, 1 ago. 2020.

MUKKAMALLA SKR; RECIO-BOILES A; BABIKER HM. **Gastric Cancer**. Treasure Island: StatPearls Publishing, 2024.

NARITA, Y.; MURO, K. Updated Immunotherapy for Gastric Cancer. **Journal of Clinical Medicine**, v. 12, n. 7, p. 2636, 1 abr. 2023.

NOBRE, C. C. G. *et al.* Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF): Biological Activities and Relation with Cancer. **Pathology and Oncology Research**, v. 23, n. 2, p. 235–244, 1 abr. 2017.

NOE, J. T.; MITCHELL, R. A. MIF-Dependent Control of Tumor Immunity. **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 609948, 25 nov. 2020.

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

PEI, J.; PANINA, S. B.; KIRIENKO, N. V. An Automated Differential Nuclear Staining Assay for Accurate Determination of Mitocan Cytotoxicity. **Journal of Visualized Experiments**, n.

159, 12 maio 2020.

REN, Y. *et al.* Macrophage migration inhibitory factor: Roles in regulating tumor cell migration and expression of angiogenic factors in hepatocellular carcinoma. **International Journal of Cancer**, v. 107, n. 1, p. 22–29, 20 out. 2003.

REN, Y. *et al.* Macrophage Migration Inhibitory Factor Stimulates Angiogenic Factor Expression and Correlates With Differentiation and Lymph Node Status in Patients With Esophageal Squamous Cell Carcinoma. **Annals of Surgery**, v. 242, n. 1, p. 55–63, jul. 2005.

RITCHIE, M. E. *et al.* limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. **Nucleic acids research**, v. 43, n. 7, p. e47, 6 jan. 2015.

RÖCKEN, C. Predictive biomarkers in gastric cancer. **Journal of cancer research and clinical oncology**, v. 149, n. 1, p. 467–481, jan. 2023.

RUSTGI, S. D.; CHING, C. K.; KASTRINOS, F. Inherited Predisposition to Gastric Cancer. **Gastrointestinal Endoscopy Clinics of North America**, v. 31, n. 3, p. 467–487, jul. 2021.

SÁ, M. A. *et al.* Single-walled carbon nanotubes functionalized with sodium hyaluronate enhance bone mineralization. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 49, n. 2, p. e4888, 4 dez. 2015.

SALNIKOV, M. Y.; MACNEIL, K. M.; MYMRYK, J. S. The viral etiology of EBV-associated gastric cancers contributes to their unique pathology, clinical outcomes, treatment responses and immune landscape. **Frontiers in Immunology**, v. 15, p. 1358511, 26 mar. 2024.

SANTOS, M. DE O. *et al.* Estimativa de Incidência de Câncer no Brasil, 2023-2025. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 69, n. 1, 6 fev. 2023.

SATO, Y. *et al.* Overview of Chemotherapy for Gastric Cancer. **Journal of Clinical Medicine** 2023, Vol. 12, Page 1336, v. 12, n. 4, p. 1336, 7 fev. 2023.

Schistosomes, liver flukes and Helicobacter pylori. **IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans**, v. 61, p. 1–241, 1994.

SCHMITTGEN, T. D.; LIVAK, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. **Nature Protocols** 2008 3:6, v. 3, n. 6, p. 1101–1108, 5 jun. 2008.

SCHULZ, R. *et al.* Inhibiting the HSP90 chaperone destabilizes macrophage migration inhibitory factor and thereby inhibits breast tumor progression. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 209, n. 2, p. 275, fev. 2012.

SHI, W.-J.; GAO, J.-B. Molecular mechanisms of chemoresistance in gastric cancer. **World Journal of Gastrointestinal Oncology**, v. 8, n. 9, p. 673, 2016.

SHIMWELL, N. J. *et al.* Macrophage migration inhibitory factor and DJ-1 in gastric cancer: differences between high-incidence and low-incidence areas. **British Journal of Cancer** 2012 107:9, v. 107, n. 9, p. 1595–1601, 11 set. 2012.

SHITARA, K. *et al.* Trastuzumab Deruxtecan in Previously Treated HER2-Positive Gastric Cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 382, n. 25, p. 2419–2430, 18 jun. 2020.

SKÓRZEWSKA, M.; GEÇA, K.; POLKOWSKI, W. P. A Clinical Viewpoint on the Use of Targeted Therapy in Advanced Gastric Cancer. **Cancers** **2023**, Vol. **15**, Page **5490**, v. 15, n. 22, p. 5490, 20 nov. 2023.

SMYTH, E. C. *et al.* Gastric cancer. **The Lancet**, v. 396, n. 10251, p. 635–648, ago. 2020.

SMYTH, G. K. *Limma: Linear Models for Microarray Data*. 2005.

SOUZA, L. J. G. DE *et al.* Análise do tratamento e mortalidade nos casos de câncer gástrico na região Norte do Brasil entre 2019 e 2023. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, v. 24, n. 8, p. e16667–e16667, 13 ago. 2024.

SOUZA, P. F. N. *et al.* PepGAT, a chitinase-derived peptide, alters the proteomic profile of colorectal cancer cells and perturbs pathways involved in cancer survival. **International journal of biological macromolecules**, v. 299, 1 abr. 2025.

SUMAIYA, K. *et al.* Macrophage migration inhibitory factor (MIF): A multifaceted cytokine regulated by genetic and physiological strategies. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 233, p. 108024, 1 maio 2022.

SUN, K. *et al.* EBV-Positive Gastric Cancer: Current Knowledge and Future Perspectives. **Frontiers in Oncology**, v. 10, p. 583463, 14 dez. 2020.

SURVEILLANCE RESEARCH PROGRAM, N. C. I. **SEER*Explorer: An interactive website for SEER cancer statistics**. Disponível em: <https://seer.cancer.gov/statistics-network/explorer/application.html?site=18&data_type=4&graph_type=5&compareBy=sex&chk_sex_1=1&chk_sex_3=3&chk_sex_2=2&series=9&race=1&age_range=1&stage=101&advopt_precision=1&advopt_show_ci=on&hdn_view=1&advopt_show_apc=on&advopt_display=1>. Acesso em: 13 jan. 2025.

TAN, L. *et al.* Macrophage migration inhibitory factor is overexpressed in pancreatic cancer tissues and impairs insulin secretion function of β -cell. **Journal of Translational Medicine**, v. 12, n. 1, p. 92, 7 dez. 2014.

THE CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. **Nature**, v. 513, n. 7517, p. 202–209, 11 set. 2014.

TRIANTAFILLIDIS, J. K.; KONSTADOULAKIS, M. M.; PAPALOIS, A. E. Immunotherapy of gastric cancer: Present status and future perspectives. **World Journal of Gastroenterology**, v. 30, n. 8, p. 779, 28 fev. 2024.

TRINH, T. T. K. *et al.* Cluster of lifestyle risk factors for stomach cancer and screening behaviors among Korean adults. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 17503, 16 out. 2023.

WALDUM, H.; MJØNES, P. Time to Classify Tumours of the Stomach and the Kidneys According to Cell of Origin. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 24, 1 dez. 2021.

- WANG, J. *et al.* Analysis of gene expression profiles of non-small cell lung cancer at different stages reveals significantly altered biological functions and candidate genes. **Oncology Reports**, v. 37, n. 3, p. 1736–1746, mar. 2017.
- WANG, L.; XIE, X.-Q. Computational Target Fishing: What Should Chemogenomics Researchers Expect for the Future of *in silico* Drug Design and Discovery? **Future Medicinal Chemistry**, v. 6, n. 3, p. 247–249, 28 mar. 2014.
- WANG, S. S. *et al.* Macrophage migration inhibitory factor promotes the invasion and metastasis of oral squamous cell carcinoma through matrix metalloprotein-2/9. **Molecular Carcinogenesis**, v. 58, n. 10, p. 1809–1821, 1 out. 2019.
- WANG, Y. *et al.* A nuclease that mediates cell death induced by DNA damage and poly(ADP-ribose) polymerase-1. **Science**, v. 354, n. 6308, 7 out. 2016.
- WANG, Y. *et al.* MIF is a 3' flap nuclease that facilitates DNA replication and promotes tumor growth. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, p. 2954, 19 maio 2021.
- WHITE, E. S. *et al.* Macrophage migration inhibitory factor and CXC chemokine expression in non-small cell lung cancer: role in angiogenesis and prognosis. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 9, n. 2, p. 853–60, fev. 2003.
- WITTEKIND, C. The development of the TNM classification of gastric cancer. **Pathology International**, v. 65, n. 8, p. 399–403, 1 ago. 2015.
- WU, M. Y. *et al.* Steroid receptor coactivator 3 regulates autophagy in breast cancer cells through macrophage migration inhibitory factor. **Cell Research** 2012 22:6, v. 22, n. 6, p. 1003–1021, 20 mar. 2012.
- XIA, J. Y.; AADAM, A. A. Advances in screening and detection of gastric cancer. **Journal of Surgical Oncology**, v. 125, n. 7, p. 1104–1109, 28 jun. 2022.
- XU, X. *et al.* Overexpression of macrophage migration inhibitory factor induces angiogenesis in human breast cancer. **Cancer Letters**, v. 261, n. 2, p. 147–157, mar. 2008.
- YAGHOobi, M. *et al.* Hereditary risk factors for the development of gastric cancer in younger patients. **BMC gastroenterology**, v. 4, p. 28, 27 out. 2004.
- YAKIREVICH, E.; RESNICK, M. B. Pathology of Gastric Cancer and Its Precursor Lesions. **Gastroenterology Clinics of North America**, v. 42, n. 2, p. 261–284, 1 jun. 2013.
- YU, D. *et al.* Bcl-2 gene silence enhances the sensitivity toward 5-Fluorouracil in gastric adenocarcinoma cells. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 67, n. 7, p. 615–619, set. 2013.
- YUE, P. Y. K. *et al.* A Simplified Method for Quantifying Cell Migration/Wound Healing in 96-Well Plates. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 15, n. 4, p. 427–433, 5 abr. 2010.
- YUSEFI, A. R. *et al.* Risk Factors for Gastric Cancer: A Systematic Review. **Asian Pacific**

journal of cancer prevention: APJCP, v. 19, n. 3, p. 591–603, 27 mar. 2018.

ZHENG, L. *et al.* Destabilization of macrophage migration inhibitory factor by 4-IPP reduces NF- κ B/P-TEFb complex-mediated c-Myb transcription to suppress osteosarcoma tumorigenesis. **Clinical and Translational Medicine**, v. 12, n. 1, p. e652, 1 jan. 2022.

ZHENG, Y.-X. CD74 and macrophage migration inhibitory factor as therapeutic targets in gastric cancer. **World Journal of Gastroenterology**, v. 18, n. 18, p. 2253, 2012.