



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS**  
**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR**  
**CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**DYANE ROCHA ARAGÃO**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE MODULAÇÃO DO METABOLISMO TUMORAL  
GÁSTRICO PELO FÁRMACO MEBENDAZOL**

**FORTALEZA**

**2022**

DYANE ROCHA ARAGÃO

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE MODULAÇÃO DO METABOLISMO TUMORAL  
GÁSTRICO PELO FÁRMACO MEBENDAZOL

Monografia apresentada ao Curso de Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Raquel Carvalho Montenegro.

Coorientador: MSc. Emerson Lucena da Silva.

FORTALEZA

2022

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)

---

A671a Aragão, Dyane Rocha.  
Avaliação do potencial de modulação do metabolismo tumoral gástrico pelo fármaco Mebendazol /  
Dyane Rocha Aragão. – 2022.  
50 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências,  
Curso de Biotecnologia, Fortaleza, 2022.

Orientação: Prof. Dr. Raquel Carvalho Montenegro .  
Coorientação: Prof. Me. Emerson Lucena da Silva.

1. Câncer gástrico. 2. Metabolismo. 3. Mebendazol. 4. Docking. I. Título.

CDD 661

---

DYANE ROCHA ARAGÃO

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE MODULAÇÃO DO METABOLISMO TUMORAL  
GÁSTRICO PELO FÁRMACO MEBENDAZOL

Monografia apresentada ao Curso de Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

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

BANCA EXAMINADORA

---

Profa. Dra. Raquel Carvalho Montenegro (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Pedro Filho Noronha de Souza  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Profa. Dra. Daniele de Oliveira Bezerra de Sousa  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e por me ajudar a enfrentar todos os obstáculos encontrados.

Aos meus pais, Valéria e Robério, e a minha família por todos os esforços e sacrifícios que realizaram para eu chegar até aqui. Por todo o amor, apoio, e ensinamentos que levarei comigo.

Aos meus amigos do ensino médio, em especial à Mayrla, Raiane e Douglas, por todos os momentos que compartilhamos e pelo apoio e ajuda, principalmente no início da graduação.

Ao meu amigo Joelson, pelos momentos de descontração e por tornar o dia a dia na UFC mais divertido.

A todos da biotecnologia com quem tive o prazer de participar de trabalhos em grupo, seminários, e por dividirem comigo todas as dificuldades enfrentadas e as alegrias, em especial meu amigo Vinícius.

A minha orientadora, professora Dra. Raquel Montenegro, ao meu coorientador MSc. Emerson Lucena e ao professor Dr. Pedro Noronha, por todo o apoio e ajuda no desenvolvimento desse trabalho, nos projetos de iniciação científica e estágios, e por sempre se disponibilizarem a tirar todas as minhas dúvidas. E a todos do Laboratório de Farmacogenética (FARMAGEN), pelo acolhimento e por todos os momentos de aprendizado.

A minha amiga e parceira de laboratório Vitória, por compartilhar das dificuldades e alegrias enfrentadas na rotina de uma jovem cientista.

Ao meu noivo Isaias, por estar sempre ao meu lado, me apoiando e me incentivando, com todo o seu amor e carinho, tornando os meus dias muito mais felizes.

“It always seems impossible until it’s done.”

(Nelson Mandela)

## RESUMO

No ano de 2020, o câncer gástrico (CG) foi responsável por mais de um milhão de novos casos em todo o mundo, sendo o quinto câncer mais incidente e o quarto mais letal. O desenvolvimento do câncer é apoiado pela reprogramação metabólica, processo que altera o fluxo das principais vias metabólicas celulares para proporcionar a energia necessária para a proliferação descontroladas das células neoplásicas. Apesar de haver vários tratamentos para os pacientes com esse tumor, ainda há muitas barreiras a serem enfrentadas, como a resistência aos medicamentos. Dessa forma, se faz necessária a busca de novas opções terapêuticas. Assim, este trabalho tem como objetivo avaliar o potencial de modulação do fármaco Mebendazol (MBZ) no metabolismo tumoral gástrico por meio de análises *in silico* e *in vitro*. Primeiramente, a molécula do fármaco MBZ foi desenhada e otimizada nos softwares MarvinSketch® e Avogadro®. Após, buscou-se estruturas correspondentes das proteínas do metabolismo da glicose GLUT1, HK1, GAPDH e LDHA no banco de dados *Protein Data Bank* para a realização do *docking* molecular no servidor online DockThor®. A ferramenta online GEPIA® foi utilizada para a análise *in silico* da expressão global dos genes *SLC2A1*, *HK1*, *GAPDH* e *LDHA*, que também foram correlacionados com a taxa de sobrevivência global por meio da ferramenta Kaplan Meier plotter®. Para as análises *in vitro* foi utilizada a linhagem celular tumoral gástrica AGP-01. Foram realizados ensaios para avaliar a citotoxicidade do MBZ e para avaliar a expressão gênica *in vitro* após o tratamento com o MBZ. Os *dockings* realizados com o MBZ mostraram scores de -8,560, -7,457, -7,195 e -7,550 para as proteínas GLUT1, HK1, GAPDH e LDHA, respectivamente, além das interações polares observadas. O MBZ apresentou uma alta toxicidade na linhagem AGP-01, com  $CI_{50}$  de 0,11  $\mu$ M. Além de ter reduzido significativamente a expressão de todos os genes avaliados ( $p < 0,0001$  para *SLC2A1* e *HK1* e  $p < 0,05$  para *GAPDH* e *LDHA*). A análise do GEPIA® mostrou que, com exceção do gene *HK1*, todos os alvos apresentaram hiperexpressão no câncer gástrico ( $p < 0,05$ ). Ao correlacionar o aumento da expressão gênica com a taxa de sobrevivência, foi verificado que apenas a alta expressão de *LDHA* não está associada a piora no prognóstico. Assim sendo, o MBZ apresenta um potencial promissor no tratamento do CG devido à possibilidade de modulação da expressão de genes essenciais para o metabolismo tumoral.

**Palavras-chave:** câncer gástrico; metabolismo; mebendazol; *docking*.

## ABSTRACT

In 2020, gastric cancer (GC) was responsible for more than one million new cases worldwide. It is the fifth most incident and the fourth most lethal. Cancer development is supported by metabolic reprogramming, a process that alters the flow of crucial cellular metabolic pathways to provide the energy needed for the uncontrolled proliferation of neoplastic cells. Although there are several treatments for patients with this tumor, there are still many barriers to surpass, such as drug resistance. Thus, making it necessary to search for new therapeutic options. So, this work aims to evaluate the modulating potential of the drug Mebendazole (MBZ) in gastric tumor metabolism through *in silico* and *in vitro* analyses. First, the MBZ drug molecule was designed and optimized in MarvinSketch® and Avogadro® software. Afterward, corresponding structures of the proteins of the glucose metabolism GLUT1, HK1, GAPDH, and LDHA were searched in the Protein Data Bank database to perform molecular docking on the DockThor® online server. The online tool GEPIA® was used to analyze the *in silico* global expression of the *SLC2A1*, *HK1*, *GAPDH*, and *LDHA* genes, which were also correlated with the overall survival rate using the Kaplan Meier plotter® tool. For *in vitro* analysis, the gastric tumor cell line AGP-01 was used. Assays were performed to evaluate the cytotoxicity of MBZ and to assess gene expression *in vitro* with MBZ's treatment. Dockings performed with MBZ showed scores of -8.560, -7.457, -7.195, and -7.550 for proteins GLUT1, HK1, GAPDH, and LDHA, respectively, in addition to the observed polar interactions. MBZ showed high toxicity in the AGP-01 cell line, with IC<sub>50</sub> of 0.11 μM. It also significantly reduced the expression of all genes evaluated (p<0.0001 for *SLC2A1* and *HK1* and p<0.05 for *GAPDH* and *LDHA*). GEPIA® analysis showed that, except for the *HK1* gene, all of them were overexpressed in gastric cancer (p<0.05). By correlating the increase in gene expression with the survival rate, only *LDHA* high expression is not related to a worse prognosis. Therefore, MBZ has promising potential in gastric cancer treatment due to the possibility of modulating the expression of essential genes for tumor metabolism.

**Keywords:** gastric cancer; metabolism; mebendazole; docking.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Características associadas ao desenvolvimento do câncer .....	15
Figura 2 – Diagrama esquemático da via glicolítica .....	16
Figura 3 – Estrutura 3D do MBZ.....	29
Figura 4 – Análise de <i>docking</i> molecular da proteína GLUT1.....	31
Figura 5 – Análise de <i>docking</i> molecular da proteína HK1.....	34
Figura 6 – Análise de <i>docking</i> molecular da proteína GAPDH.....	37
Figura 7 – Análise de <i>docking</i> molecular da proteína LDHA .....	40
Figura 8 – MBZ modula a expressão gênica de genes relacionados ao metabolismo na linhagem celular AGP-01 .....	42
Figura 9 – Genes relacionados ao metabolismo são superexpressos no CG .....	43
Figura 10 – A hiperexpressão de genes metabólicos leva a modificação na taxa de sobrevida global .....	44

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Característica da linhagem celular utilizada no estudo.....	25
Tabela 2 – Sequências de oligonucleotídeos usados na RT-qPCR.....	27
Tabela 3 – Atividade citotóxica do MBZ após 72 horas na linhagem metastática gástrica AGP-01.....	28
Tabela 4 – Especificações utilizadas nas análises de <i>docking</i> molecular pelo servidor DockThor .....	29
Tabela 5 – Score obtido pelo servidor dockthor para cada ligante utilizado nos <i>dockings</i> da proteína GLUT1 .....	32
Tabela 6 – Score obtido pelo servidor dockthor para cada ligante utilizado nos <i>dockings</i> da proteína HK1 .....	35
Tabela 7 – Score obtido pelo servidor dockthor para cada ligante utilizado nos <i>dockings</i> da proteína GAPDH .....	38
Tabela 8 – Score obtido pelo servidor dockthor para cada ligante utilizado nos <i>dockings</i> da proteína LDHA.....	41

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

9Y7	2-{3-(3,4-difluorofenil)-5-hidroxi-4-[(4-sulfamoil-fenil)metil]-1H-pirazol-1-il}-1,3-tiazol-4 ácido carboxílico
Acetil Co-A	Acetilcoenzima A
ACTS-GC	<i>The Adjuvant Chemotherapy Trial of S-1 for Gastric Cancer</i>
ADP	Adenosina-5'-difosfato
ATP	Adenosina trifosfato
BNG	Nonil $\beta$ -D-glicopiranosídeo
CG	Câncer gástrico
CL	Íon cloreto
CLASSIC	<i>The Capecitabine and Oxaliplatin Adjuvant Study in Stomach Cancer</i>
DMEM	Meio Eagle - Modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
G3P	Gliceraldeído-3-fosfato
G6P	$\alpha$ -D-glicose 6-fosfato
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GEPIA®	<i>Gene Expression Profiling Interactive Analysis</i>
GLC	$\alpha$ -D-glicopiranosose
GLUT1	Transportador de glicose 1
GOL	Glicerol
GTE <sub>x</sub>	<i>The Genotype-Tissue Expression</i>
HK	Hexoquinase
IDH	Índice de Desenvolvimento Humano
LDHA	Lactato desidrogenase A
MBZ	Mebendazol
<i>MIQE Guidelines</i>	<i>Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments</i>
MLA	Ácido malônico
OXPHOS	Fosforilação oxidativa
P33	Hepta-etileno glicol
PBS	Tampão fosfato-salino
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PFK	Fosfofrutoquinase

PGI	Fosfoglicose isomerase
PGK	Fosfoglicerato quinase
PGM	Fosfoglicerato mutase
PK	Piruvato quinase
RT-qPCR	PCR em tempo real
SBF	Soro Bovino Fetal
SG	Sobrevida global
SMILE	<i>Simplified Molecular Input Line Entry Specification</i>
TCA	Ciclo dos ácidos tricarboxílicos
TCGA	<i>The Cancer Genome Atlas</i>
TPI	Triose-fosfato isomerase
XPE	Deca-etileno glicol

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>1.1</b>	<b>Câncer</b> .....	14
<b>1.1.1</b>	<b>Metabolismo tumoral</b> .....	15
<b>1.1.1.1</b>	<b>Via glicolítica aeróbica</b> .....	15
<b>1.2</b>	<b>Câncer gástrico</b> .....	18
<b>1.2.1</b>	<b>Epidemiologia</b> .....	18
<b>1.2.2</b>	<b>Tratamento</b> .....	19
<b>1.3</b>	<b>Reposicionamento de fármacos</b> .....	20
<b>1.3.1</b>	<b>Mebendazol</b> .....	21
<b>1.3.2</b>	<b>Ancoragem molecular</b> .....	22
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	23
<b>2.1</b>	<b>Objetivo geral</b> .....	23
<b>2.2</b>	<b>Objetivos específicos</b> .....	23
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	24
<b>3.1</b>	<b>Preparo das moléculas e do alvo farmacológico</b> .....	24
<b>3.2</b>	<b>Análise de <i>docking</i> molecular</b> .....	24
<b>3.3</b>	<b>Análise de expressão gênica <i>in silico</i> através de bancos de dados online</b> .....	24
<b>3.4</b>	<b>Cultura celular</b> .....	25
<b>3.5</b>	<b>Substâncias químicas</b> .....	26
<b>3.6</b>	<b>Análise de citotoxicidade por Alamar Blue</b> .....	26
<b>3.7</b>	<b>Extração de mRNA e análise de expressão gênica por RT-qPCR</b> .....	26
<b>3.8</b>	<b>Análise estatística</b> .....	27
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	28
<b>4.1</b>	<b>Mebendazol demonstra atividade citotóxica na linhagem metastática gástrica AGP-01</b> .....	28
<b>4.2</b>	<b>Preparo das moléculas e do alvo farmacológico</b> .....	28
<b>4.3</b>	<b>Mebendazol demonstra alta interação com proteínas da via glicolítica</b> .....	29
<b>4.3.1</b>	<b>Análise de interação com <i>GLUT1</i></b> .....	30
<b>4.3.2</b>	<b>Análise de interação com <i>HK1</i></b> .....	32
<b>4.3.3</b>	<b>Análise de interação com <i>GAPDH</i></b> .....	35
<b>4.3.4</b>	<b>Análise de interação com <i>LDHA</i></b> .....	38

<b>4.4</b>	<b>O fármaco mebendazol leva a diminuição na expressão de genes da via glicolítica na linhagem AGP-01 .....</b>	<b>41</b>
<b>4.5</b>	<b>Análise de expressão gênica em banco de dados mostra que genes da via glicolítica estão hiperexpressos em pacientes diagnosticados com câncer gástrico .....</b>	<b>42</b>
<b>4.6</b>	<b>Análise em banco de dados mostra que a alta expressão de genes da via glicolítica está relacionada com a diminuição na sobrevida de pacientes com câncer gástrico .....</b>	<b>43</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>45</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>46</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Câncer

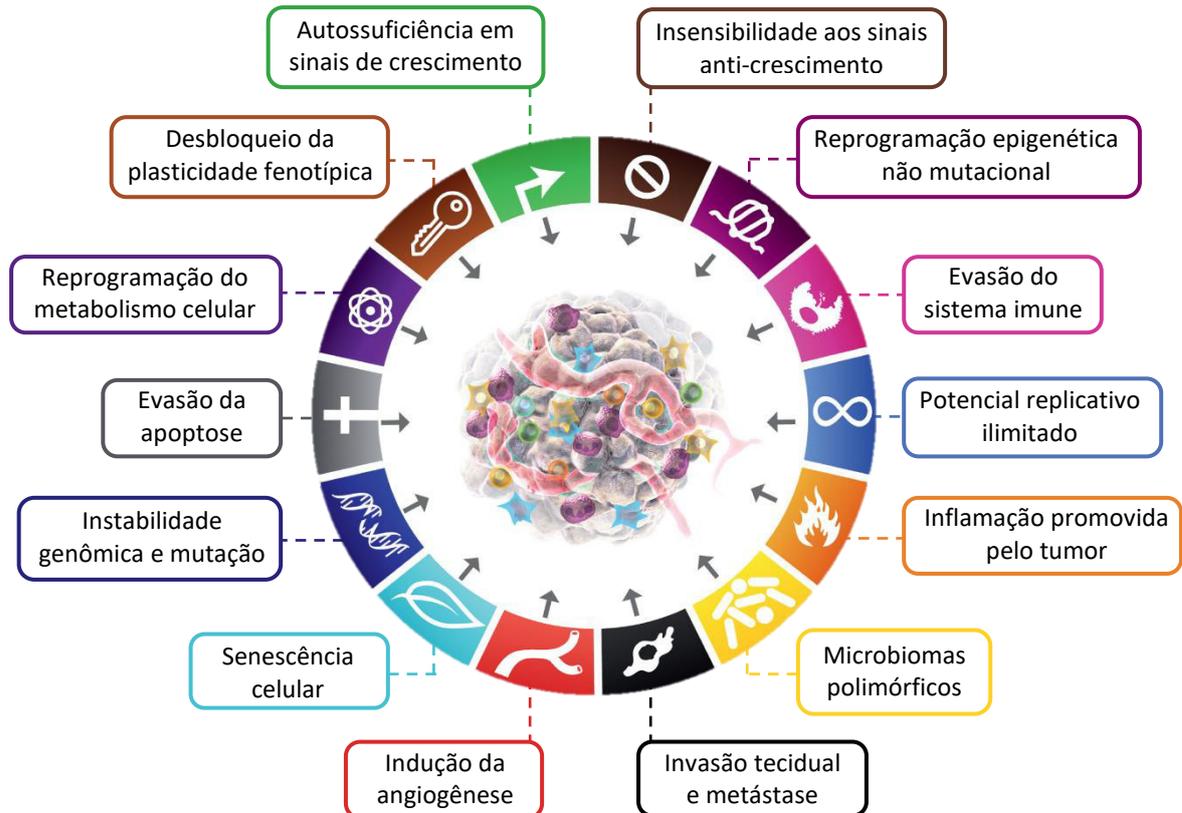
O câncer é o nome dado ao conjunto de mais de 100 tipos de doenças que possuem em comum o crescimento desordenado de células, podendo invadir tecidos adjacentes ou órgãos a distância (INCA, 2022). Pode ser causado por alterações genéticas que ocorrem devido a erros durante a divisão celular, danos no DNA causados por agentes carcinógenos, como produtos químicos presentes na fumaça do tabaco e os raios ultravioletas do sol, e também podem ser herdados dos nossos pais (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2021).

O processo de formação do câncer, conhecido como carcinogênese, é composto por três estágios: iniciação, promoção e progressão. Na iniciação, os genes sofrem modificações pela ação de agentes cancerígenos. Nesse estágio as células se encontram “iniciadas” para a ação dos agentes da fase seguinte. Na etapa da promoção, os agentes oncopromotores são os responsáveis por transformar a célula iniciada em maligna, esse processo ocorre de forma lenta e gradual, onde é preciso um contato duradouro com o agente promotor. E no estágio de progressão o câncer já está instalado, ocorrendo uma multiplicação descontrolada e irreversível nas células alteradas (INCA, 2022).

Para compreender melhor o desenvolvimento do câncer, Hanahan e Weinberg (2000) propuseram seis marcas características que diferenciam uma célula normal de uma célula cancerosa. Em 2011, os autores adicionaram mais quatro características, divididas em “características facilitadoras” e “características emergentes”, e em 2022, Hanahan adicionou mais quatro características dentro dessas mesmas categorias (HANAHAN, 2022; HANAHAN; WEINBERG, 2011).

As principais características adquiridas pelas células cancerosas são: autossuficiência em sinais de crescimento, resistência a mecanismos de apoptose, insensibilidade aos sinais anti-crescimento, indução da angiogênese, invasão de tecidos e metástase, potencial de replicação ilimitado, reprogramação do metabolismo celular e evasão do sistema imune. E dentre as características facilitadoras e emergentes estão: instabilidade genômica e mutação, inflamação promovida pelo tumor, desbloqueio da plasticidade fenotípica, reprogramação epigenética não mutacional, microbiomas polimórficos e senescência celular (FIGURA 1) (HANAHAN, 2022).

Figura 1 – Características associadas ao desenvolvimento do câncer



Fonte: Adaptada de Hanahan (2022, p. 43).

### 1.1.1 Metabolismo tumoral

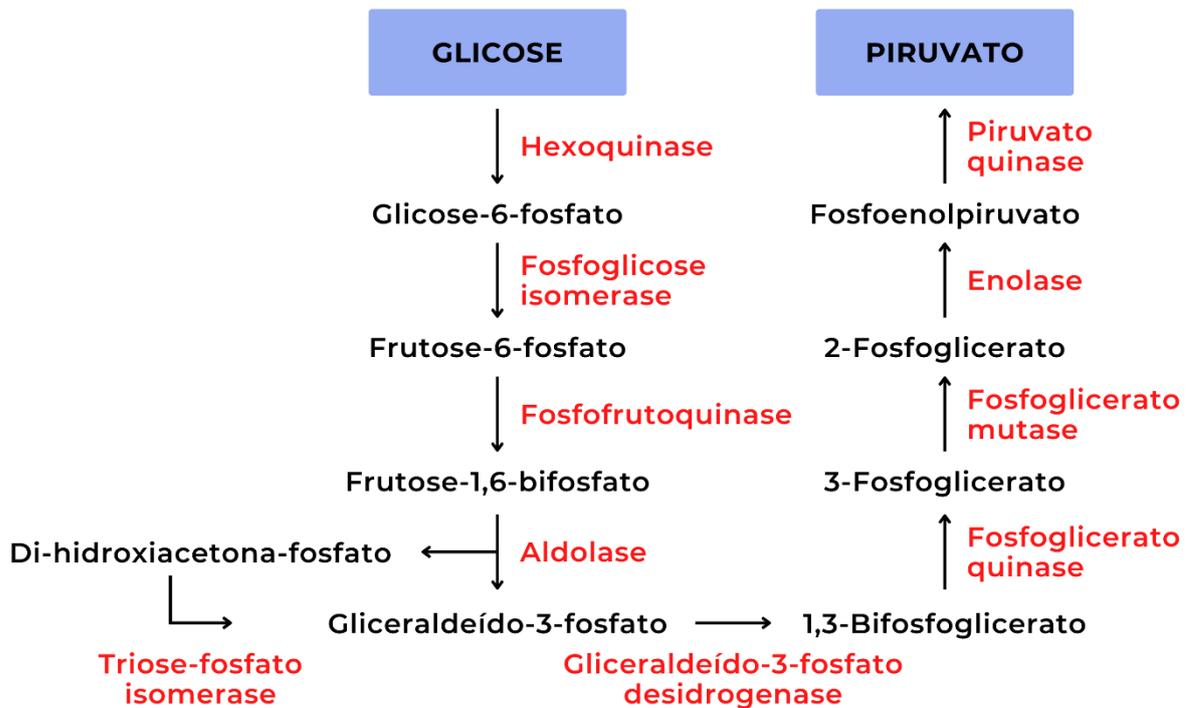
O câncer caracteriza-se pela proliferação descontrolada de células que sofreram mutações, mas para que isso ocorra o metabolismo energético necessita realizar ajustes para suprir o crescimento e a divisão das células (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Em 2022, Hanahan reconheceu a reprogramação metabólica como uma das características principais para o desenvolvimento do câncer, devido a sua capacidade crucial na proliferação das células neoplásicas. O aumento da demanda de energia causado pela multiplicação das células cancerosas é satisfeito por meio de alterações no fluxo das principais vias metabólicas celulares, com destaque para a via glicolítica, uma das principais vias modificadas (SCHILIRO; FIRESTEIN, 2021).

#### 1.1.1.1 Via glicolítica aeróbica

A glicólise é o processo de conversão de glicose em piruvato. Em condições aeróbicas, o piruvato produzido ao fim dessa via é oxidado em acetilcoenzima A (acetil Co-A),

que sofre subsequente oxidação na mitocôndria por meio do ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA) e pela fosforilação oxidativa (OXPHOS). Em condições anaeróbicas, o piruvato é reduzido a lactato por meio do processo de fermentação (GANAPATHY-KANNIAPPAN, 2018). A glicólise é composta por 10 reações químicas (FIGURA 2), cada uma catalisada por uma enzima distinta. São elas: hexoquinase (HK), fosfoglicose isomerase (PGI), fosfofrutoquinase (PFK), aldolase, triose-fosfato isomerase (TPI), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), fosfoglicerato quinase (PGK), fosfoglicerato mutase (PGM), enolase e piruvato quinase (PK) (LI; GU; ZHOU, 2015).

Figura 2 – Diagrama esquemático da via glicolítica



Fonte: Adaptada de Li; Gu; Zhou (2015, p. 18).

Há quase um século, o pesquisador Otto Warburg demonstrou um conceito-chave para a compreensão do metabolismo do câncer. Foi comprovado que as células cancerosas priorizam a produção de lactato mesmo na presença de oxigênio pela via glicolítica, ao passo que nas células normais essa produção só é favorecida em condições de hipóxia. Esse mecanismo ficou conhecido como glicólise aeróbica ou efeito Warburg (DEBERARDINIS; CHANDEL, 2016).

A glicólise aeróbica é um mecanismo de geração de energia pouco eficiente, gerando apenas 2 moléculas de adenosina trifosfato (ATP) por molécula de glicose, enquanto a OXPHOS gera aproximadamente 32 ATPs por molécula de glicose. No entanto, a taxa de

metabolismo da glicose através da glicólise aeróbica é maior, de modo que a produção de lactato ocorre de 10 a 100 vezes mais rápido do que a oxidação completa da glicose na mitocôndria, e, portanto, beneficiando a proliferação descontrolada das células neoplásicas. Além disso, a alta produção de lactato produz um microambiente ácido, oferecendo assim uma vantagem de crescimento e impulsionando a natureza invasiva e metastática das células cancerígenas (LIBERTI; LOCASALE, 2016; SCHILIRO; FIRESTEIN, 2021).

A dependência da glicólise pelas células tumorais proporciona uma oportunidade terapêutica, uma vez que as proteínas presentes no metabolismo da glicose podem ser potenciais alvos para o tratamento do câncer, das quais podemos citar o transportador de glicose 1 (GLUT1), e as enzimas HK, GAPDH e lactato desidrogenase A (LDHA) (XINTAROPOULOU *et al.*, 2018). Tais genes se mostram hiperexpressos em vários tipos de câncer, como no câncer colorretal (LIU *et al.*, 2019), pulmão (YANG *et al.*, 2021), mama (KOUKOURAKIS *et al.*, 2009; WENG *et al.*, 2022), ovário (LI *et al.*, 2020; XINTAROPOULOU *et al.*, 2018), boca (KUNKEL *et al.*, 2003), fígado (XU *et al.*, 2018) e pâncreas (PACCHIANA *et al.*, 2022; RONG *et al.*, 2013).

Uma característica importante das células cancerígenas é o aumento da captação de glicose. O GLUT1 é um alvo importante no tratamento do câncer por ser regulado positivamente em células tumorais. Esse transportador é codificado pelo gene *SLC2A1*, e é o primeiro componente da via glicolítica, transportando glicose para dentro da célula. A sua desregulação está associada a inúmeros distúrbios, incluindo o câncer e doenças metabólicas (XINTAROPOULOU *et al.*, 2018; ZAMBRANO *et al.*, 2019).

A HK participa da primeira reação irreversível da via, catalisando a reação de fosforilação de glicose para produzir glicose-6-fosfato. A partir da fosforilação da glicose ela se torna incapaz de voltar ao exterior celular. Existem quatro isoenzimas presentes em mamíferos, HKI, HKII, HKIII e HKIV, dentre os quais a HKI é largamente expressa na maioria dos tecidos humanos e está associada com a progressão do câncer, além de ser superexpressa em muitos tumores, como câncer de pulmão, gastrointestinal e de mama (LI *et al.*, 2020).

A GAPDH é responsável por catalisar a conversão reversível de gliceraldeído-3-fosfato (G3P) em 1,3-difosfoglicerato e também participa de inúmeras funções celulares. Altos níveis dessa enzima são observados em muitos tipos de câncer e correlacionados com a redução da sobrevida (ZHANG *et al.*, 2015).

Como uma enzima chave que evoluiu na glicólise, a LDH tem sido relatada como sendo regulada positivamente e associada a um prognóstico ruim em muitos tipos de cânceres, promovendo a progressão maligna de tumores, aumentando a produção de ácido láctico,

acelerando a glicólise, modulando a produção de espécies reativas de oxigênio e regulando inúmeras proteínas relacionadas ao câncer. Sua principal função é converter piruvato em lactato e transformar NADH em NAD<sup>+</sup>. O silenciamento da sua expressão em modelos tumorais inibe a proliferação celular, migração e crescimento tumoral, e raramente é prejudicial às células normais (FENG *et al.*, 2018; YANG *et al.*, 2021).

Dessa forma, o aumento na expressão celular e na atividade dessas proteínas parecem estar amplamente associadas ao processo de reprogramação metabólica do câncer e ao grau de malignidade tumoral. O estudo de inibidores de proteínas glicolíticas tem obtido amplo sucesso na diminuição da proliferação tumoral, podendo ser considerados potenciais alvos farmacológicos na terapia do câncer (KIM *et al.*, 2019; LUENGO; GUI; VANDER HEIDEN, 2017; PACCHIANA *et al.*, 2022; QIAO *et al.*, 2021; WENG *et al.*, 2022; XU *et al.*, 2018).

## **1.2 Câncer gástrico**

### ***1.2.1 Epidemiologia***

O câncer gástrico (CG) foi responsável por mais de um milhão de novos casos no ano de 2020, com uma estimativa de 769 mil mortes em todo o mundo. O CG ocupa o quinto lugar em incidência (5,6%) e o quarto em mortalidade no mundo (7,7%), acometendo duas vezes mais os homens. Nessa população é o quarto tipo de câncer mais frequente (7,1%) e o quarto mais letal (9,1%) e nas mulheres ocupa o sétimo lugar em incidência (4,0%) e o quinto em mortalidade (6,0%) (SUNG *et al.*, 2021).

O Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) também exerce influência na incidência do CG. De acordo com Sung *et al.* (2021), as taxas de incidência e mortalidade aumentaram com o aumento do nível de IDH. Nos países com IDH alto/muito alto, o câncer gástrico ocupa a quarta posição em ocorrência (18,9/100 mil) e em mortalidade (12,6/100 mil) na população masculina, em mulheres é o sétimo mais frequente (8,0/100 mil) e o quarto mais letal (5,4/100 mil). Já nos países com índice baixo/médio, em homens é o quinto mais frequente (7,2/100 mil) e o terceiro mais letal (6,4/100 mil). Na população feminina é o sexto em incidência (4,0/100 mil) e o quinto em mortalidade (3,5/100 mil).

No Brasil, é estimado para cada ano do triênio 2020-2022, 13.360 novos casos em homens e 7.870 em mulheres. Excluindo os tumores de pele não melanoma, o CG em homens é o segundo mais frequente na Região Norte (11,75/100 mil) e o terceiro na Região Nordeste (10,63/100 mil), nas Regiões Sul (16,02/100 mil), Sudeste (13,99/100 mil) e Centro-Oeste

(9,38/100 mil) ocupa a quarta posição. Já em mulheres, é o quinto mais frequente nas Regiões Sul (9,15/100 mil) e Norte (6,03/100 mil), o sexto nas Regiões Nordeste (7,03/100 mil) e Centro-Oeste (6,71/100 mil) e o sétimo na Região Sudeste (7,30/100 mil) (INCA, 2020).

Diversos fatores têm sido observados por possuírem um impacto significativo no aumento do risco de desenvolvimento do CG, dentre os quais estão o tabagismo, consumo de álcool, infecção pela bactéria *Helicobacter pylori* e pelo vírus Epstein-Barr. O histórico familiar é um dos fatores de risco mais significativos, porém são esporádicos. Quando herdados com padrão de herança mendeliano englobam menos de 3% de todos os carcinomas gástricos (MACHLOWSKA *et al.*, 2020). A alimentação também exerce uma grande influência, dietas com altos níveis de sal e carne processada demonstraram estar associadas positivamente ao desenvolvimento do câncer gástrico. Em contrapartida, as dietas que possuíam grandes quantidades de frutas e vegetais frescos apresentaram uma associação protetora ao CG (ZALI; REZAEI-TAVIRANI; AZODI, 2011).

### **1.2.2 Tratamento**

Um das estratégias para o tratamento do CG é a cirurgia. Os tratamentos padrão são a ressecção endoscópica da mucosa ou a dissecação endoscópica da submucosa (ESD) para tipos diferenciados de adenocarcinoma gástrico sem achados ulcerativos, apresentando resultados favoráveis a longo prazo. Também há a cirurgia laparoscópica, um método minimamente invasivo, inicialmente limitada ao tratamento de CG precoce do lado distal sem necessidade da retirada completa do estômago (gastrectomia completa) ou remoção dos linfonodos localizados nas artérias gástrica esquerda, esplênica e hepática (linfadenectomia D2). Esse método proporciona menores taxas de complicações pós-operatórias quando comparadas às cirurgias abertas, além de apresentarem resultados clínicos positivos (MACHLOWSKA *et al.*, 2020; MOCELLIN *et al.*, 2015).

A radioterapia vem recebendo uma maior atenção nos últimos anos. É considerada bem tolerada e capaz de reduzir os sintomas de pacientes com CG avançado, como sangramento, obstrução e dor. Porém, a lesão gástrica ainda é inevitável, mesmo com a redução do volume e da dose administrada. A radioterapia perioperatória, ou seja, administrada antes e após o tratamento cirúrgico, mostrou reduzir efetivamente a taxa de recorrência local nos pacientes e melhora na sobrevida (SONG *et al.*, 2017).

A quimioterapia neoadjuvante ou pré-operatória aumenta a probabilidade de ressecção curativa, elimina a disseminação microscópica precoce e permite uma avaliação da

resposta ao tratamento do paciente. A partir de ensaios clínicos randomizados, a quimioterapia pré-operatória e perioperatória tornou-se o padrão para o tratamento de pacientes com CG localmente avançados no hemisfério ocidental e em partes da região Ásia-Pacífico (SMYTH *et al.*, 2020). O tratamento quimioterápico neoadjuvante também pode ser administrado com a radioterapia (quimiorradioterapia), ambos os tratamentos aumentam consideravelmente os resultados clínicos de pacientes com CG ressecáveis e com eficiência semelhante (TSAI *et al.*, 2020).

Já na quimioterapia adjuvante, o tratamento é administrado após a retirada cirúrgica do tumor para aumentar a sobrevida do paciente (SEGALLA *et al.*, 2005). Em dois ensaios clínicos de fase III foi demonstrado que essa terapia reduziu o risco de reaparecimento e morte em pacientes com CG em estágio II ou III após linfadenectomia D2 (ZHANG *et al.*, 2019). O ensaio ACTS-GC (*The Adjuvant Chemotherapy Trial of S-1 for Gastric Cancer*) tinha como objetivo confirmar a eficácia do tratamento pós-operatório de 1 ano usando a droga S-1, que consiste na combinação de tegafur, gimeracil e oteracil potássio (SASAKO *et al.*, 2011). E no ensaio CLASSIC (*The Capecitabine and Oxaliplatin Adjuvant Study in Stomach Cancer*) foram usados os fármacos capecitabina e oxaliplatina. Ambos estudos mostraram que a terapia adjuvante à base de fluoropirimidina melhorou os resultados dos pacientes (CHUNG *et al.*, 2012).

Apesar da terapia adjuvante ser amplamente utilizada, a recorrência e a metástase ainda são problemas graves para a sobrevida dos pacientes após a gastrectomia. Uma das causas mais importantes para essa falha terapêutica é a resistência aos medicamentos. Dessa forma são necessários mais estudos para o desenvolvimento de planos terapêuticos individuais e novas estratégias para superar a quimiorresistência (KIM, 2019).

### **1.3 Reposicionamento de fármacos**

O processo de aprovação de um novo medicamento além de ser caro é demorado, podendo levar de 10 a 15 anos. Dessa forma, o reposicionamento de fármacos surge como uma alternativa a esse processo. Essa estratégia visa a descoberta de novos usos para medicamentos aprovados ou em fase de investigação que estão fora do escopo da indicação médica original, e proporciona diversas vantagens em comparação com o desenvolvimento tradicional de drogas. Apresenta um risco de falha menor, pois o medicamento já foi considerado seguro em testes pré-clínicos e clínicos; o tempo de desenvolvimento é reduzido devido aos testes pré-clínicos, avaliação de segurança ou a comercialização já estarem concluídos; o investimento também é

menor e irá variar conforme o processo de desenvolvimento e o estágio que o fármaco se encontre; além de poderem revelar novas vias e alvos que podem ser mais estudados (DANIEL *et al.*, 2022; PARVATHANENI *et al.*, 2019; PUSHPAKOM *et al.*, 2019).

Novos potenciais terapêuticos podem ser identificados ao acaso ou baseados em hipóteses utilizando estratégias experimentais e computacionais. As abordagens experimentais incluem ensaios de ligação e métodos de triagem fenotípica que podem ser usados para identificar as interações dos ligantes e os compostos principais de grandes bibliotecas de compostos. Já as abordagens computacionais são categorizadas em abordagens centradas na droga ou na doença, baseadas em alvos, baseadas em conhecimento da literatura, baseadas em vias ou redes e baseadas na assinatura do fármaco. Tais métodos aumentam o processo de descoberta de medicamentos ao explorar alvos conhecidos, drogas, biomarcadores ou vias de doenças (PARVATHANENI *et al.*, 2019).

Na terapêutica do câncer é possível encontrar fortes candidatos ao se estudar os efeitos antineoplásicos e suas vias moleculares direcionadas, e a modulação da expressão gênica associada a um perfil específico de câncer. As drogas que podem exercer influência em genes regulados positivamente ou negativamente podem ser úteis para o tratamento oncológico (RODRIGUES; DUARTE; VALE, 2022).

Diversos medicamentos, incluindo metformina, itraconazol e indometacina, desenvolvidos ou aprovados para outras doenças, vêm atraindo interesse. Entre outras drogas, os benzimidazóis mostraram-se promissores, com estudos revelando seus efeitos anticancerígenos e propriedades relativamente seguras por longos períodos de uso (SONG *et al.*, 2022).

### ***1.3.1 Mebendazol***

O Mebendazol (MBZ) é um anti-helmíntico da família dos benzimidazóis, prescrito para o tratamento de infecções por nematódeos e trematódeos. Ele atua como um agente desregulador de microtúbulos, impedindo a polimerização da  $\beta$ -tubulina no intestino de helmintos, seguida pela inibição da captação e transporte de glicose, o que eventualmente leva os parasitas a falta de glicogênio e dessa forma causando a sua morte. Por ser vital para a divisão celular, a tubulina é um alvo para vários quimioterápicos, como paclitaxel, colchicina e vincristina (CHAI; JUNG; HONG, 2021; PANTZIARKA *et al.*, 2014).

O MBZ apresenta evidências de mecanismo e atividade anticancerígena pré-clínica, progredindo para ensaios clínicos em estágio inicial (WILLIAMSON *et al.*, 2021). Em diversos

tumores foi observado um benefício de sobrevida, incluindo melanoma (SIMBULAN-ROSENTHAL *et al.*, 2017), pulmão (MUKHOPADHYAY *et al.*, 2002; SASAKI *et al.*, 2002), colorretal (WILLIAMSON *et al.*, 2016), cérebro (BAI *et al.*, 2011, 2015a, 2015b), meningioma (SKIBINSKI; WILLIAMSON; RIGGINS, 2018), ovário (ELAYAPILLAI *et al.*, 2021) e câncer de tireoide (WILLIAMSON *et al.*, 2020). E em um estudo desenvolvido por Pinto e colaboradores (2015), é visto a capacidade do MBZ de inibir o crescimento, migração e invasão em linhagens de CG.

Dessa forma, o MBZ se torna um forte candidato para a realização de outras análises, de forma a comprovar o seu potencial anticancerígeno em linhagens de câncer gástrico.

### ***1.3.2 Ancoragem molecular***

Compreender os princípios pelos quais ligantes ou alvos, reconhecem e interagem com macromoléculas, como proteínas, é de grande relevância para a pesquisa e o desenvolvimento farmacêutico. Um dos métodos mais frequentemente usados é o *docking* ou ancoragem molecular, em razão da sua capacidade de prever com precisão a conformação de ligantes dentro do sítio de ligação apropriado. Por meio do *docking* molecular é possível investigar eventos moleculares, como modos de ligação do ligantes e as suas interações. Além de realizar predições da energia de ligação a partir da afinidade de ligação dos complexos ligante-receptor (FERREIRA *et al.*, 2015).

O *docking* pode ser realizado por diferentes metodologias, dentre as quais pode-se citar: ligantes e receptores rígidos, ligantes flexíveis e receptores rígidos e, ligantes e receptores flexíveis. A metodologia irá depender do software ou do servidor online utilizado (MENG *et al.*, 2011).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial de modulação do fármaco mebendazol no metabolismo tumoral gástrico através de ferramentas *in silico* e *in vitro*.

### 2.2 Objetivos específicos

- Analisar a atividade citotóxica do fármaco MBZ na linhagem tumoral gástrica AGP-01;
- Estudar as interações entre o MBZ e as proteínas da via glicolítica GLUT1, HK1, GAPDH e LDHA;
- Avaliar o perfil de expressão gênica dos genes *SLC2A1*, *HK1*, *GAPDH* e *LDHA* em amostras de adenocarcinoma;
- Avaliar a modulação dos transcritos *SLC2A1*, *HK1*, *GAPDH* e *LDHA* após o tratamento com o fármaco MBZ na linhagem AGP-01.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Preparo das moléculas e do alvo farmacológico

O banco de dados de proteína PDB (*Protein Data Bank* – <https://www.rcsb.org/>), foi usado para a busca das proteínas GLUT1, HK1, GAPDH e LDH. Buscou-se estruturas que possuíam resolução de raios-X menor que 2 Ångström (Å), e após a escolha da melhor estrutura foi realizado o download no formato “pdb”. O software PyMol® foi usado para a preparação das enzimas, onde foi feita a remoção das moléculas de água e dos ligantes nativos, que foram salvos separadamente para posterior utilização.

A estrutura bidimensional (2D) do fármaco mebendazol foi desenhada no software MarvinSketch® para a obtenção do código SMILE (*Simplified Molecular Input Line Entry Specification*). Em seguida, a estrutura foi convertida no esqueleto tridimensional (3D) por meio do programa Avogadro®, e otimizada geometricamente.

#### 3.2 Análise de *docking* molecular

Para a realização do *docking* molecular foi utilizado o servidor DockThor®, que possui como metodologia a utilização de ligantes flexíveis e receptores rígidos, por meio de um algoritmo genético e do campo de força molecular MMFF94S para a previsão do score de cada pose (DE MAGALHÃES *et al.*, 2014; HALGREN, 1996).

Foram realizados quatro *dockings* para cada enzima. No primeiro, foi utilizado apenas o mebendazol como ligante, já o segundo era composto somente pelos ligantes nativos da enzima. No terceiro foram utilizados os ligantes nativos e o fármaco concomitantemente, e por fim, foi utilizada a proteína já ancorada com o fármaco MBZ e adicionados os ligantes nativos.

Para encontrar as cavidades da proteína e o sítio de interação entre as moléculas, foram realizados *dockings* do tipo cego e em apenas uma das cadeias de cada enzima.

#### 3.3 Análise de expressão gênica *in silico* através de bancos de dados online

Para a análise de expressão *in silico* foi utilizada a ferramenta on-line GEPIA® (*Gene Expression Profiling Interactive Analysis* – <http://gepia.cancer-pku.cn/>), que disponibiliza dados gratuitos provenientes de estudos de transcriptoma de

amostras de câncer de todo mundo, incluindo o TCGA® (*The Cancer Genome Atlas* – <https://cancergenome.nih.gov/>) e GTEx® (*The Genotype-Tissue Expression* – <https://www.gtexportal.org/home/>) (TANG *et al.*, 2017). O banco de dados foi utilizado para analisar o perfil de expressão dos genes *SLC2A1*, *HK1*, *GAPDH* e *LDH* entre amostras normais e tumorais de tecidos provenientes de adenocarcinoma gástrico. Além disso, os dados de expressão também foram correlacionados com a taxa de sobrevivência dos pacientes a partir da ferramenta Kaplan Meier plotter® (<https://kmplot.com/analysis/>) (LÁNCZKY; GYÖRFFY, 2021).

### 3.4 Cultura celular

No presente estudo foi utilizada a linhagem celular derivada de tecido tumoral gástrico AGP-01 que foi estabelecida pelo nosso grupo de pesquisa a partir de adenocarcinoma tumoral gástrico (TABELA 1), sendo derivada de fluido ascítico gástrico do tipo intestinal (LEAL *et al.*, 2009). A linhagem foi cultivada em meio DMEM Low Glicose (Meio Eagle - Modificado por Dulbecco) (DA SILVA *et al.*, 2022), suplementado com 10% de SBF (Soro Bovino Fetal) e 1% de antibióticos (penicilina/estreptomicina 5000U/5000µg/mL), sendo mantida em estufa de cultura com atmosfera de CO<sub>2</sub> a 5%, a 37°C.

Tabela 1 – Característica da linhagem celular utilizada no estudo

<b>Linhagem</b>	<b>Tipo Histológico</b>	<b>Região</b>	<b>Classificação</b>	<b>Estadiamento</b>	<b>Referência</b>
AGP-01	Fluido ascítico de adenocarcinoma gástrico	Antro e corpo	Tipo intestinal	T3N2M1	LEAL <i>et al.</i> , 2009

Fonte: Elaborada pela autora.

O crescimento da cultura foi observado periodicamente com o auxílio de um microscópio invertido (Nikon® Eclipse TS100) até que fosse alcançada a confluência de 95%. A fim de estabelecer a manutenção celular, foi verificado o consumo de nutrientes contidos no meio de cultura através da modificação do pH e da coloração. Para os experimentos, o meio foi descartado, as células lavadas com tampão fosfato-salino (PBS) 1X e tripsinizadas para desprendê-las do fundo da garrafa.

### 3.5 Substâncias químicas

Para esse estudo, o anti-helmíntico Mebendazol foi adquirido comercialmente da marca Medley®. A partir de um comprimido de 500 mg, o MBZ foi macerado, pesado e dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO) para se obter um estoque a 1 mM nos ensaios subsequentes.

### 3.6 Análise de citotoxicidade por Alamar Blue

A citotoxicidade do fármaco MBZ foi avaliada através do composto fluorescente Alamar Blue (RAMPERSAD, 2012). Assim, a linhagem AGP-01 foi semeada em placas de 96 poços na concentração de  $3 \times 10^3$  células/poço e incubada em estufa de CO<sub>2</sub> por 24 horas. Após, foi realizado o tratamento com o MBZ em curva de diluição seriada (10 µM - 0,156 µM) por 72 horas, ao fim do tratamento foi adicionado o composto fluorescente Alamar Blue (0,2 mg/mL) (MERCK®) por 3 horas. Por fim, a fluorescência (Ex/Em: 530/590 nm) foi medida em espectrofotômetro (Beckman Coulter Microplate Reader DTX 880) e a concentração de inibição de 50% do crescimento (CI<sub>50</sub>) mensurada.

### 3.7 Extração de mRNA e análise de expressão gênica por RT-qPCR

A expressão gênica dos alvos farmacológicos foi realizada por meio de PCR em tempo real (qPCR). Primeiramente, em placa de 12 poços, a linhagem AGP-01 foi semeada na concentração de  $7 \times 10^4$  células/poço. Após 24 horas de cultivo a linhagem foi desagregada e a extração do RNA ocorreu por meio da adição de TRIzol® (Life Technologies) conforme as instruções do fabricante e, posteriormente, submetidas a transcrição reversa para obtenção do DNA complementar utilizando o kit High Capacity cDNA Reverse Transcriptase® (Thermo Scientific, EUA). A concentração e a qualidade do RNA foram determinadas usando o espectrofotômetro NanoDrop (Kisker, Germany) e gel de agarose 1%. As amostras foram mantidas sempre armazenadas a -80°C até o uso.

O PCR em tempo real foi realizado utilizando o equipamento ABI 7500 Real-Time PCR system (Applied Biosystems, EUA) e o sistema de detecção SYBR Green® Gene Expression Assay (Life technologies, EUA). Os transcritos analisados estão descritos na Tabela 2. Todos os experimentos de PCR em tempo real seguiram as exigências feitas por *Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments - MIQE Guidelines*

(BUSTIN *et al.*, 2009). O nível de expressão foi calculado usando o método  $\Delta\Delta C_t$ , normalizando as amostras em relação ao gene endógeno (*RPLP0*) utilizado (SCHMITTGEN; LIVAK, 2008).

Tabela 2 – Sequências de oligonucleotídeos usados na RT-qPCR

Gene	Sequência (5' - 3') Senso / Reverso	Referência da sequência (NCBI)
<i>SLC2A1</i>	TCCTGCCCTGTTGTGTATAG CAGGAGTGAGGTGGTGTATT	NM_006516.2
<i>HK1</i>	GATCACGTGGACAAAGGGT ACGTCCAGGTCAAATTCCTC	NM_001322364.1
<i>GAPDH</i>	GGTATCGTGGAAGGACTCAT CCATCACGCCACAGTTTC	NM_002046.6
<i>LDHA</i>	TCTGGATTTCAGCCCGATT TACAGGCACACTGGAATCTC	NM_005566.3
<i>RPLP0</i>	GCAATGTTGCCAGTGTCTG GCCTTGACCTTTTCAGCAA	NM_001002.4

Fonte: Elaborada pela autora.

### 3.8 Análise estatística

No ensaio de citotoxicidade celular, a  $CI_{50}$  será determinada através do percentual de inibição x log da concentração, sendo determinada a  $CI_{50}$  e seu intervalo de confiança (95%) a partir do método de regressão não-linear. Os dados quantitativos dos experimentos *in vitro* celulares e moleculares serão analisados a partir da média e do desvio padrão de três experimentos independentes. Para verificar a ocorrência de diferença significativa nos diferentes grupos e condições experimentais, os dados serão comparados por análise de variância (ANOVA) seguida por Teste de Bonferroni ou Tukey, com nível de significância de 95% ( $p < 0,05$ ), utilizando o software estatístico Prism 5.0 (GraphPad® Software).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Mebendazol demonstra atividade citotóxica na linhagem metastática gástrica AGP-01

No ensaio de citotoxicidade, como visualizado na Tabela 3, o fármaco MBZ apresentou elevada atividade citotóxica na linhagem tumoral gástrica avaliada, sendo a  $CI_{50}$  calculada de 0,11  $\mu\text{M}$  após 72 horas de tratamento na linhagem AGP-01. Dessa forma, a linhagem AGP-01 foi escolhida como modelo de estudo experimental para os demais estudos *in vitro*.

Em outra análise de citotoxicidade, desenvolvida por Daniel e colaboradores (2022), o MBZ é avaliado em duas linhagens de leucemia mieloide crônica, obtendo valores de  $CI_{50}$  de 0,1043  $\mu\text{M}$  e 1,9  $\mu\text{M}$ , e assim demonstrando uma alta atividade citotóxica como visto na linhagem AGP-01.

Tabela 3 – Atividade citotóxica do MBZ após 72 horas na linhagem metastática gástrica AGP-01

Linhagem	Tipo Histológico	MBZ $CI_{50}$ ( $\mu\text{M}$ ) (IC 95%)
AGP-01	Fluido ascítico de adenocarcinoma gástrico	0,11 (0,07 - 0,18)

Fonte: Elaborada pela autora.

### 4.2 Preparo das moléculas e do alvo farmacológico

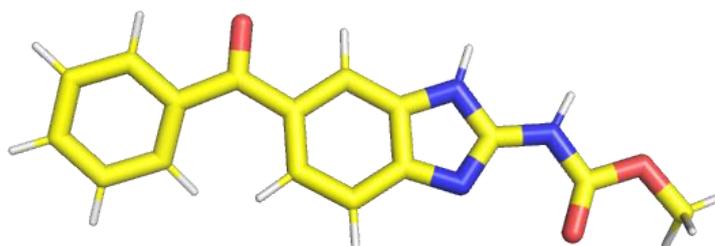
No PDB foram escolhidas as estruturas 6THA (2.40 Å), 1CZA (1.90 Å), 6YND (1.52 Å) e 5W8J (1.55 Å), representando as proteínas GLUT1, HK1, GAPDH e LDHA, respectivamente. Buscou-se preferencialmente as estruturas que possuíam uma resolução menor que 2.0 Å, porém não foi encontrada uma estrutura com esse parâmetro para a proteína GLUT1, sendo escolhida aquela que possuía a menor resolução das estruturas disponibilizadas pelo banco de dados.

Para o GLUT1, a estrutura escolhida possuía três ligantes nativos, hepta-etileno glicol (P33), nonil  $\beta$ -D-glicopiranosídeo (BNG) e íon cloreto (CL). A HK1 também possuía três ligantes, adenosina-5'-difosfato (ADP),  $\alpha$ -D-glicose 6-fosfato (G6P) e  $\alpha$ -D-glicopiranosose (GLC). Na estrutura da GAPDH havia apenas um, deca-etileno glicol (XPE) e a LDHA possuía

quatro, glicerol (GOL), ácido malônico (MLA), DMSO e o composto 2-{3-(3,4-difluorofenil)-5-hidroxi-4-[(4-sulfamoiil-fenil) metil]-1H-pirazol-1-il}-1,3-tiazol-4 ácido carboxílico (9Y7).

A estrutura desenhada e otimizada do MBZ utilizada para as análises de *docking* pode ser vista na Figura 3.

Figura 3 – Estrutura 3D do MBZ



Fonte: Elaborada pela autora.

### 4.3 Mebendazol demonstra alta interação com proteínas da via glicolítica

Para analisar as interações entre os ligantes e as proteínas, foram realizados *dockings* do tipo cego no servidor DockThor®. Na Tabela 4 se encontram as coordenadas e as dimensões do grid box, definidas de forma automática pelo próprio servidor.

Tabela 4 – Especificações utilizadas nas análises de *docking* molecular pelo servidor Dockthor

Proteína	PDB	Coordenadas			Dimensões
		X	Y	Z	
GLUT1	6THA	19,195	53,868	7,646	40 x 40 x 40
HK1	1CZA	34,852	49,673	21,177	40 x 40 x 40
GAPDH	6YND	-61,044	12,921	87,364	40 x 40 x 40
LDHA	5W8J	34,163	13,489	32,020	40 x 40 x 40

Fonte: Elaborada pela autora.

Na visualização do *docking* pelo software Pymol®, buscou-se por interações polares entre as proteínas de interesse e os alvos analisados.

### 4.3.1 Análise de interação com GLUT1

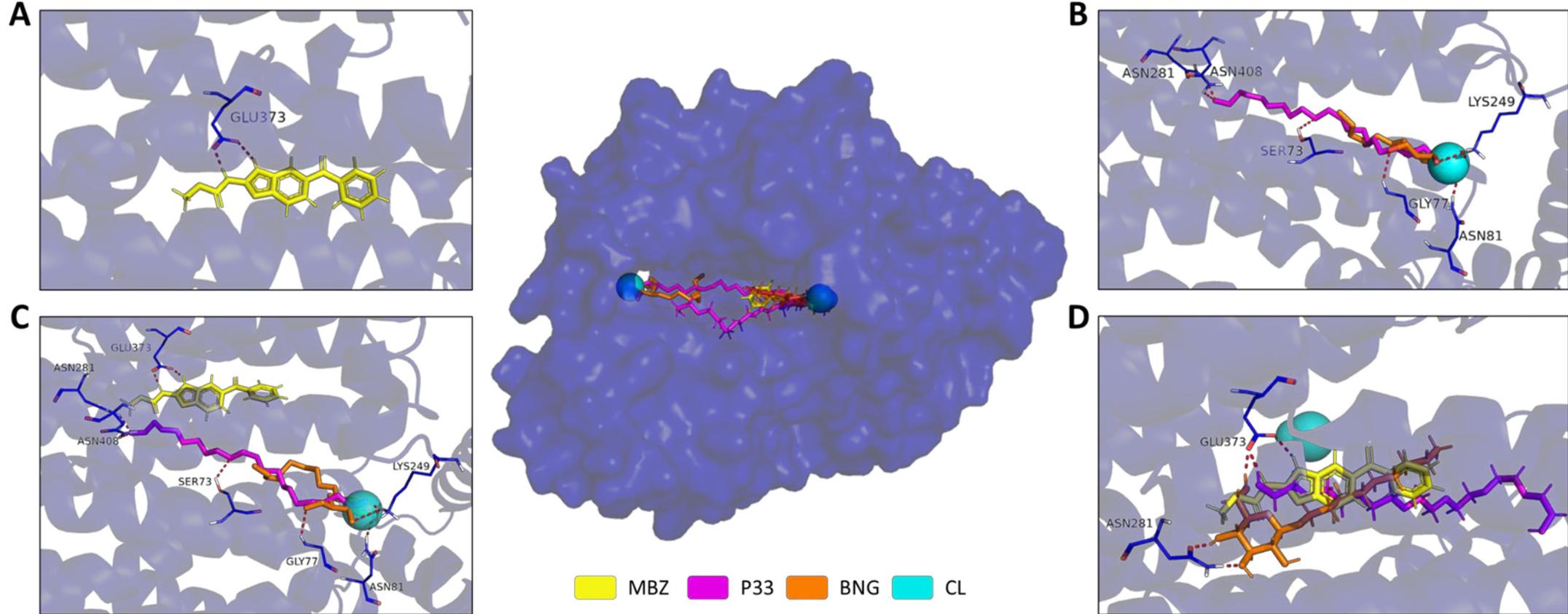
A Figura 4 mostra os quatro *dockings* realizados para a proteína GLUT1, codificada pelo gene *SLC2A1*. No ancoramento feito apenas com o MBZ (FIGURA 4A), é possível ver apenas uma interação com o aminoácido GLU373. Já na Figura 4B os ligantes nativos se ligaram em um sítio próximo e fizeram interações com os aminoácidos SER73, GLY77, ASN81, LYS249, ASN281 e ASN408.

No *docking* com o MBZ e os ligantes nativos de forma concomitante (FIGURA 4C), os ligantes permaneceram no mesmo sítio em que estavam nos *dockings* anteriores, inclusive realizando as interações polares com os mesmos resíduos, mas apesar disso, é possível ver que os ligantes P33 e BNG sofreram uma pequena mudança na sua conformação, o que podemos inferir como sendo um efeito causado pela adição do MBZ.

Por fim, na Figura 4D, onde foi utilizada a proteína ancorada com o MBZ e feito o *docking* com os ligantes nativos, é possível notar que os ligantes foram atraídos para o sítio de ligação em que o MBZ estava, inclusive alterando as interações com os aminoácidos. Nesse caso havendo apenas ligações com os resíduos ASN281 e GLU373.

Em um estudo desenvolvido por Chan e colaboradores (2011) que avalia o GLUT1 como um alvo para o carcinoma de células renais é utilizado um ligante que faz interações com os resíduos ARG126 e TRP412, considerados essenciais para o transporte ideal de glicose visto que a mutação de um deles inibe o transporte de glicose. Conforme observado na Figura 4, nenhum dos ligantes analisados fazem interações com esses resíduos, porém é importante destacar que por ter sido realizado *dockings* que englobassem toda a molécula, o servidor ancorou os ligantes nos sítios que demonstraram ter a melhor ligação. Dessa forma, em futuros estudos, pode-se realizar *dockings* específicos para determinados sítios e assim avaliar quais proporcionam a melhor ligação entre proteína e ligante.

Figura 4 – Análise de *docking* molecular da proteína GLUT1



Fonte: Elaborada pela autora.

(A) *Docking* da proteína com o ligante MBZ; (B) *Docking* da proteína com os ligantes nativos; (C) *Docking* da proteína com o MBZ e os ligantes nativos simultaneamente; (D) *Docking* da proteína ancorada com o MBZ com os ligantes nativos.

Na Tabela 5 é possível observar os valores de score obtido para cada ligante utilizado nos diferentes *dockings*. Nos *dockings* em que estava presente, o MBZ apresentou o menor score, dessa forma indicando uma interação mais forte com a proteína em comparação com os ligantes nativos.

Tabela 5 – Score obtido pelo servidor DockThor para cada ligante utilizado nos *dockings* da proteína GLUT1

Ligantes	Score (kcal/mol)			
	Tipo de <i>docking</i>			
	Fármaco	Ligantes Nativos	Fármaco + Ligantes Nativos	Fármaco Docado + Ligantes Nativos
MBZ	<b>-8,560</b>	*	<b>-8,601</b>	<b>-8,560</b>
P33	*	<b>-8,457</b>	-8,457	-7,362
BNG	*	-7,743	-7,743	-8,228
CL	*	-5,824	-5,824	-5,873

Fonte: Elaborada pela autora.

\*não participou do *docking*.

MBZ: Mebendazol. P33: hepta-etileno. BNG: nonil  $\beta$ -D-glicopiranosídeo. CL: íon cloreto.

#### 4.3.2 Análise de interação com HK1

A Figura 5 mostra os quatro *dockings* realizados para a proteína HK1. Os ligantes nativos da Figura 5B se ancoraram em uma região diferente do MBZ na Figura 5A, com o MBZ fazendo interações com os aminoácidos GLU101 e ARG159 e os ligantes nativos com ARG15, ASP69, ASP194, ARG292, LYS300, ARG316, ASP398, SER400, ARG410 e ARG411.

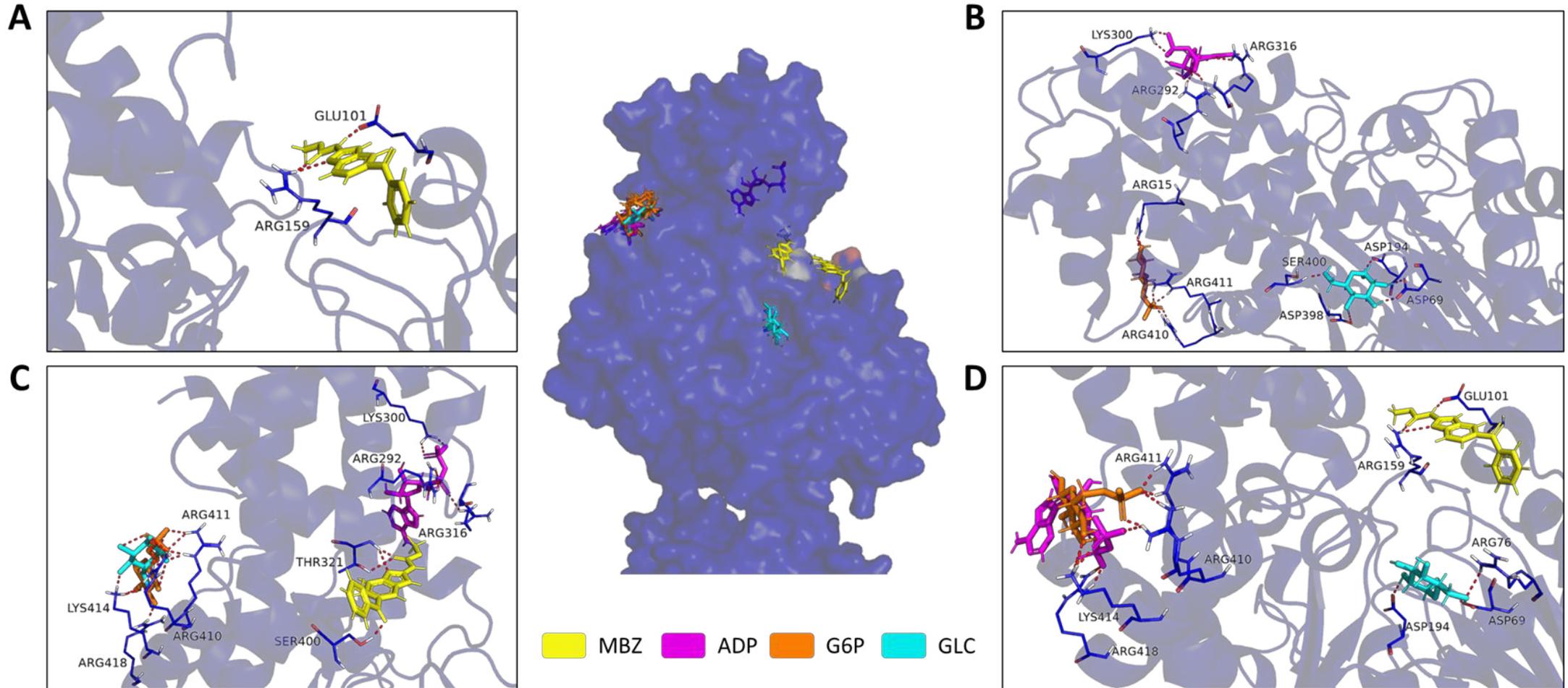
Na Figura 5C, onde foi feito o *docking* com todos os ligantes de forma simultânea, o MBZ interagiu com outra região, ficando mais próximo do ligante ADP e ocupando uma posição antes ocupada pelo ligante GLC, que por sua vez se deslocou para o sítio em que está ancorado o ligante G6P. Essas mudanças conformacionais fizeram com que o MBZ interagisse com os aminoácidos THR321 e SER400, e os ligantes nativos ligaram-se nos resíduos ARG292, LYS300, ARG316, THR321, SER400, ARG410, ARG411, LYS414 e ARG418.

E na Figura 5D, o fato de o MBZ já estar docado com a proteína também ocasionou em algumas mudanças nas conformações dos outros ligantes. Nesse caso o ligante ADP se deslocou para o sítio próximo do ligante G6P e o ligante GLC ficou em uma região próxima à nativa em que se encontrava na Figura 5B. Por conta disso, os ligantes nativos interagiram com ASP69, ARG76, ARG194, ARG410, ARG411, LYS414 e ARG418.

Essa mesma estrutura da HK1 foi utilizada em um estudo realizado por Kulkarni *et al.* (2022). Os ligantes analisados fizeram apenas interações hidrofóbicas com os resíduos

ASP79, HIS99, LYS146, LYS147, LEU148, PRO149, ALA458, TYR461, LYS481, LYS880 e LYS885. E como mostra a Figura 5, são interações diferentes das aqui observadas, ou seja, mostrando que tanto o MBZ como os ligantes nativos dessa estrutura foram ancorados em outros sítios de ligação, que segundo o servidor DockThor® seriam a melhor posição para essas moléculas.

Figura 5 - Análise de *docking* molecular da proteína HK1



Fonte: Elaborada pela autora.

(A) Docking da proteína com o ligante MBZ; (B) Docking da proteína com os ligantes nativos; (C) Docking da proteína com o MBZ e os ligantes nativos simultaneamente; (D) Docking da proteína ancorada com o MBZ com os ligantes nativos.

Na Tabela 6 é mostrado os scores obtidos, é possível notar que o MBZ apresentou a melhor energia de ligação, com diferenças bastantes significativas em relação aos outros ligantes.

Tabela 6 – Score obtido pelo servidor DockThor para cada ligante utilizado nos *dockings* da proteína HK1

Ligantes	Score (kcal/mol)			
	Tipo de <i>docking</i>			
	Fármaco	Ligantes Nativos	Fármaco + Ligantes Nativos	Fármaco Docado + Ligantes Nativos
MBZ	<b>-7,457</b>	*	<b>-7,592</b>	<b>-7,457</b>
ADP	*	<b>-7,486</b>	-7,486	-6,932
G6P	*	-6,438	-6,989	-6,404
GLC	*	-5,770	-6,920	-5,776

Fonte: Elaborada pela autora.

\*não participou do *docking*.

MBZ: Mebendazol. ADP: Adenosina-5'-difosfato. G6P:  $\alpha$ -D-glicose 6-fosfato. GLC:  $\alpha$ -D-glicopiranosose

#### 4.3.3 Análise de interação com GAPDH

Na Figura 6 é possível observar os *dockings* realizados para a proteína GAPDH. Nas Figuras 6A e 6C pode-se notar que o MBZ se ancorou no mesmo sítio de ligação, inclusive interagindo com os mesmos aminoácidos nos dois casos, ARG15 e ASP34.

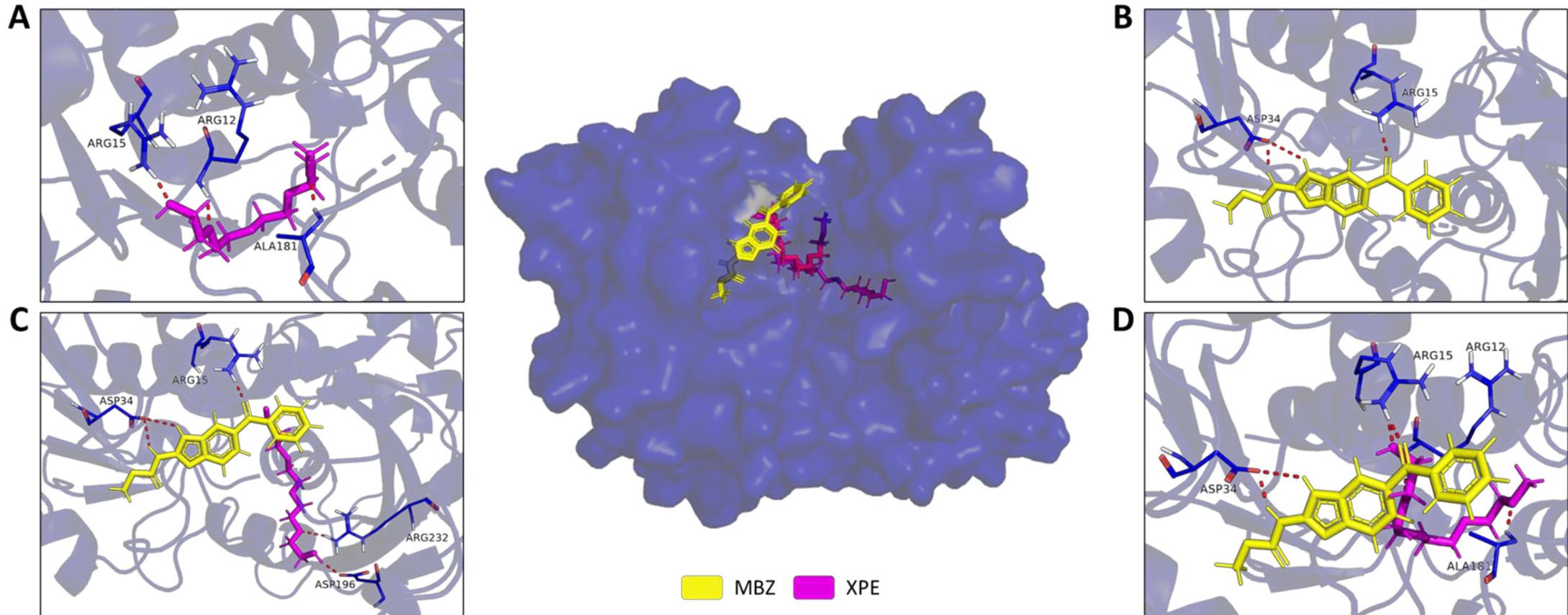
Na *docking* do ligante nativo XPE, é visto que ela faz ligações com ARG12, ARG15 e ALA181 (FIGURA 6B). Ao comparar com a Figura 6C, percebe-se que a presença do MBZ fez com que o XPE adotasse uma outra conformação estrutural, e fizesse interação com os aminoácidos ASP196 e ARG232.

Na Figura 6D, apesar da proteína está ancorada com o MBZ, o XPE manteve as mesmas interações que realizou na Figura 6B, quando a proteína foi ancorada somente com ele.

Ao comparar esses achados com outros estudos, é possível identificar diferentes interações. De acordo com Noh *et al.* (2021) e sua pesquisa envolvendo a descoberta de novas moléculas para o tratamento da tuberculose, é visto que o ligante testado faz ligações de hidrogênio com os resíduos ASN8, GLY9, GLY11, ARG12, GLY14, ASN33, ASP34, ARG78, ALA96 e THR97. É possível notar que o MBZ e XPE fazem interações com os aminoácidos ARG12 e ASP34, além de interações com outros resíduos próximos dos observados por esses pesquisadores.

Em um outro estudo envolvendo o desenvolvimento de novas alternativas para o tratamento de infecções parasitárias, o pesquisador encontrou ligações polares com os resíduos ARG15, ILE13 e ASP38 (ALKHALDI *et al.*, 2019), inclusive o resíduo ARG15 também fez interações com o MBZ e o XPE. A partir desses achados, pode-se concluir que o sítio de ligação encontrado pelo DockThor® é uma boa opção para o ancoramento das moléculas analisadas.

Figura 6 - Análise de *docking* molecular da proteína GAPDH



Fonte: Elaborada pela autora.

(A) *Docking* da proteína com o ligante MBZ; (B) *Docking* da proteína com o ligante nativo; (C) *Docking* da proteína com o MBZ e o ligante nativo simultaneamente; (D) *Docking* da proteína ancorada com o MBZ com o ligante nativo.

Em relação aos scores obtidos para o GAPDH, é possível visualizar na Tabela 7 que o MBZ obteve o menor score, demonstrando que ele possui uma energia de ligação melhor do que a do ligante nativo.

Tabela 7 – Score obtido pelo servidor DockThor para cada ligante utilizado nos *dockings* da proteína GAPDH

Ligantes	Score (kcal/mol)			
	Tipo de <i>docking</i>			
	Fármaco	Ligante Nativo	Fármaco + Ligante Nativo	Fármaco Docado + Ligante Nativo
MBZ	<b>-7,195</b>	*	<b>-7,230</b>	<b>-7,195</b>
XPE	*	<b>-6,904</b>	-6,742	-6,862

Fonte: Elaborada pela autora.

\*não participou do *docking*.

MBZ: Mebendazol. XPE: deca-etileno glicol.

#### 4.3.4 Análise de interação com LDHA

Na Figura 7 são exibidos os *dockings* realizados para a proteína LDHA. É possível notar que o MBZ, em todos os *dockings* que participou (FIGURA 7A, FIGURA 7C e FIGURA 7D), interagiu apenas com os aminoácidos ARG168 e ASP255. Na Figura 7B, os ligantes nativos se ligaram nos resíduos ASP138, ARG166, GLU189, LYS242, THR245, SER246, TRP247 e ALA248.

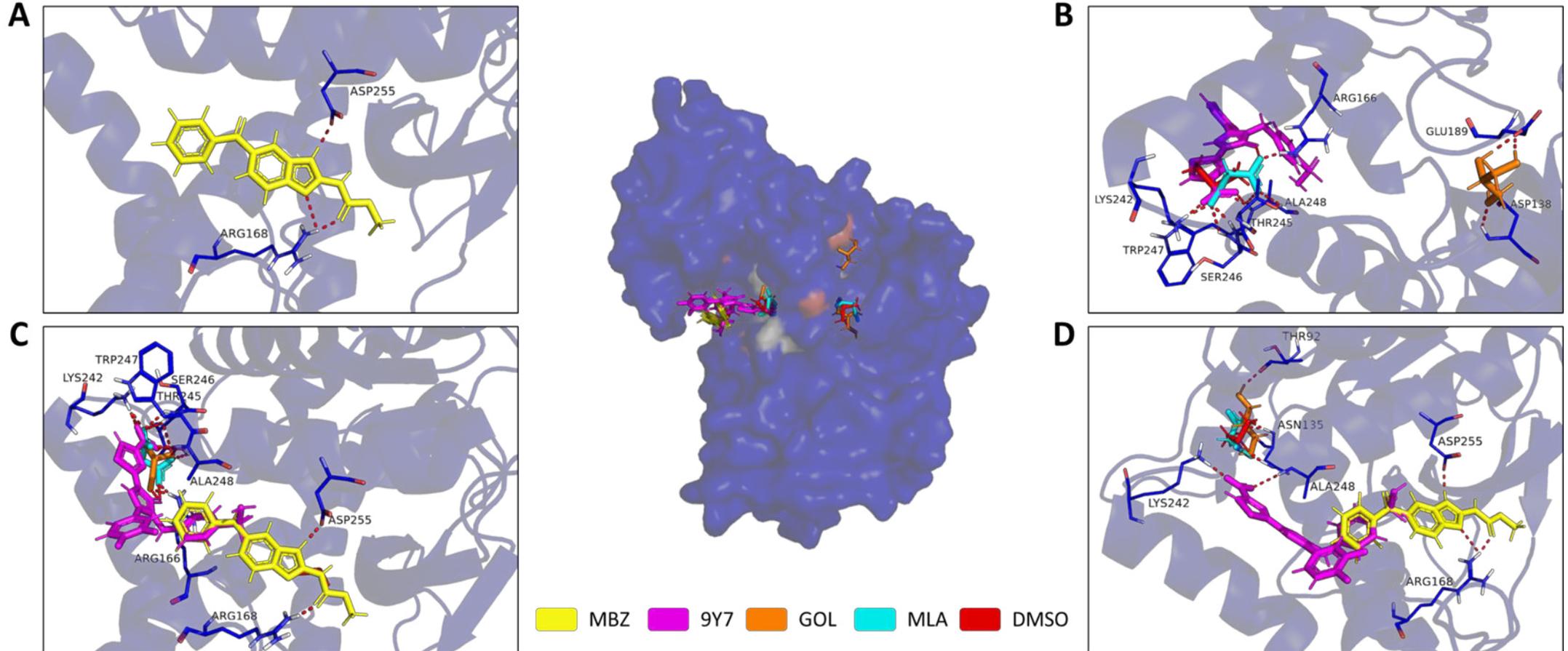
No *docking* com todas as moléculas analisadas de forma simultânea (FIGURA 7C), os ligantes nativos interagiram com os mesmos aminoácidos que interagiram na Figura 7B, com exceção do ASP138 e GLU189, devido ao fato do ligante GOL ter se deslocado para outra região.

Na ancoragem da Figura 7D, onde o MBZ já se encontrava docado com a proteína, foi visto algumas modificações nas interações com os aminoácidos. Nesse caso os ligantes nativos se ligaram apenas com os resíduos THR92, ASN135, ARG168, LYS242, ALA248 e ASP255.

Sun e colaboradores (2016) testaram compostos com o objetivo de atuarem como inibidores da LDHA no câncer pancreático. Por meio de análises *in silico* verificou-se que os compostos faziam interações com ASP52, GLY97, ARG99 e ARG112. Em outro estudo, realizado por Pandey *et al.* (2019), envolvendo a análise de *docking* molecular do anti-inflamatório diclofenaco para possíveis usos na terapêutica do câncer, foram encontradas interações com os resíduos ARG105, ASN137, PRO138, VAL139, ASP140, ILE141, GLU191,

HIS192, GLY193, ASP194, SER195, TYR238 e LEU322. Apesar desses resultados terem se mostrado diferentes, AMR e colaboradores (2020) analisaram outros compostos com potencial anticancerígeno e obtiveram interações com os aminoácidos ASN137, ARG168, HIS192, TYR238 e THR247. Dentre os resíduos encontrados, apenas a ARG168 se mostrou como uma ligação em comum com os resultados obtidos pelo DockThor®.

Figura 7 - Análise de *docking* molecular da proteína LDHA



Fonte: Elaborada pela autora.

(A) *Docking* da proteína com o ligante MBZ; (B) *Docking* da proteína com os ligantes nativos; (C) *Docking* da proteína com o MBZ e os ligantes nativos simultaneamente; (D) *Docking* da proteína ancorada com o MBZ com os ligantes nativos.

Na Tabela 8 é mostrado os scores obtidos de cada ligante para o LDHA. Os valores mostram que dentre os ligantes, o que obteve o menor score foi o 9Y7 em todos os *dockings* que participou, seguido pelo MBZ.

Tabela 8 – Score obtido pelo servidor DockThor para cada ligante utilizado nos *dockings* da proteína LDHA

Ligantes	Score (kcal/mol)			
	Tipo de <i>docking</i>			
	Fármaco	Ligantes Nativos	Fármaco + Ligantes Nativos	Fármaco Docado + Ligantes Nativos
MBZ	<b>-7,550</b>	*	-7,405	-7,550
DMSO	*	-6,441	-5,955	-6,180
9Y7	*	<b>-8,360</b>	<b>-8,360</b>	<b>-8,401</b>
GOL	*	-6,170	-6,436	-6,070
MLA	*	-6,226	-6,057	-5,556

Fonte: Elaborada pela autora.

\*não participou do *docking*.

MBZ: Mebendazol. DMSO: dimetilsulfóxido. GOL: Glicerol. MLA: ácido malônico. 9Y7: 2-{3-(3,4-difluorofenil)-5-hidroxi-4-[(4-sulfamoiil-fenil) metil]-1H-pirazol-1-il}-1,3-tiazol-4 ácido carboxílico.

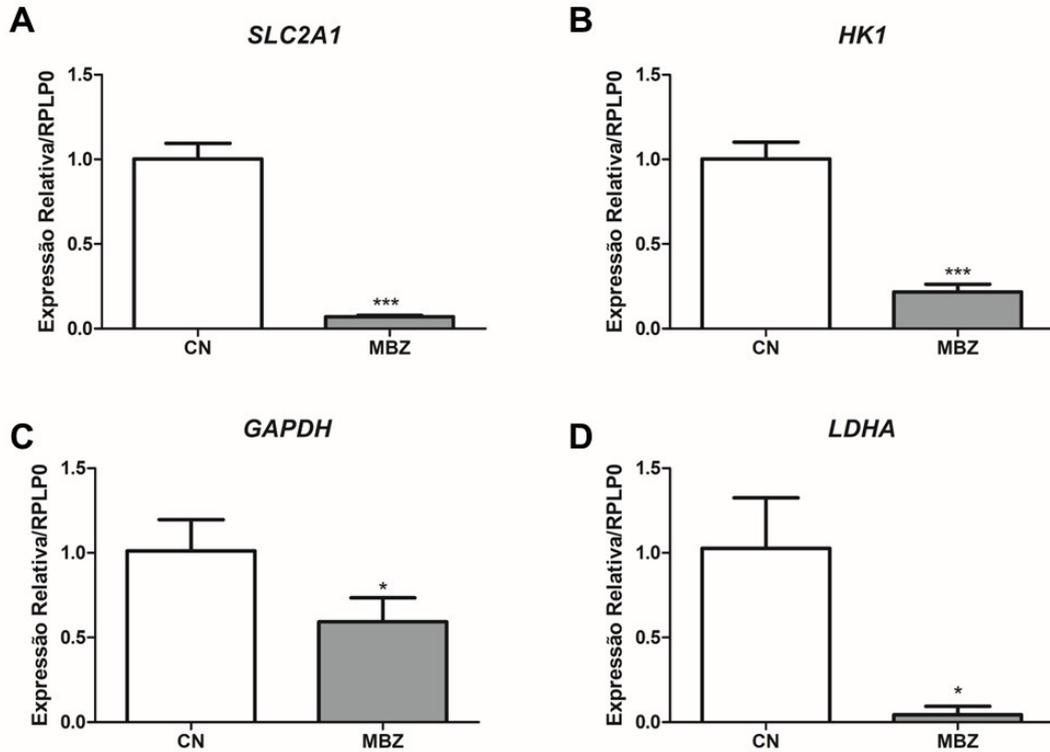
#### 4.4 O fármaco mebendazol leva a diminuição na expressão de genes da via glicolítica na linhagem AGP-01

Para entender melhor as modificações moleculares causadas pelo MBZ no metabolismo da linhagem AGP-01, foi realizada a análise da expressão gênica nos genes relacionados a via glicolítica (*SLC2A1*, *HK1*, *GAPDH* e *LDHA*) por RT-qPCR. Conforme mostrado na Figura 8, o MBZ diminuiu significativamente a expressão gênica de todos os genes avaliados ( $p < 0,0001$  para *SLC2A1* e *HK1* e  $p < 0,05$  para *GAPDH* e *LDHA*) após 24 horas de tratamento em uma concentração não citotóxica. Os resultados mostram que o MBZ modula a concentração de mRNA de genes ligados a via glicolítica.

A modulação ocasionada pelo MBZ pode estar relacionada ao potencial antitumoral desse fármaco na linhagem tumoral gástrica AGP-01, visto que apresentou uma alta atividade citotóxica nessa linhagem. Em um estudo realizado por Xintaropoulou *et al.* (2015), é analisada a inibição de enzimas da via glicolítica em linhagens de câncer de mama e ovário. Nas linhagens de câncer de mama, os menores valores de  $CI_{50}$  dos inibidores de GLUT1 foram 36  $\mu$ M, 44  $\mu$ M, 0,17  $\mu$ M e 5,2  $\mu$ M e os inibidores de LDHA obtiveram 27 mM e 8  $\mu$ M. Nas linhagens de câncer de ovário, foram obtidos  $CI_{50}$  de 51  $\mu$ M, 21  $\mu$ M, 0,15  $\mu$ M e 1,4  $\mu$ M para os inibidores de GLUT1

e 24 mM e 28  $\mu$ M para os de LDHA. Nesse estudo não foi correlacionada diferença significativa na expressão das enzimas em todas as linhagens e a sua sensibilidade aos inibidores.

Figura 8 – MBZ modula a expressão gênica de genes relacionados ao metabolismo na linhagem celular AGP-01



Fonte: Elaborada pela autora.

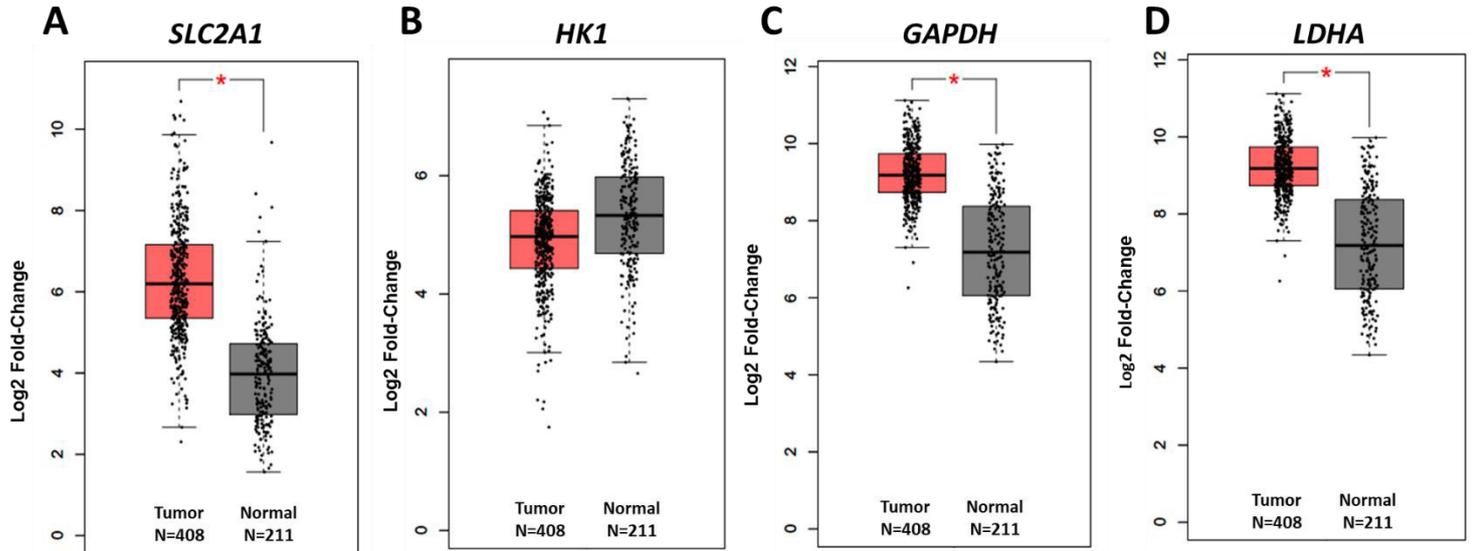
Após 24 horas de exposição celular ao MBZ, o mRNA total foi extraído e os níveis de transcritos de (A) *SLC2A1*, (B) *HK1*, (C) *GAPDH* e (D) *LDHA* foram analisados. A expressão gênica foi normalizada pelo gene endógeno *RPLP0*, e o grupo CN foi utilizado como calibrador do experimento. Os dados são apresentados como a média  $\pm$  SD de três experimentos independentes, a análise estatística foi realizada com o teste t. Diferenças significativas: \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,0001$ . MBZ: Mebendazol. CN: Controle negativo.

#### 4.5 Análise de expressão gênica em banco de dados mostra que genes da via glicolítica estão hiperexpressos em pacientes diagnosticados com câncer gástrico

Para identificar possíveis alvos na reprogramação metabólica, a expressão global de genes relacionados a via glicolítica foi realizada utilizando o banco de dados online GEPIA®. Conforme mostrado na Figura 9, o banco de dados avaliou a expressão gênica de 408 amostras de CG e 211 amostras de tecidos normais adjacentes, as análises mostraram que os genes da via glicolítica *SLC2A1*, *GAPDH* e *LDHA* apresentaram hiperexpressão em amostras de CG quando comparados as amostras normais ( $p < 0,05$ ), e apenas o gene *HK1* não apresentou diferença estatística. Porém, deve ser considerado que no banco de dados analisado não há

diferenciação das linhagens tumorais gástricas, é apenas analisados os pacientes que possuem o tumor, portanto, esse gene pode ser hiperexpresso em determinadas linhagens tumorais e em outras não, assim afetando a expressão global analisada pelo banco de dados GEPIA®, em razão da expressão desse gene já ter sido considerada aumentada no CG (GAO *et al.*, 2015).

Figura 9 – Genes relacionados ao metabolismo são superexpressos no CG



Fonte: Elaborada pela autora.

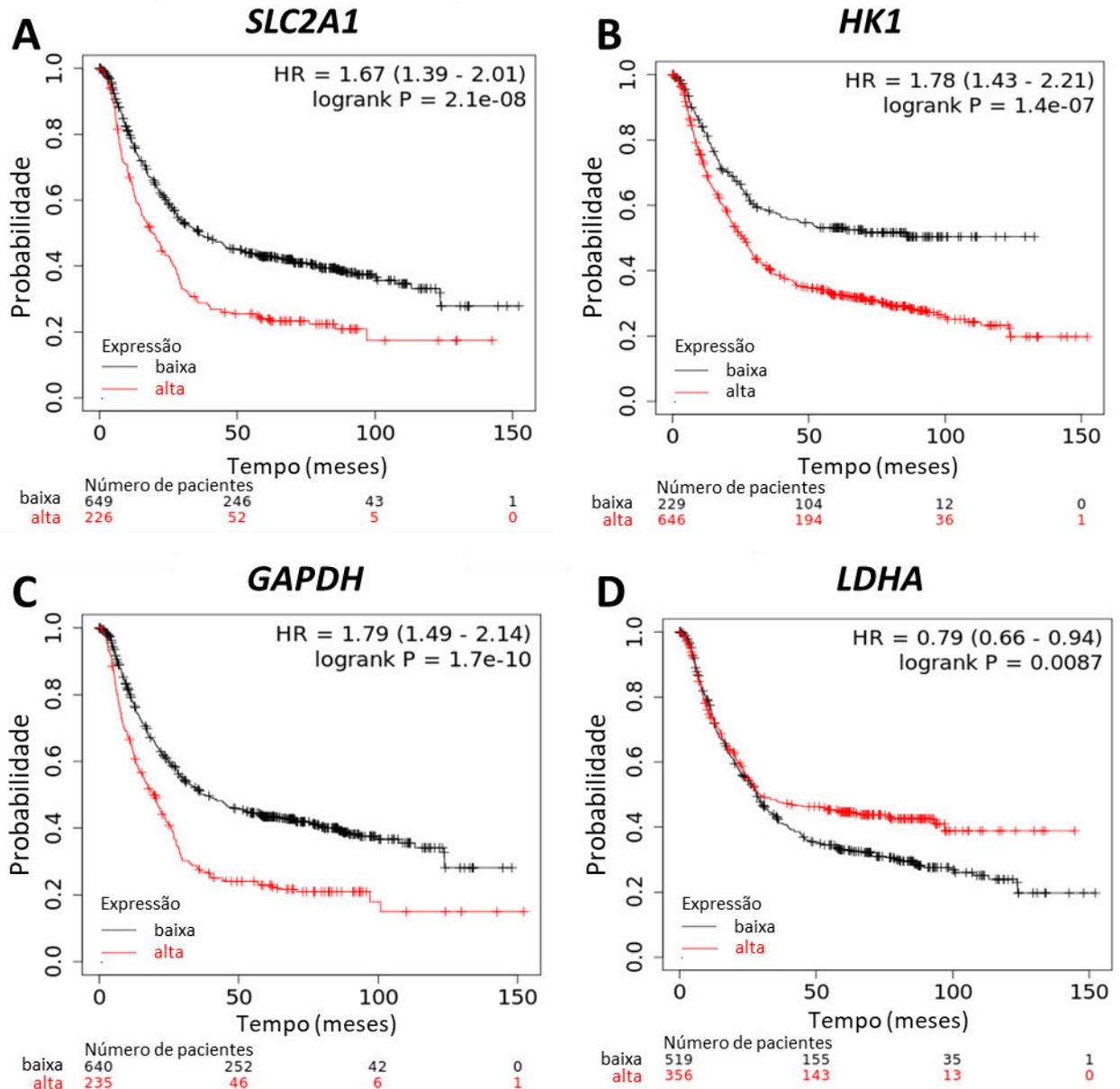
A expressão global dos genes relacionados ao metabolismo *SLC2A1*, *HK1*, *GAPDH* e *LDHA* foi analisada por banco de dados online. O conjunto de dados GEPIA® mostra a expressão dos genes (A) *SLC2A1*, (B) *HK1*, (C) *GAPDH* e (D) *LDHA* em amostras de CG (boxplot vermelho). Diferenças significativas: \* $p < 0,05$ .

#### 4.6 Análise em banco de dados mostra que a alta expressão de genes da via glicolítica está relacionada com a diminuição na sobrevida de pacientes com câncer gástrico

Em seguida, foi utilizado o servidor online Kaplan Meier plotter® para visualizar a curva de sobrevivência de pacientes com alta e baixa expressão dos genes da via glicolítica estudados. Foi observado que os genes *SLC2A1*, *HK1* e *GAPDH* quando altamente expressos levaram a uma redução na taxa de sobrevida global (SG) em pacientes com CG (FIGURA 10). Apenas o aumento da expressão do gene *LDHA* não foi relacionada a uma piora na taxa de sobrevida dos pacientes com CG (FIGURA 10D). Assim, os dados reafirmam a importância da reprogramação metabólica para o desenvolvimento do câncer, sendo potenciais biomarcadores de mau prognóstico no CG, os resultados também destacam as vias metabólicas como importantes alvos farmacológicos na terapia do CG e corroboram com os achados de Kolev e colaboradores (2008), que apontaram uma correlação entre o aumento da agressividade do

tumor com a atividade intrínseca da via glicolítica regulada positivamente, inferindo que esse fenótipo leva a uma vantagem proliferativa no desenvolvimento tumoral.

Figura 10 – A hiperexpressão de genes metabólicos leva a modificação na taxa de sobrevivência global



Fonte: Elaborada pela autora.

Análises realizadas pela plataforma Kaplan Meier plotter® mostraram a relação da expressão alta ou baixa dos genes (A) *SLC1A1*, (B) *HK1*, (C) *GAPDH* e (D) *LDHA* com a sobrevivência dos pacientes com câncer gástrico.

## 5 CONCLUSÕES

O presente trabalho apresentou mais detalhes a respeito do mecanismo de ação do fármaco MBZ na terapia antitumoral gástrica. Os resultados demonstraram que o perfil citotóxico do fármaco pode estar ligado a sua capacidade de modulação da expressão e inibição das proteínas GLUT1, HK1, GAPDH e LDHA. Essas, por sua vez, se mostraram geralmente hiperexpressas em pacientes com CG, levando a um pior prognóstico e diminuição da expectativa de vida. Dessa forma, essas proteínas se tornam ótimos alvos farmacológicos com base no metabolismo tumoral, enfatizando ainda mais o potencial do MBZ como futuro quimioterápico na terapia antitumoral gástrica.

Apesar dos resultados obtidos, ainda são necessários mais estudos para verificar em ampla escala o papel desse fármaco na inibição metabólica tumoral e o seu potencial antitumoral gástrico *in vivo*.

## REFERÊNCIAS

- ALKHALDI, A. A. M. *et al.* Synthesis, antimicrobial activities and GAPDH *docking* of novel 1, 2, 3-triazole derivatives. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 18, n. 5, p. 1101-1108, 2019.
- AMR, A. E. G. E. *et al.* Chiral Pyridine-3,5-bis- (L-phenylalaninyl-L-leucinyl) Schiff Base Peptides as Potential Anticancer Agents: Design, synthesis, and molecular *docking* studies targeting lactate dehydrogenase-A. **Molecules**, v. 25, n. 5, p. 1-21, 2020.
- BAI, R. Y. *et al.* Antiparasitic mebendazole shows survival benefit in 2 preclinical models of glioblastoma multiforme. **Neuro-Oncology**, v. 13, n. 9, p. 974-982, 2011.
- BAI, R. Y. *et al.* Brain Penetration and Efficacy of Different Mebendazole Polymorphs in a Mouse Brain Tumor Model. **Clinical Cancer Research**, v. 21, n. 15, p. 3462-3470, 2015a.
- BAI, R. Y. *et al.* Effective treatment of diverse medulloblastoma models with mebendazole and its impact on tumor angiogenesis. **Neuro-Oncology**, v. 17, n. 4, p. 545-554, 2015b.
- BUSTIN, S. A. *et al.* The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611-622, 2009.
- CHAI, J. Y.; JUNG, B. K.; HONG, S. J. Albendazole and Mebendazole as Anti-Parasitic and Anti-Cancer Agents: an Update. **Korean Journal of Parasitology**, v. 59, n. 3, p. 189-225, 2021.
- CHAN, D. A. *et al.* Targeting GLUT1 and the Warburg Effect in Renal Cell Carcinoma by Chemical Synthetic Lethality. **Science Translational Medicine**, v. 3, n. 94, p. 1-9, 2011.
- CHUNG, H. C. *et al.* Adjuvant capecitabine and oxaliplatin for gastric cancer after D2 gastrectomy (CLASSIC): a phase 3 open-label, randomised controlled trial. **Lancet**, v. 379, n. 9813, p. 315–321, 2012.
- DA SILVA, E. L. *et al.* Differences in glucose concentration shows new perspectives in gastric cancer metabolism. **Toxicology in Vitro**, v. 82, n. 1, p. 1-13, 2022.
- DANIEL, J. P. *et al.* Anticancer potential of mebendazole against chronic myeloid leukemia: in silico and in vitro studies revealed new insights about the mechanism of action. **Frontiers in Pharmacology**, v. 13, n. 1, p. 1-11, 2022.
- DE MAGALHÃES, C. S. *et al.* A dynamic niching genetic algorithm strategy for *docking* highly flexible ligands. **Information Sciences**, v. 289, n. 1, p. 206-224, 2014.
- DEBERARDINIS, R. J.; CHANDEL, N. S. Fundamentals of cancer metabolism. **Science advances**, v. 2, n. 5, p. 1-18, 2016.
- ELAYAPILLAI, S. *et al.* Potential and mechanism of mebendazole for treatment and maintenance of ovarian cancer. **Gynecologic Oncology**, v. 160, n. 1, p. 302-311, 2021.

FENG, Y. *et al.* Lactate dehydrogenase A: A key player in carcinogenesis and potential target in cancer therapy. **Cancer Medicine**, v. 7, n. 12, p. 6124-6136, 2018.

FERREIRA, L. G. *et al.* Molecular Docking and Structure-Based Drug Design Strategies. **Molecules**, v. 20, n. 7, p. 13384-13421, 2015.

GANAPATHY-KANNIAPPAN, S. Molecular intricacies of aerobic glycolysis in cancer: current insights into the classic metabolic phenotype. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 53, n. 6, p. 667-682, 2018.

GAO, Y. *et al.* Overexpression of metabolic markers HK1 and PKM2 contributes to lymphatic metastasis and adverse prognosis in Chinese gastric cancer. **Int J Clin Exp Pathol**, v. 8, n. 8, p. 9264-9271, 2015.

HALGREN, T. A. Merck Molecular Force Field. I. Basis, Form, Scope, Parameterization, and Performance of MMFF94\*. **Journal of Computational Chemistry**, v. 17, n. 5-6, p. 490-519, 1996.

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

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.

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

INCA. **Como surge o câncer?**. Rio de Janeiro, 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/como-surge-o-cancer/>. Acesso em: 23 ago. 2022.

INCA. **O que é câncer?**. Rio de Janeiro, 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/o-que-e-cancer/>. Acesso em: 23 ago. 2022.

INCA. **Síntese de Resultados e Comentários**. Rio de Janeiro, 2020. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/estimativa/sintese-de-resultados-e-comentarios/>. Acesso em: 21 set. 2022.

KIM, I.-H. Current status of adjuvant chemotherapy for gastric cancer. **World Journal of Gastrointestinal Oncology**, v. 11, n. 9, p. 679-685, 2019.

KOLEV, Y. *et al.* Lactate dehydrogenase-5 (LDH-5) expression in human gastric cancer: Association with hypoxia-inducible factor (HIF-1 $\alpha$ ) pathway, angiogenic factors production and poor prognosis. **Annals of Surgical Oncology**, v. 15, n. 8, p. 2336-2344, 2008.

KOUKOURAKIS, M. I. *et al.* Serum and tissue ldh levels in patients with breast/gynaecological cancer and benign diseases. **Gynecologic and Obstetric Investigation**, v. 67, n. 3, p. 162-168, 2009.

KULKARNI, P. *et al.* Novel Hexokinase Inhibition by *Glycyrrhiza glabra*: Therapeutic Uses in COVID. **Journal of Medicine and Public Health**, v. 3, n. 1032, p. 50-58, 2022.

KUNKEL, M. *et al.* Overexpression of Glut-1 and Increased Glucose Metabolism in Tumors Are Associated with a Poor Prognosis in Patients with Oral Squamous Cell Carcinoma. **Cancer**, v. 97, n. 4, p. 1015-1024, 2003.

LÁNCZKY, A.; GYÓRFFY, B. Web-Based Survival Analysis Tool Tailored for Medical Research (KMplot): Development and Implementation. **Journal of Medical Internet Research**, v. 23, n. 7, p. e27633, 2021.

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, 2009.

LI, X. B.; GU, J. D.; ZHOU, Q. H. Review of aerobic glycolysis and its key enzymes - new targets for lung cancer therapy. **Thoracic Cancer**, v. 6, n. 1, p. 17-24, 2015.

LI, Y. *et al.* Prognostic Significance and Related Mechanisms of Hexokinase 1 in Ovarian Cancer. **OncoTargets and Therapy**, v. 13, n. 1, p. 11583–11594, 2020.

LIBERTI, M. V.; LOCASALE, J. W. The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? **Trends in Biochemical Sciences**, v. 41, n. 3, p. 211-218, 2016.

LIU, W. *et al.* Xanthohumol inhibits colorectal cancer cells via downregulation of Hexokinases II-mediated glycolysis. **Int. J. Biol. Sci**, v. 15, n. 11, p. 2497-2508, 2019.

LUENGO, A.; GUI, D. Y.; VANDER HEIDEN, M. G. Targeting Metabolism for Cancer Therapy. **Cell Chemical Biology**, v. 24, n. 9, p. 1161-1180, 2017.

MACHLOWSKA, J. *et al.* Gastric Cancer: Epidemiology, Risk Factors, Classification, Genomic Characteristics and Treatment Strategies. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 11, p. 1-20, 2020.

MENG, X.-Y. *et al.* Molecular Docking: A Powerful Approach for Structure-Based Drug Discovery. **Current Computer-Aided Drug Design**, v. 7, n. 2, p. 146-157, 2011.

MOCELLIN, S. *et al.* Extent of lymph node dissection for adenocarcinoma of the stomach. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 2015, n. 8, p. 1-35, 2015.

MUKHOPADHYAY, T. *et al.* Mebendazole Elicits a Potent Antitumor Effect on Human Cancer Cell Lines Both in Vitro and in Vivo. **Clinical Cancer Research**, v. 8, n. 9, p. 2963-2969, 2002.

NATIONAL CANCER INSTITUTE. **What is cancer?**. 2021. Disponível em: <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>. Acesso em: 23 ago. 2022.

NOH, M. A. A. *et al.* Discovery of new targeting agents against GAPDH receptor for antituberculosis drug delivery. **Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology**, v. 32, n. 4, p. 715-722, 2021.

- ORDITURA, M. *et al.* Treatment of gastric cancer. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 7, p. 1635-1649, 2014
- PACCHIANA, R. *et al.* 3-Bromo-Isoxazoline Derivatives Inhibit GAPDH Enzyme in PDAC Cells Triggering Autophagy and Apoptotic Cell Death. **Cancers**, v. 14, n. 13, p. 1-19, 2022.
- PANDEY, S. K. *et al.* Molecular *docking* of anti-inflammatory drug diclofenac with metabolic targets: Potential applications in cancer therapeutics. **Journal of Theoretical Biology**, v. 465, n. 1, p. 117-125, 2019.
- PANTZIARKA, P. *et al.* Repurposing Drugs in Oncology (ReDO) - mebendazole as an anti-cancer agent. **ecancer**, v. 8, n. 1, p. 1-16, 2014.
- PARVATHANENI, V. *et al.* Drug repurposing: a promising tool to accelerate the drug discovery process. **Drug Discovery Today**, v. 24, n. 10, p. 2076-2085, 2019.
- PINTO, L. C. *et al.* The anthelmintic drug mebendazole inhibits growth, migration and invasion in gastric cancer cell model. **Toxicology in Vitro**, v. 29, n. 8, p. 2038-2044, 2015.
- PUSHPAKOM, S. *et al.* Drug repurposing: progress, challenges and recommendations. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 18, n. 1, p. 41-58, 2019.
- QIAO, T. *et al.* Inhibition of LDH-A by Oxamate Enhances the Efficacy of Anti-PD-1 Treatment in an NSCLC Humanized Mouse Model. **Frontiers in Oncology**, v. 11, n. 1, p. 1-12, 2021.
- RAMPERSAD, S. N. Multiple Applications of Alamar Blue as an Indicator of Metabolic Function and Cellular Health in Cell Viability Bioassays. **Sensors**, v. 12, n. 9, p. 12347-12360, 2012.
- RODRIGUES, R.; DUARTE, D.; VALE, N. Drug Repurposing in Cancer Therapy: Influence of Patient's Genetic Background in Breast Cancer Treatment. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 8, p. 1-14, 2022.
- RONG, Y. *et al.* Lactate dehydrogenase A is overexpressed in pancreatic cancer and promotes the growth of pancreatic cancer cells. **Tumour Biology**, v. 34, n. 3, p. 1523-1530, 2013.
- SASAKI, J.-I. *et al.* The Anthelmintic Drug Mebendazole Induces Mitotic Arrest and Apoptosis by Depolymerizing Tubulin in Non-Small Cell Lung Cancer Cells. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 1, n. 13, p. 1201-1209, 2002.
- SASAKO, M. *et al.* Five-Year Outcomes of a Randomized Phase III Trial Comparing Adjuvant Chemotherapy With S-1 Versus Surgery Alone in Stage II or III Gastric Cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 29, n. 33, p. 4387-4393, 2011.
- SCHILIRO, C.; FIRESTEIN, B. L. Mechanisms of Metabolic Reprogramming in Cancer Cells Supporting Enhanced Growth and Proliferation. **Cells**, v. 10, n. 5, p. 1-41, 2021.
- SCHMITTGEN, T. D.; LIVAK, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. **Nature Protocols**, v. 3, n. 6, p. 1101-1108, 2008.

SEGALLA, J. G. M. *et al.* Quimioterapia no Câncer de Pulmão não de Pequenas Células. **Rev. Bras. Oncologia Clínica**, v. 1, n. 4, p. 9-12, 2005.

SIMBULAN-ROSENTHAL, C. M. *et al.* The repurposed anthelmintic mebendazole in combination with trametinib suppresses refractory NRAS Q61K melanoma. **Oncotarget**, v. 8, n. 8, p. 12576-12595, 2017.

SKIBINSKI, C. G.; WILLIAMSON, T.; RIGGINS, G. J. Mebendazole and radiation in combination increase survival through anticancer mechanisms in an intracranial rodent model of malignant meningioma. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 140, n. 3, p. 529-538, 2018.

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

SONG, B. *et al.* Repurposing of Benzimidazole Anthelmintic Drugs as Cancer Therapeutics. **Cancers**, v. 14, n. 19, p. 1-20, 2022.

SONG, Z. *et al.* Progress in the treatment of advanced gastric cancer. **Tumor Biology**, v. 39, n. 7, p. 1-7, 2017.

SUN, Y. *et al.* Discovery of a novel human lactate dehydrogenase A (LDHA) inhibitor as an anti-proliferation agent against MIA PaCa-2 pancreatic cancer cells. **RSC Advances**, v. 6, n. 28, p. 23218–23222, 2016.

SUNG, H. *et al.* Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209-249, 2021.

TANG, Z. *et al.* GEPIA: a web server for cancer and normal gene expression profiling and interactive analyses. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. W1, p. W98-W102, 2017.

TSAI, C. *et al.* No Difference in Survival between Neo-Adjuvant Chemotherapy and Neo-Adjuvant Chemoradiation Therapy in Gastric Cardia Cancer Patients: A Contemporary View from the National Cancer Database. **Digestive Surgery**, v. 37, n. 3, p. 249-257, 2020.

WENG, H. C. *et al.* The Combination of a Novel GLUT1 Inhibitor and Cisplatin Synergistically Inhibits Breast Cancer Cell Growth By Enhancing the DNA Damaging Effect and Modulating the Akt/mTOR and MAPK Signaling Pathways. **Frontiers in Pharmacology**, v. 13, n. 1, p. 1-16, 2022.

WILLIAMSON, T. *et al.* Mebendazole and a non-steroidal anti-inflammatory combine to reduce tumor initiation in a colon cancer preclinical model. **Oncotarget**, v. 7, n. 42, p. 68571-68584, 2016.

WILLIAMSON, T. *et al.* Mebendazole disrupts stromal desmoplasia and tumorigenesis in two models of pancreatic cancer. **Oncotarget**, v. 12, n. 14, p. 1326–1338, 2021.

WILLIAMSON, T. *et al.* Mebendazole inhibits tumor growth and prevents lung metastasis in models of advanced thyroid cancer. **Endocrine-Related Cancer**, v. 27, n. 3, p. 123-136, 2020.

XINTAROPOULOU, C. *et al.* A comparative analysis of inhibitors of the glycolysis pathway in breast and ovarian cancer cell line models. **Oncotarget**, v. 6, n. 28, p. 25677-25695, 2015.

XINTAROPOULOU, C. *et al.* Expression of glycolytic enzymes in ovarian cancers and evaluation of the glycolytic pathway as a strategy for ovarian cancer treatment. **BMC Cancer**, v. 18, n. 636, p. 1-15, 2018.

XU, S. *et al.* A precision therapeutic strategy for hexokinase 1-null, hexokinase 2-positive cancers. **Cancer & Metabolism**, v. 6, n. 1, p. 1-17, 2018.

YANG, Y. *et al.* Targeting lactate dehydrogenase a improves radiotherapy efficacy in non-small cell lung cancer: from bedside to bench. **Journal of Translational Medicine**, v. 19, n. 1, p. 1-14, 2021.

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

ZAMBRANO, A. *et al.* Glut 1 in Cancer Cells and the Inhibitory Action of Resveratrol as A Potential Therapeutic Strategy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 13, p. 1-20, 2019.

ZHANG, J. Y. *et al.* Critical protein GAPDH and its regulatory mechanisms in cancer cells. **Cancer Biology and Medicine**, v. 12, n. 1, p. 10-22, 2015.

ZHANG, M. *et al.* Adjuvant Chemoradiotherapy for Gastric Cancer: Efficacy and Cost-Effectiveness Analysis. **Frontiers in Oncology**, v. 9, n. 1357, p. 1-10, 2019.