



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

**PEDRO VICTOR DA ROCHA LIMA**

**ANÁLISE DE ALVOS MOLECULARES DA VIA DE BIOSÍNTESE DE  
NUCLEOTÍDEOS: UMA NOVA ABORDAGEM DO FÁRMACO MEBENDAZOL  
NO TRATAMENTO DE ADENOCARCINOMA GÁSTRICO**

**FORTALEZA**

**2025**

PEDRO VICTOR DA ROCHA LIMA

ANÁLISE DE ALVOS MOLECULARES DA VIA DE BIOSÍNTESE DE  
NUCLEOTÍDEOS: UMA NOVA ABORDAGEM DO FÁRMACO MEBENDAZOL NO  
TRATAMENTO DE ADENOCARCINOMA GÁSTRICO

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: Prof<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Raquel Carvalho Montenegro.

Coorientador: Dr. Emerson Lucena da Silva.

FORTALEZA

2025

PEDRO VICTOR DA ROCHA LIMA

ANÁLISE DE ALVOS MOLECULARES DA VIA DE BIOSÍNTESE DE  
NUCLEOTÍDEOS: UMA NOVA ABORDAGEM DO FÁRMACO MEBENDAZOL NO  
TRATAMENTO DE ADENOCARCINOMA GÁSTRICO

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.

Aprovado em : \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ .

BANCA EXAMINADORA

---

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

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Roberta Jeane Bezerra Jorge  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Daniele de Oliveira Bezerra de Sousa  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

*Dedico à criança que um dia fui e que brincava de ser um cientista sem mesmo saber que isso poderia se tornar realidade. Aquele garoto curioso que transformava perguntas em descobertas e que descobriu a essência de nunca parar de aprender.*

## AGRADECIMENTOS

Desejo expressar meus profundos agradecimentos a todos que contribuíram e que garantiram, mesmo que diretamente ou indiretamente, para que a minha trajetória acadêmica se tornasse uma busca prazerosa e se concretizasse. Foi uma longa jornada de imenso aprendizado chamada graduação. Cheio de altos e de baixos, sempre vencendo ou aprendendo a partir da minha disposição e curiosidade em busca do aprendizado. Este projeto foi resultado de um trabalho árduo de muitas pessoas que estavam dispostas a me ajudar e me ensinar a todo momento.

Primeiramente, agradeço imensamente à minha mãe Maria Regina Costa da Rocha, guerreira e fiel, que sempre está disposta em me ajudar independente da situação, com certeza ela é uma peça decisiva em garantir uma educação e um ensino de qualidade para mim ao longo de toda a minha vida. Sempre me incentivando que a educação e o ensino é o principal caminho para a construção de uma vida digna. Como sempre morei em uma cidade no interior de fortaleza, achava que o ingresso em uma universidade na capital seria difícil por conta da distância, porém ela me provou o contrário. Ela não mediu esforços para permitir que eu tivesse o melhor ensino e pudesse estudar em uma das melhores universidades da região. Suportou um peso que não lhe pertencia, apenas para que minha história pudesse seguir. Também me mostrou que há poder em agir mesmo sem precisar levantar a voz, me ensinou a escutar e compreender antes de falar.

Também, gostaria de agradecer aos meus avós, Raimundo Costa da Rocha e Maria Jozita Costa da Rocha, por todo auxílio e amor. Sem dúvidas, essas duas pessoas moldaram a minha personalidade de maneira positiva, e o homem que sou hoje, gentil, educado e forte, foi por causa de todos os ensinamentos passados por eles. Muitas vezes essas pessoas permitiram renunciar os seus sonhos para que os meus fossem realizados. Vocês são o meu pilar de inspiração e resiliência.

Essas 3 pessoas que eu comentei até aqui são as minhas referências de vida e quem eu considero como família por ter crescido e ter passado toda a minha vida até aqui ao lado dessas pessoas. Principalmente, a minha avó, por ter mostrado como a vida é bela e que tudo é possível, basta ter vontade. Sua força continua a orientar minhas escolhas e decisões.

Agradeço imensamente à minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Raquel Carvalho Montenegro pela oportunidade, pela confiança e por todos os ensinamentos ao longo desses 3 anos desde que entrei no laboratório. Também gostaria de agradecer aos outros professores que compõem o laboratório FARMAGEN, Prof. Dr. Pedro Filho Noronha de Sousa e Prof. Dr. Felipe Pantoja

Mesquita, que também me permitiram um imenso aprendizado no ambiente. Além disso, o meu profundo agradecimento especial ao Prof. Dr. José Hélio de Araújo Filho e um grande amigo que me auxiliou imensamente nos ensaios de bioinformática estrutural para a concretização deste trabalho.

Também não poderia faltar as amizades que eu fiz ao longo dessa caminhada na graduação. Tenho um agradecimento especial para os meus amigos Dino Adler, Gustavo Holanda, Ícaro Osterne, Leticia Tomé, Livia Queiroga e Plácido Saraiva. Eles foram as primeiras e as principais amizades desde o início do curso. Uma relação que foi além da sala de aula e dos estudos. Sem dúvida essas pessoas tornaram o processo mais confortável e prazeroso até o fim da graduação. Também os eventos que eu participei na graduação me ofereceram uma oportunidade incrível de conhecer outras pessoas e desenvolver uma amizade imaginável. Destaco os seguintes nomes que se tornaram uma forte amizade durante este percurso: Levi Menezes, Marcelo Peixoto, José Gonçalves, Gustavo Lopes e Pedro Farias. Além do mais, não poderia deixar de mencionar os principais amigos que conheci no laboratório na qual faço parte, Italo Gomes, João Lucas e Nicholas Santos, pelos quais tenho uma profunda gratidão por deixar essa caminhada final mais confortável.

Tenho um total reconhecimento e gratidão a todos os alunos que fazem parte do laboratório, que estiveram dispostos a me ajudar e permitiram com que esse meu projeto fosse concluído, e tive o prazer de aprender um pouco por cada um deles. Dessa forma, queria demonstrar o meu profundo agradecimento aos alunos Amanda Carmo, Diônata Araújo, Guilherme Malagueta, Gabriel Ferreira, Vinícius Estevão, Catarine Vieira, Talia Rabelo, Elmer Espino, Thiago Amorim, Thiago Loreto, Daiane Maria, Isadora Gomes, Laio Oliveira, Patrícia Gomes. E não poderia faltar os principais alunos que me acompanharam de perto para a elaboração deste projeto. Tenho que agradecer a aluna Ana Beatriz de Lima por ter despertado em mim o interesse na área de docking molecular, além de me ensinar cuidadosamente, e pela oportunidade de me apresentar a área da bioinformática. E com imenso prazer que eu agradeço ao Pós-doutorando do laboratório, Emerson Lucena da Silva, por toda ajuda ao longo desta jornada como aluno de iniciação científica do FARMAGEN, na qual tenho uma profunda admiração e respeito.

Nunca pensei que poderia viajar para outro estado e conseguir conhecer outros laboratórios de pesquisa, mas graças ao laboratório FARMAGEN, foi possível realizar um estágio na USP. Tive o prazer de aperfeiçoar outras técnicas e conhecer outros alunos. Então, gostaria de expressar a minha profunda gratidão ao Prof. Dr. João Santana, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Anamelia

Bocca, e aos alunos Paulo, Naomi, Gabi, Julia , Bea, Vitoria, João, Thais e Rafa pela recepção e pelo carinho que tiveram comigo. Nunca esquecerei destas pessoas.

A todos os alunos, de alguma forma, foram meus amigos ao longo desta jornada, aqueles que estenderam a mão quando precisei, que acreditaram quando duvidei de mim mesmo e que me ajudaram a chegar até aqui. Infelizmente, não posso agradecer a cada pessoa que tiver o prazer de conhecer ao longo dessa jornada, mas gostaria de agradecer a todos os amigos que eu fiz na UFC e em outras universidades ao longo dessa caminhada acadêmica.

E por fim, queria agradecer ao Pedro, que quando era criança, mesmo sem conhecer a ciência, era uma pessoa muito curiosa e fascinado pela natureza, e queria mudar o mundo quando crescesse. Acredito que hoje estou no caminho certo e realizando o sonho desse garoto.

Foi pensando nessas pessoas que executei este trabalho, por isso o dedico a todos aqueles a quem esta pesquisa possa ajudar de alguma maneira.

“Na vida, não existe nada a temer, mas a entender.”

(Marie Curie)

## RESUMO

O câncer gástrico (CG) representa um dos tumores com as maiores taxas de incidência e de mortalidade no mundo. O metabolismo de nucleotídeos exerce um papel indispensável para a manutenção do potencial replicativo tumoral ao levar à síntese de intermediários formadores de DNA e RNA, os quais são essenciais no ciclo celular de uma célula tumoral. Assim, fármacos que tenham a capacidade de modular e inibir essa rota metabólica são de grande interesse clínico. O mebendazol (MBZ) originalmente é descrito como um anti-helmíntico e tem demonstrado um potencial efeito antitumoral, além de apresentar a capacidade de modular o metabolismo tumoral, porém ainda é algo pouco esclarecido a respeito do seu efeito na via do metabolismo de nucleotídeos. Dessa forma, este trabalho tem como objetivo realizar a investigação sobre o potencial efeito modulador do MBZ na via de biossíntese das purinas e das pirimidinas no CG. O perfil de expressão de genes relacionados a via de biossíntese de nucleotídeos (*PRPS1*, *HPRT1*, *MTHFD1*, *TYMS* e *DHODH*) foi analisado; a linhagem AGP-01 demonstrou ter uma taxa de transcritos elevada para a maioria dos genes analisados; são eles: *HPRT1*, *MTHFD1*, *TYMS* e *DHODH*. Após o tratamento com o fármaco MBZ, foi observada uma queda no nível para todos os genes estudados. Além disso, estudos de expressão *in silico* foram analisados, e os genes *PRPS1*, *HPRT1*, *MTHFD1* e *TYMS* apresentaram uma taxa alta de transcritos para amostras clínicas de pacientes com CG. Os pacientes com alta expressão de *HPRT1*, *MTHFD1* e *TYMS* apresentam um pior prognóstico, sendo alvos de interesse clínico. Outrossim, utilizando ensaios de ancoragem molecular, foi possível prever uma possível interação do ligante MBZ com as enzimas avaliadas, demonstrando que o anti-helmíntico se atracou próximo ao domínio catalítico das enzimas no ensaio *in silico*, podendo levar à diminuição da sua atividade enzimática. Com isso, as informações obtidas até o momento indicam que o MBZ apresentou a atividade de modular a via de biossíntese de nucleotídeos ao ocasionar uma depleção no nível dos transcritos, todavia, mais estudos precisam ser realizados para esclarecer o comportamento de interação do MBZ com as enzimas. Com isso, esse trabalho contribui com a exploração e validação de novos alvos farmacológicos promissores para o tratamento do CG.

**Palavras-chave:** reposicionamento farmacológico; metabolismo; benzimidazóis; ancoragem molecular.

## ABSTRACT

Gastric cancer (GC) is one of the tumors with the highest incidence and mortality rates globally. The nucleotide pathway plays an indispensable role in maintaining the tumor's replicative potential by synthesizing DNA and RNA building blocks, which are essential for the tumor cell cycle. Thus, drugs capable of modulating and inhibiting this metabolic pathway are of great clinical interest. Mebendazole (MBZ) was originally described as an anthelmintic drug and has demonstrated potential antitumoral effects, in addition to the capacity to modulate tumor metabolism. However, its effect on the nucleotide metabolism pathway is still poorly understood. This study, therefore, aims to investigate the potential modulatory effect of MBZ on the purine and pyrimidine biosynthesis pathways in the context of GC. The expression profile of the following genes was analyzed: *PRPS1*, *HPRT1*, *MTHFD1*, *TYMS*, and *DHODH*, which are responsible for translating into the enzymes that participate in the nucleotide pathway. The AGP-01 cell line showed an elevated transcript level for most of the genes analyzed, specifically: *HPRT1*, *MTHFD1*, *TYMS*, and *DHODH*. Following contact between the drug MBZ and the tumor cell line, a drop in the expression level for all studied genes was observed. Furthermore, *in silico* expression studies were analyzed, and the genes *PRPS1*, *HPRT1*, *MTHFD1*, and *TYMS* showed a high transcript level in clinical samples from GC patients. Patients with high expression of *HPRT1*, *MTFHD1* and *TYMS* exhibit a worse prognosis, making them targets of clinical interest. Moreover, using molecular docking assays, it was possible to predict the mode of interaction that the ligand MBZ causes with the nucleotide pathway enzymes. The analysis of the results indicated that the anthelmintic drug docked close to the catalytic domain of the enzymes in the *in silico* assay. The information obtained so far suggests that MBZ demonstrated the activity of modulating the nucleotide biosynthesis pathway by causing a depletion in transcript levels. However, further studies are needed to clarify the interaction behavior of MBZ with the enzymes. Consequently, this work contributes to the exploration and validation of promising new pharmacological targets for the treatment of GC.

**Keywords:** drug repurposing; metabolism; benzimidazoles; molecular docking.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fatores relacionados ao desenvolvimento do câncer.....	22
Figura 2 - Diagrama esquemático da via de biossíntese das purinas.....	27
Figura 3 - Diagrama esquemático da via de biossíntese das pirimidinas .....	28
Figura 4 - Representação dos segmentos e das regiões que formam o estômago .....	31
Figura 5 - Análise da expressão gênica de alvos do metabolismo de nucleotídeos em amostras clínicas de CG.....	50
Figura 6 - Análise da correlação entre a taxa de transcritos do metabolismo de nucleotídeos e o prognóstico de pacientes com CG ao longo do tempo .....	51
Figura 7 - A linhagem AGP-01 apresenta uma hiperexpressão na maioria dos genes do metabolismo de nucleotídeos.....	53
Figura 8 - A análise do efeito modulador através do MBZ na expressão gênica na linhagem AGP-01.....	54
Figura 9 - Análise do atracamento molecular com a proteína PRPS1.....	60
Figura 10 - Análise do atracamento molecular com a proteína HPRT1.....	63
Figura 11 - Análise do atracamento molecular com a proteína MTHFD1 .....	65
Figura 12 - Análise do atracamento molecular com a proteína TYMS.....	68
Figura 13 - Análise do atracamento molecular com a proteína DHODH .....	70

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Códigos das proteínas utilizadas e as referidas dimensões da grid box para cada proteína.....	43
Tabela 2 - Parâmetros pré-estabelecidos no procedimento de docking molecular.....	45
Tabela 3 - Linhagens celulares utilizadas e as suas respectivas características .....	47
Tabela 4 - Sequências dos oligonucleotídeos utilizados para RT-qPCR.....	49
Tabela 5 - Valores do RMDS a respeito do redock proposto no trabalho.....	58
Tabela 6 - Pontuação obtida pelo VINA para cada molécula pequena utilizada como ligante para o docking molecular com a proteína PRPS1 .....	61
Tabela 7 - Pontuação obtida pelo VINA para cada molécula pequena utilizada como ligante para o docking molecular com a proteína HPRT1 .....	64
Tabela 8 - Pontuação obtida pelo VINA para cada molécula pequena utilizada como ligante para o docking molecular com a proteína MTHFD1.....	67
Tabela 9 - Pontuação obtida pelo VINA para cada molécula pequena utilizada como ligante para o docking molecular com a proteína TYMS.....	69
Tabela 10 - Pontuação obtida pelo VINA para cada molécula pequena utilizada como ligante para o docking molecular com a proteína DHODH .....	72

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-FU	5- Fluorouracil
ADP	Adenosina-5'-difosfato
ATP	Adenosina trifosfato
BRE	Brequinar
CG	Câncer gástrico
c-MYC	Myelocytomatosis Oncogene (oncogene da mielocitomatose)
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
CPNM	Câncer de pele não melanoma
DHODH	Di-hidro-orotato desidrogenase
DMEM	Meio Eagle – Modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfato
FdUMP	5-Fluoro-2'-desoxiuridina-5'-monofosfato
GEPIA®	<i>Gene Expression Profiling Interactive Analysis</i>
GTE <sub>x</sub>	<i>The Genotype-Tissue Expression</i>
HPRT1	Hipoxantina-Guanina Fosfotransferase 1
ImmGP	Immucillin-GP
L34	Ácido (2S)-2-amino-3-{ -4-[2-amino-4-oxo-4,6-diidro-3H-pirimidin-5-il]fenil } sulfonil)propiónico
MBZ	Mebendazol
mRNA	RNA mensageiro
MTHFD1	Metilenotetra-hidrofolato desidrogenase 1
O <sub>2</sub>	Gás oxigênio
PBS	Tampão fosfato-salino
PI3K	Fosfoinositídeo-3-quinase
PRPP	Fosforribosil pirofosfato
PRPS1	Fosforribosil pirofosfato transferase 1
R5P	Ribose-5-fosfato

RMSD	Raiz do desvio quadrático médio (Root Mean Square Deviation)
RNA	Ácido ribonucleico
RT-qPCR	Transcriptase Reversa com Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real
SBF	Soro Bovino Fetal
TCGA	<i>The Cancer Genome Atlas</i>
TYMS	Timidilato sintase
UV	Ultra-Violeta

## LISTA DE SÍMBOLOS

Å	Angstrom
μ	Micro
®	Marca registrada

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>19</b>
<b>1.1</b>	<b>Câncer</b> .....	<b>19</b>
<b>1.2</b>	<b>Anatomia do estômago</b> .....	<b>30</b>
<b>1.3</b>	<b>Câncer gástrico</b> .....	<b>32</b>
<b>1.4</b>	<b>Reposicionamento de fármacos</b> .....	<b>37</b>
<b>1.5</b>	<b>Ancoragem molecular</b> .....	<b>41</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>42</b>
<b>2.1</b>	<b>Objetivo geral</b> .....	<b>42</b>
<b>2.2</b>	<b>Objetivos específicos</b> .....	<b>42</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>43</b>
<b>3.1</b>	<b>Preparo das proteínas e dos ligantes para o ensaio de atracamento molecular</b> .....	<b>43</b>
<b>3.2</b>	<b>Atracamento molecular</b> .....	<b>44</b>
<b>3.3</b>	<b>Análise da expressão gênica <i>in silico</i> através de bancos de dados online</b> .....	<b>46</b>
<b>3.4</b>	<b>Cultura celular</b> .....	<b>46</b>
<b>3.5</b>	<b>Substâncias químicas</b> .....	<b>47</b>
<b>3.6</b>	<b>Extração de mRNA e análise de expressão gênica por RT-qPCR</b> .....	<b>47</b>
<b>3.7</b>	<b>Análise estatística</b> .....	<b>49</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>50</b>
<b>4.1</b>	<b>A investigação sobre a expressão diferencial mostrou que os genes que fazem parte do metabolismo de nucleotídeos estão desregulados em amostras de CG</b> .....	<b>50</b>
<b>4.2</b>	<b>A avaliação do nível de transcritos em bancos de dados online revelou que a regulação positiva dos tais genes pode influenciar em um pior prognóstico</b> .....	<b>51</b>
<b>4.3</b>	<b>O fármaco mebendazol foi capaz de modular o nível de todos os transcritos do metabolismo de nucleotídeos na linhagem AGP-01</b> .....	<b>52</b>
<b>4.4</b>	<b>O atracamento molecular evidenciou que o ligante MBZ interage em pontos críticos presentes nas enzimas do metabolismo das purinas e das pirimidinas</b> .....	<b>57</b>

<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>72</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>73</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Câncer

O termo câncer refere-se a um vasto conjunto de doenças, podendo ser representado por mais de 200 tipos diferentes, o qual acomete virtualmente qualquer tecido ou órgão do corpo humano (Rana; Prajapati, 2025; Song; Merajver; Li, 2015). Embora exista essa variedade, há uma característica intrínseca compartilhada com esse distúrbio no que diz respeito à fisiologia celular, em que as células adquirem uma autonomia proliferativa e se multiplicam de maneira descontrolada e podem invadir regiões adjacentes ou até órgãos distantes do corpo (INCA, 2022; Saini et al., 2020). Além disso, o câncer configura-se como um problema de saúde pública a âmbito mundial, sendo relatado como uma das principais causas de mortes na maioria dos países (Bray et al., 2024; WHO, 2025). É previsto que, até 2050, ocorrerão cerca de 35 milhões de novos casos de câncer no mundo, representando um aumento de, aproximadamente, 75% em comparação à estimativa proposta em 2022, que contava com 20 milhões de casos (Bray et al., 2024).

A princípio, essa doença tem origem genética, isto é, o ponto de partida para o início de um tumor deriva de alterações bioquímicas que podem ocorrer na molécula de ácido desoxirribonucleico (DNA) da célula. Esse material genético contém as informações necessárias para orquestrar basicamente todas as funções celulares, inclusive no seu ciclo celular. Portanto, uma vez que certas mutações são acumuladas, isso pode dar início ao processo chamado de carcinogênese, ou seja, o nascimento do câncer (INCA, 2022; Vogelstein et al., 2013). Ademais, a literatura relata que existem alguns fenômenos recorrentes que influenciam nesse processo, a citar a fumaça do tabaco e os raios ultravioletas (UV), considerados alguns dos fatores ambientais desse processo, além de condições hereditárias, na qual certas alterações genéticas podem ser passadas do genitor para a sua prole, e pode até ocorrer o acúmulo de alguns erros que não são corrigidos pelo aparato bioquímico durante a replicação do DNA ao longo do ciclo celular (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2021; INCA, 2022).

Essas mutações que aumentam o risco do desenvolvimento do câncer costumam acontecer em trechos específicos do material genético, e podem ser divididas em duas classes de genes: os chamados genes supressores tumorais e os oncogenes. Essas regiões presentes no DNA costumam desempenhar funções vitais para a célula, em combinação, os seus produtos moleculares atuam em processos como: sobrevivência da célula e a regulação da divisão e da diferenciação celular (NACIONAL CANCER INSTITUTE, 2021).

Para detalhar o papel de cada uma dessas duas classes, primeiro temos o grupo chamado de genes supressores de tumor, pelos quais atuam em funções como reparo de erros no DNA, vigilância da integridade genômica, diferenciação celular e regulação do ciclo celular e apoptose. Além do mais, essa classe ainda pode ser subdividida em duas categorias de acordo a função desempenhada, os genes protetores e os genes de manutenção, e também são conhecidos pelos termos em inglês “gatekeepers” e “caretakers”, respectivamente (Baissa et al., 2016; Vicente-Dueñas et al., 2013; Vogelstein et al., 2013).

Os gatekeepers tratam-se de uma coleção de genes que realizam funções diretamente relacionadas à manutenção do ciclo celular. Sendo os protagonistas na decisão de induzir a proliferação ou gerar sinais para a morte celular programada de acordo com a condição celular. E uma vez sendo vítima de mutações, isso poderá dar início ao processo de carcinogênese para vários tipos de tumores. E como outro sub-grupo, tem-se os caretakers, nas quais são eles que detêm dos papéis relacionado ao reparo do DNA e a manutenção da integridade genômica. Um fator interessante é que as mutações que acometem essa categoria não levam necessariamente ao desenvolvimento de um fenótipo mutante, mas sim garantem uma participação indireta na oncogênese, visto que geram um impacto na taxa de mutações nos chamados genes protetores, como os genes mutantes *BRCA1* e *BRCA2* que são responsáveis pelo câncer de mama e de ovário, sendo considerados fatores hereditários e de alta penetrância (Brown, 2021; Fanale et al., 2017).

Já os oncogenes, por sua vez, participam dos eventos de ganho de função. Eles são traduzidos em proteínas com funções intensificadoras na proliferação celular (Vicente-Dueñas et al., 2013; Xu et al., 2022). E os oncogenes surgem a partir da ativação dos proto-oncogenes por meio de alterações genéticas. Sendo assim, é conferido a célula hospedeira algum incremento na capacidade proliferativa ou insensibilidade a eventos apoptóticos (Baissa et al., 2016; Brown, 2021).

Alguns oncogenes são considerados recorrentes em vários tipos de câncer ao garantir alguma vantagem metabólica para a célula tumoral, a citar o *c-MYC* e fosfoinositídeo 3-quinase (*PI3K*). A literatura relata que esses oncogenes apresentam um papel decisivo na regulação positiva de genes presentes na via glicolítica, que por sua vez, garantem um incremento do metabolismo de carboidrato (Hoxhaj; Manning, 2020; Miller et al., 2012). Esse fator, considerado uma reprogramação metabólica, confere a célula um maior suprimento energético e ajuda na manutenção e na progressão tumoral (Nagarajan; Malvi; Wajapeyee, 2016).

A respeito do surgimento do tumor, trata-se de um processo que, no geral, se desenvolve lentamente, visto que é necessário um acúmulo de mutações. A oncogênese, ou também

definida por carcinogênese, é um processo composto por 3 estágios, são eles a iniciação, a promoção e a progressão. A primeira etapa está relacionada à influência dos agentes que podem provocar modificações no DNA. A próxima fase acontece de maneira lenta e progressiva, em que é crucial o contato com agentes cancerígenos de maneira contínua. E, por fim, no último momento, o tumor está completamente desenvolvido e as células já se multiplicam sem limites (INCA, 2022; Chakravarthi; Nepal; Varambally, 2016).

Com isso, desde o último século, houve uma mobilização de esforços mundiais para tentar desvendar os princípios básicos que regem o desenvolvimento de células malignas e como elas se tornam agressivas (Pavlova; Thompson, 2016). Nesse contexto, em uma tentativa de esclarecer a fisiopatologia do câncer, os pesquisadores Hanahan & Weinberg (2000) publicaram um artigo sobre as características do câncer, nos quais sugeriram que existam 6 mudanças essenciais na fisiologia celular que regem a formação de células malignas e interrompem um mecanismo homeostático, nas quais são compartilhadas na maioria ou talvez em todos os tipos de cânceres humano (Hanahan; Weinberg, 2000). À medida que os estudos foram avançando, houve uma ampliação do conceito em 2011, em que foram adicionados 2 características facilitadoras e 2 atributos emergentes (Hanahan; Weinberg, 2011). E, em 2022, Hanahan atualizou novamente adicionando mais 4 características habilitadoras (Hanahan, 2022).

Dessa forma, podemos citar as 8 características essenciais no câncer: insensibilidade aos supressores de crescimento, evasão do sistema imunológico, potencial de replicação ilimitado, invasão de tecidos e metástase, indução de angiogênese, resistência à morte celular, reprogramação do metabolismo celular e autossuficiência em sinais de crescimento. E sobre as características habilitadoras, destacam-se: reprogramação epigenética não mutacional, microbiomas polimórficos, senescência celular, desbloqueio da plasticidade fenotípica, instabilidade genômica e mutação e inflamação promovida pelo tumor (FIGURA 1) (Hanahan, 2022).

Figura 1 - Fatores relacionados ao desenvolvimento do câncer



Fonte: Adaptada de Hanahan (2022).

### 1.1.1 Metabolismo tumoral

Uma das características mais marcantes dos tumores é a capacidade que as células transformadas têm de proliferar de forma indefinida (Brown et al., 2023). No entanto, para que haja a consolidação de uma célula maligna, é necessário que seu metabolismo se re programe de acordo com as demandas biológicas de uma célula maligna, isto é, para que a célula se replique e cresça cronicamente, o seu aparato metabólico precisa se adaptar para suportar essa alta demanda energética (Hanahan; Weinberg, 2011; Pavlova; Thompson, 2016). Após a identificação desse comportamento metabólico no câncer, os pesquisadores compreenderam que isso pode ser considerado um elemento-chave para a manutenção e desenvolvimento do crescimento do tumor, assim, o pesquisador Hanahan, na elaboração dos conceitos mais recentes, adicionou a reprogramação metabólica como uma característica essencial para o desenvolvimento das neoplasias, assim como as seis originais (Hanahan, 2022). Desde a última década, o metabolismo celular tornou-se uma peça de destaque nos estudos da carcinogênese, ademais, o enfoque neste campo permitiu desvendar novos comportamentos em relação à evolução do tumor (Pavlova; Thompson, 2016) (Finley, 2023; Martínez-Reyes; Chandel, 2021).

O metabolismo celular é um processo extremamente regulado pela célula e que compreende uma complexa rede de vias bioquímicas com o objetivo de produzir energia de acordo com as necessidades celulares, manter a proliferação e a diferenciação celular, além de auxiliar na comunicação intercelular. Frequentemente, esse conjunto de reações bioquímicas é dividido em dois grupos básicos, de acordo com o seu papel na via, sendo elas as rotas catabólicas e as vias anabólicas (Escoll; Buchrieser, 2019; Fabri et al., 2021).

O primeiro processo, também chamado de catabolismo, diz respeito à coleção de reações que acontecem no interior da célula e visam a degradação de macromoléculas, como a via glicolítica. Já o outro processo, o objetivo é basicamente o inverso, isto é, no anabolismo, a função é gerar novas macromoléculas, por exemplo, a biossíntese de proteínas. Outrossim, com o objetivo de poupar energia e para manter a homeostase, em uma célula dita saudável, cada via, que constitui o metabolismo celular, pode ser intensamente regulada através de ajustes críticos nessas rotas metabólicas (Carthew, 2021; Jackson; Finley, 2024; Malheiros, 2006).

Por se tratar de um processo que a célula desempenha um controle constante para garantir a manutenção das condições internas sempre ajustadas de acordo com as mudanças no ambiente, caso ocorra alguma disfunção nesse poder regulatório da célula à nível genético ou não, isso pode abrir espaço para a manifestação de malignidades celulares, como doenças metabólicas ou o desenvolvimento de um tumor (Sun et al., 2016).

Dessa forma, além de amparar as células malignas com um suprimento energético elevado, esse metabolismo alterado também fornece recursos estruturais fundamentais para a sobrevivência e replicação celular (Shuvalov et al., 2021; Yoshida, 2015). Somado a isso, esse comportamento metabólico é dito multifacetado, isto é, trata-se de um fator que é construído por uma coleção de rotas bioquímicas (Shuvalov et al., 2021). Com isso, sendo uma das características distintivas do tumor, essa reprogramação no metabolismo tornou-se protagonista no câncer por manter esse caráter proliferativo crônico (Navarro et al., 2022). Até o momento, a ciência já identificou e relatou inúmeras vias metabólicas disfuncionais que, de alguma forma, conferem ao tumor uma vantagem seletiva no hospedeiro. Dentre elas, uma que merece destaque pelo seu papel recorrente no câncer é a via glicolítica (Navarro et al., 2022; Ohshima; Morii, 2021; Shuvalov et al., 2021).

No contexto da fisiologia celular, a estratégia mais eficaz, no que tange à obtenção de energia, baseia-se na fosforilação oxidativa que ocorre na organela mitocôndria em condições aeróbicas. É utilizado a glicose, como carboidrato principal, na produção de energia na forma de adenosina trifosfato (ATP), metabolizando o monossacarídeo em dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). Para uma célula não neoplásica, esse processo de catabolismo da glicose é suficiente para

manter a sua sobrevivência de maneira geral. Todavia, para uma célula cancerígena essa situação é diferente, visto que é necessária uma demanda energética adicional para a sua sobrevivência (Martínez-Reyes; Chandel, 2021; Ward; Thompson, 2012).

Com isso, o tumor lança mão de certas abordagens para garantir a sua proliferação, como o incremento na taxa de captação de glicose, e também apresenta uma tendência de redirecionar parte desse carboidrato para a via da fermentação na síntese de lactato (Fabri et al., 2021; Vander Heiden; Cantley; Thompson, 2009). Um fenômeno particularmente interessante observado pelo pesquisador Otto Warburg, na década de 1920, identificou que, mesmo sob condições aeróbicas favoráveis, isto é, com concentração adequada do gás oxigênio ( $O_2$ ), a célula cancerígena produz grande quantidade de lactato, uma rota fermentativa de baixo rendimento energético, mesmo com o metabolismo mitocondrial completamente funcional (Vander Heiden; Cantley; Thompson, 2009). Esse comportamento foi chamado de efeito Warburg ou glicólise aeróbica (Sun et al., 2016).

Apesar desse fenômeno parecer algo inviável para a sobrevivência do tumor por conta do déficit energético, tendo em vista o baixo rendimento de 2 ATP's da fermentação contra a produção de 36 moléculas de ATP no metabolismo mitocondrial, trabalhos subsequentes lançaram luz alguns postulados como tentativa de explicar esse comportamento encontrado na maioria das células cancerígenas (Vander Heiden; Cantley; Thompson, 2009). Uma possível explicação seria que a glicólise aeróbica só seria um problema caso os nutrientes sejam escassos, portanto, sabendo que o câncer apresenta uma taxa de captação de glicose elevada, isso pode sustentar a demanda energética tumoral. Uma vez que há o suprimento constante de nutrientes para as células nos mamíferos, essa estratégia adotada pelo tumor pode equiparar o rendimento na síntese energética.

Alguns trabalhos relataram e reforçaram essa ideia, na qual destacaram que mesmo as células tumorais recorrendo à glicólise aeróbica, elas apresentam altas razões de ATP/ADP (Christofk et al., 2008; DeBerardinis et al., 2008). Além disso, uma pesquisa *in vitro* utilizando células de glioblastoma humano LN18 obtiveram resultados surpreendentes ao analisar o rendimento de ATP baseando-se na capacidade de obter glicose e gerar ácido láctico, e os dados mostraram que essa linhagem cancerígena apresentou um superavit de 13% na biossíntese de ATP, isto é, tendo um rendimento superior a 10% em comparação as células não tumorais no que diz respeito à geração de energia (Elstrom et al., 2004).

Outra justificativa que corrobora para a sobrevivência do câncer, baseando-se no efeito Warburg, seria que essa rota catabólica contribui para a síntese de vários oncometabólitos e que a sua importância para a célula vai muito além do ATP, esse grupo seriam moléculas

intermediárias e precursores metabólicos que ajuda na sobrevivência e na progressão do tumor (Liu; Yang, 2021; Navarro et al., 2022a). Como a célula neoplásica está em constante proliferação, ela precisa manter uma série de intermediários glicolíticos em altos níveis, a citar a frutose-6-fosfato e o gliceraldeído-3-fosfato, os quais são precursores ideais para a síntese do substrato ribose-5-fosfato. Esta molécula é um agente de grande importância para a construção dos nucleotídeos, uma matéria-prima de grande demanda para células de proliferação rápida (Navarro et al., 2022).

Apesar desse caráter indispensável da via glicolítica para a consolidação do câncer, há também outros protagonistas que são recorrentes entre as vias que influenciam na reprogramação metabólica e fundamentais para o fenótipo proliferativo do tumor. Para garantir a capacidade de replicação rápida, as células em divisão precisam sintetizar ácidos nucleicos no mesmo ritmo em que acontece a replicação celular, e a rota bioquímica que permite isso é a via de biossíntese de nucleotídeos (Chen et al., 2022). Uma revisão feita entre mais de 600 trabalhos científicos estimou que a concentração de nucleotídeos (dNTP's) em células malignas é de 6 a 11 vezes maior que a quantidade comparada às células saudáveis, em média (Mullen; Singh, 2023; Traut, 1994). Esse dado reflete o papel indispensável dessa via desregulada para a consolidação de um perfil proliferativo descontrolado, uma vez que garante o estoque de nucleotídeos intracelulares extremamente elevado para assegurar a sobrevivência do tumor no hospedeiro.

### **1.1.2 Via de biossíntese de nucleotídeos**

A biossíntese de nucleotídeo trata-se de uma via metabólica altamente conservada e fundamental em quase todos os seres vivos. Essa rota bioquímica tem um papel central no metabolismo e na proliferação celular, além de ser importante para a manutenção da célula, na qual é a responsável pela geração de precursores moleculares para a homeostase celular, a citar o próprio material genético e a molécula energética adenosina trifosfato (ATP) (Chen et al., 2022). Além disso, essa via pode regular as velocidades de replicação e de transcrição do DNA. Tendo em vista a importância para a célula, a sua desregulação pode acarretar diversos distúrbios e doenças, a exemplo do próprio câncer (Chen et al., 2022; Shi et al., 2023).

As bases nitrogenadas são os componentes básicos para a construção dos ácidos ribonucleicos (RNA) e dos ácidos desoxirribonucleicos (DNA). Nos seres vivos, existem 5 principais bases nitrogenadas e são organizadas em 2 grupos com base na sua estrutura molecular. As bases timina, citosina e uracila fazem parte da classe das pirimidinas, que são

estruturadas por um anel com nitrogênio presente nas posições 1 e 3. Enquanto que as 2 restantes, adenina e guanina, são classificadas como purinas e essas moléculas apresentam 2 anéis ligados, sendo um anel de pirimidina associado a outro de imidazol (Mullen; Singh, 2023).

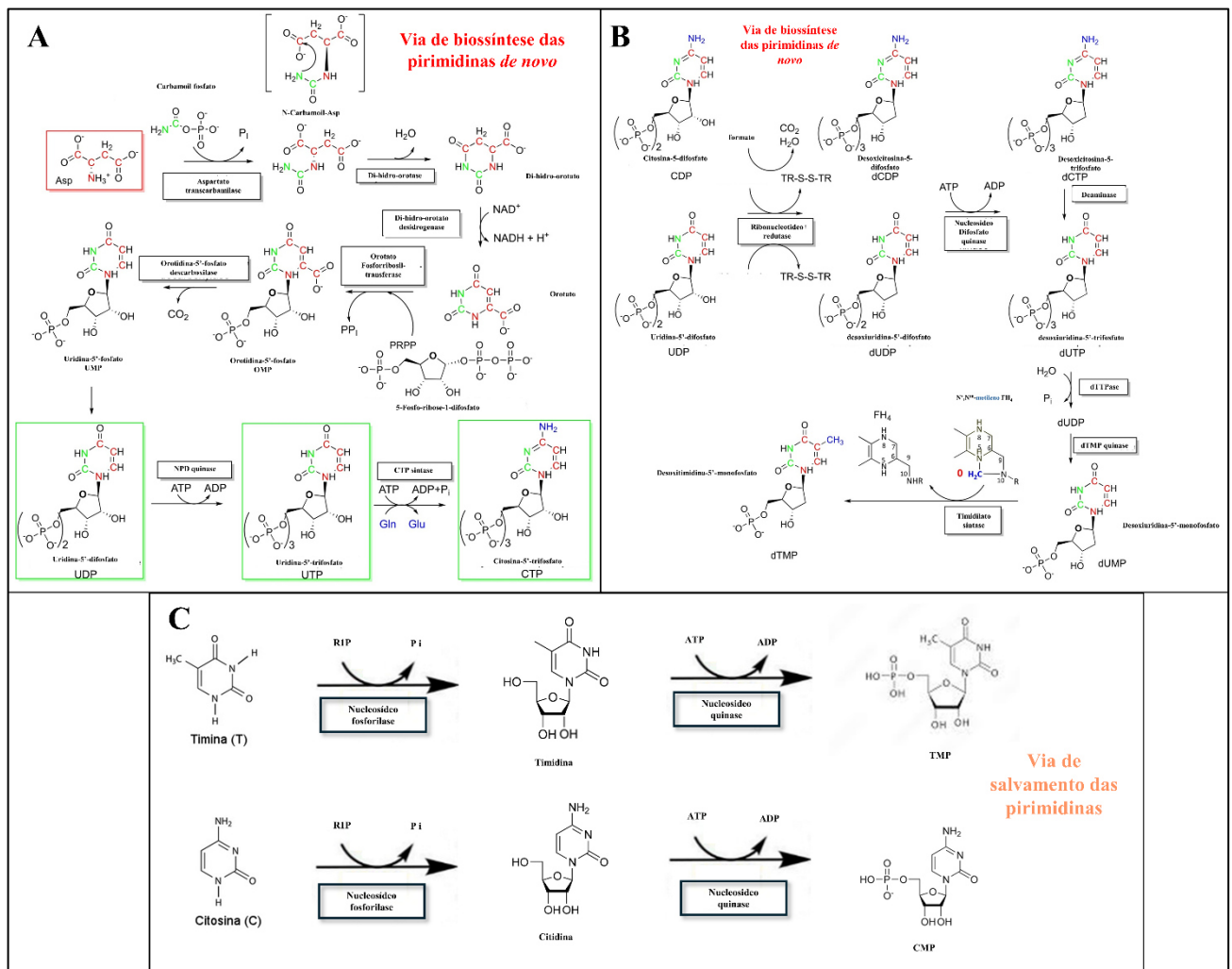
Há 2 tipos de vias biológicas distintas pelas quais as células eucarióticas utilizam para a síntese de nucleotídeos: a via *de novo* e a via de salvação, e ambos têm a sua importância no metabolismo celular. A diferença básica entre elas está na matéria-prima utilizada, em que a síntese *de novo* inicia-se com determinados precursores metabólicos e é a principal opção de síntese na maioria das células em proliferação. E sobre a matéria-prima utilizada, para sintetizar as purinas, é necessário usar formil, dióxido de carbono e aminoácidos, já as pirimidinas, utilizam-se dióxido de carbono, ácido aspártico e glutamina. A outra rota metabólica usa uma estratégia de reciclagem dos nucleotídeos livres gerados pela degradação de ácidos nucleicos exógenos ou endógenos (Mullen; Singh, 2023).

Na via de biossíntese *de novo*, o carboidrato ribose-5-fosfato (R5P) e o aminoácido glutamina são as principais moléculas iniciadoras para produção de nucleotídeos. A R5P é produzida a partir da glicose pela via das pentoses fosfato, na qual essa é a matéria-prima para produzir purinas e pirimidinas, e o aminoácido é a fonte de nitrogênio. Também, é importante frisar que as duas classes de nucleotídeos, purinas e pirimidinas, são construídas de maneiras diferentes (Ali; Ben-Sahra, 2023). O anel púrico é estruturalmente sintetizado ligado à própria ribose ao longo do processo, que envolve 11 etapas, e com a incorporação de alguns átomos por vez. No final, isso gera a molécula monofosfato de inosina (IMP), que em seguida produz monofosfato de adenosina (AMP) e monofosfato de guanosina (GMP) (Suleiman et al., 2025).

Essa via envolve a participação de 10 enzimas, são elas: fosforribosil pirofosfato sintetase (PRPS); fosforribosil pirofosfato aminotransferase (PPAT); proteína biossintética de purina trifuncional adenosina-3 (GART); formilglicinamida ribotídeo aminotransferase (FGAM); fosforribosilaminoimidazol carboxilase/ fosforribosilaminoimidazol succinocarboxamida sintetase bifuncional (PAICS); adenilosuccinato liase (ADSL); proteína de biossíntese de purina bifuncional (ATIC); IMP desidrogenase (IMPDH); GMP sintetase (GMPS) e adenilosuccinato sintetase (ADSS) (FIGURA 2) (Aird; Zhang, 2015).



Figura 3 - Diagrama esquemático da via de biossíntese das pirimidinas



Fonte: adaptado de Aird; Zhang (2015).

As contribuições científicas dos estudos para desvendar os mecanismos básicos da carcinogênese abriram espaço a novas oportunidades para a descoberta de estratégias terapêuticas promissoras no combate ao câncer (Navarro et al., 2022). Partindo da premissa que o câncer adota um metabolismo energético desregulado para suportar a extrema demanda energética, e sabendo também que ele necessita sintetizar uma grande quantidade de ácidos nucleicos para garantir seu fenótipo maligno de replicação ilimitado. Com isso, com base em uma exigência metabólica crítica para o tumor, diversos potenciais alvos moleculares ganharam destaque, como alternativas de tratamento para prejudicar e impedir esse suprimento de intermediários fundamentais para tumor, a destacar alguns genes que fazem parte na via anabólica de nucleotídeos e os seus produtos moleculares, as proteínas PRPS1, HPRT1,

MTHFD, TYMS e DHODH (Ciszewski et al., 2022; He; Chao; You, 2017; J. Sedano et al., 2020; Li et al., 2019; Xiong et al., 2022; Yu et al., 2019).

Foi relatado que os genes responsáveis em traduzir essas proteínas estão hiper-expressos em diversos tipos de tumor capazes de atuar na progressão e na malignidade tumoral, como câncer de mama (He; Chao; You, 2017; J. Sedano et al., 2020), melanoma (Xiong et al., 2022), câncer de cólon retal (Li et al., 2024), câncer de próstata (Burdelski et al., 2015) e no carcinoma de próstata (Guo et al., 2024). Além disso, os referidos estudos comprovaram que o uso de estratégias para reduzir ou silenciar a expressão dos genes causou a reversão do quadro maligno ou tornou o tumor mais sensíveis às intervenções terapêuticas.

A molécula 5-fosfato ribose-1-pirofosfato (PRPP) é um precursor importante para a síntese de purinas e pirimidinas, na qual é o componente inicial da via (Li et al., 2015). A 5-fosfato ribose-1-pirofosfato sintase (PRPS) é a enzima responsável por gerar esse intermediário metabólico e contém 3 genes presentes no genoma humano responsáveis em traduzir para 3 isoformas proteicas, pelos quais a PRPS1 e PRPS2 estão presentes de maneira constitutiva, já a isoforma PRPS3 é exclusiva nos testículos (Becker et al., 1990; Taira et al., 1989). Essa enzima catalisa a reação utilizando ATP e ribose-5-fosfato (R5P) como substrato (Kornberg; Lieberman; Simms, 1955). Essa reação é dita como etapa limitante da via, pois sem o PRPP, não é possível continuar a via de biossíntese (Becker, 2001). Portanto, tornando-se uma enzima crítica da regulação da via. Foi identificado que a PRPS1 é superexpressa em câncer de mama humano promovendo o crescimento tumoral e metástase, além de atuar em mecanismos de supressão da morte celular (He; Chao; You, 2017).

A hipoxantina guanina fosforribosil transferase 1 (HPRT1) é uma enzima da via de salvamento e o gene responsável em transcrevê-la era considerado um gene de manutenção. Essa proteína desempenha uma função vital na recuperação de intermediários de nucleotídeos para a formação eventual de guanina e inosina. Isso se dá pela transposição da fosforribose para as bases da guanina ou hipoxantina. Além disso, o pH exerce forte influência sobre a conformação proteica final, na qual pode existir como homo-dímeros ou homo-tetrâmeros (Lu et al., 2024; Townsend; Robison; O'Neill, 2018). Estudos relatam que a desregulação gênica do *HPRT1* pode causar certas síndromes e comprometer a capacidade motora e cognitiva, além da recorrência de vários tipos de tumores em casos de regulação positiva desse gene, como o câncer de mama e de pulmão (J. Sedano et al., 2020; Lu et al., 2024; Townsend; Robison; O'Neill, 2018).

Considerada uma proteína fundamental no ciclo do folato, a MTHFD1 trata-se de uma enzima multifuncional que desempenha 3 funções distintas, a citar metilenotetraidrofolato

desidrogenase, meteniltetraidrofolato ciclohidrolase e formiltetraidrofolato sintetase das quais produzem intermediários para a biossíntese de nucleotídeos de purinas (Guan et al., 2024). Por exercer múltiplas funções no organismo, em certos casos de mutações na proteína humana, isso ocasiona complicações graves e combinadas, por exemplo, imunodeficiência e anemia (Li et al., 2024). Outrossim, achados na literatura comprovam que essa proteína está intimamente relacionada à malignidade tumoral do tipo colorretal (Li et al., 2024).

O nucleotídeo timidilato (dTTP) é um constituinte essencial para a replicação e reparo do DNA, mas para gerar essa molécula, é necessária uma enzima chave, chamada timidilato sintase (TYMS), logo a sua expressão pode regular a proliferação celular e, conseqüentemente, sendo um fator limitante para a consolidação de um tumor (Burdelski et al., 2015). Pesquisas relataram que a simples regulação positiva do gene *TYMS* torna-se uma característica suficiente para modelar e transformar células saudáveis em um perfil proliferativa indefinido (Rahman et al., 2004). Ademais, estudos clínicos evidenciaram que há uma relação entre o perfil agressivo do tumor e a regulação positiva do *TYMS*, destacando o câncer colorretal, de mama e de pulmão, incluindo até o gástrico (Rahman et al., 2004).

E, por fim, na via de biossíntese *de novo* de pirimidinas, a enzima, da classe das oxidorreductase, di-hidroorotato desidrogenase (DHODH) cumpre uma função importante na síntese do intermediário metabólico monofosfato de uridina (UMP), na qual pode ser utilizado para produzir os principais nucleotídeos necessários para uma célula em replicação (Boukalova et al., 2020). Certos trabalhos mostram que o comprometimento da enzima DHODH prejudica na replicação de células neoplásicas em ensaios *in vitro* (Boukalova et al., 2020; Guo et al., 2024; Li et al., 2019).

## 1.2 Anatomia do estômago

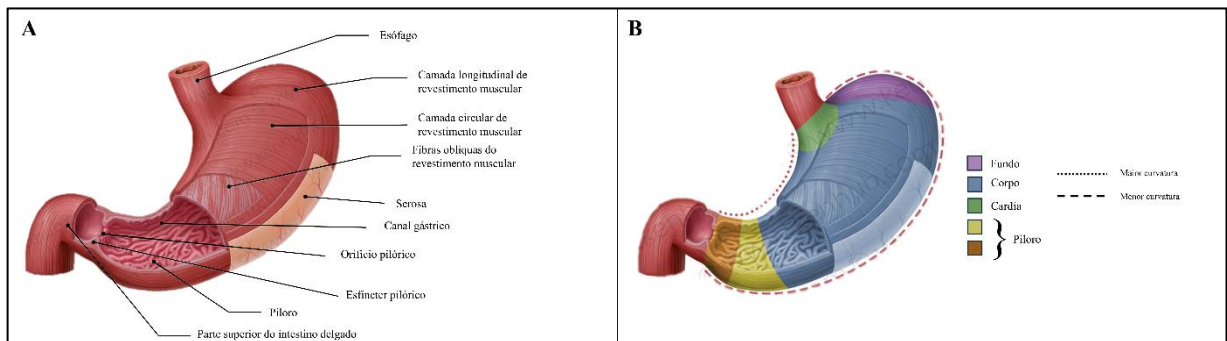
O estômago é um órgão que faz parte do sistema gastrointestinal, atuando tanto na digestão quanto no armazenamento de alimentos, e está localizado entre o esôfago e o intestino delgado. Além disso, trata-se de um órgão oco, com revestimento muscular e relativamente grande, podendo reter cerca de 2 a 3 litros de alimento (Hosoda; Watanabe; Yamashita, 2018; Mahadevan, 2014).

Esse sítio anatômico é dividido em 4 regiões principais: cárdia, fundo, corpo e piloro. A cárdia está conectada ao esôfago e refere-se à porção por onde o alimento entra. Em seguida, há o fundo, na região inferior, uma área bulbosa em forma de cúpula. Além disso, o corpo ocupa a maior porção do estômago, situando-se na área central do órgão. Distalmente à cárdia, temos

o piloro na parte inferior do corpo, o qual direciona o alimento para o intestino (Collins et al., 2025; Soybel, 2005).

Além disso, o estômago é formado pelos seguintes segmentos: a mucosa, a submucosa, a muscular externa e a serosa, sendo consideradas as 4 camadas que revestem e constituem a arquitetura do lúmen do estômago. A camada mais interna, a mucosa, é constituída por tecido epitelial e apresenta principalmente células com funções secretoras, por exemplo, o fundo secreta suco gástrico (Ácido clorídrico) para auxiliar na digestão de alimentos e a cárdia produz e secreta muco com função protetora contra o ácido. A próxima camada, submucosa, sustenta a mucosa e representa tecido conjuntivo denso, além de conter sangue, vasos linfáticos e nervos. Ademais, as camadas seguintes são tecidos musculares e múltiplas camadas de tecido conjuntivo, que representam a serosa (FIGURA 4) (Daniels; Allum, 2005; Soybel, 2005; Wilson; Stevenson, 2019).

Figura 4 - Representação dos segmentos e das regiões que formam o estômago



Fonte: adaptado de NATIONAL CANCER INSTITUTE (2021).

Várias condições clínicas podem afetar o estômago, dentre elas podemos citar certas infecções causadas por microrganismos, por exemplo, a bactéria *Helicobacter pylori*, comumente se instalando neste sítio, ou até distúrbios genéticos, como o próprio câncer (Gonçalves, 2019; Mazurek et al., 2024; Pimentel; Rocha; Santana, 2019). O câncer de estômago, também chamado câncer gástrico (CG), é um tipo de neoplasia que tem origem nas células que formam o tal órgão. Por se tratar de um órgão grande e com um conjunto de tecidos desempenhando funções complementares, dessa forma, essa classe de tumor é organizada em vários subtipos, de acordo com a região de origem que é afetada por esta malignidade (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2021).

Com isso, o CG pode ser classificado em: adenocarcinoma gástrico, adenocarcinoma da junção gastroesofágica, tumores neuroendócrinos gastrointestinais, tumores estromais gastrointestinais, linfoma gástrico primário, carcinoma de células escamosas, carcinoma de pequenas células e leiomiossarcoma. O tipo adenocarcinoma lidera nas taxas de incidência,

representando cerca de 95% de todos os casos diagnosticados de tumor no estômago, enquanto que os linfomas apresentam apenas 3% dos diagnósticos. Enquanto que os outros tipos são considerados raros de serem detectados na população, a citar os sarcomas que acometem os músculos, ossos ou cartilagens (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2021; INCA, 2022).

### **1.3 Câncer gástrico**

Assim como a maioria dos tipos de cânceres, o CG pode progredir e evoluir ao longo do tempo, além de poder se espalhar para outros sítios anatômicos e tornar-se mais resistente ao tratamento quimioterápico. Dessa forma, para entender o nível de progressão do tumor existem vários sistemas que o classificam em estágios. E para o CG geralmente é utilizado o sistema TNM. Esse estadiamento é dividido em 4 tipos (I, II, III e IV) e também cada etapa pode ser subdividida em subtipo A, B ou C (Amin et al., 2017).

Para sumarizar as características de cada estágio, tem-se que o primeiro estágio pode ser definido como: o câncer teve origem na mucosa e pode migrar para a submucosa, além disso, pode atingir até 2 linfonodos proximais. Já no próximo nível, estágio II, o tumor pode invadir camadas até a serosa e afetar vários linfonodos próximos. E no estágio seguinte, 3, chega um momento crítico, pelo qual a neoplasia tem a capacidade de invadir e se espalhar para órgãos vizinhos, como baço, fígado ou pâncreas. E na etapa mais avançada da doença, estágio IV, também chamado de estágio metastático, ocorre quando o tumor maligno atinge o sistema sanguíneo ou linfático e pode colonizar e se instalar em inúmeros órgãos ou sítios anatômicos distintos, como o pulmão (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2021).

Entender o estadiamento do câncer gástrico é um dado extremamente importante para o profissional da saúde, pois assim é possível elaborar o melhor conjunto de intervenções clínicas para o tratamento e potencial cura do paciente (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2021).

#### **1.3.1 Epidemiologia**

De acordo com dados atualizados da agência internacional de pesquisa sobre o câncer, estima-se que houve cerca de 20 milhões de novos casos diagnosticados de câncer no mundo em 2022, além de quase 10 milhões de pacientes que sucumbiram à doença. Essa estatística está incluindo câncer de pele não melanoma (CPNM). Dentre esses dados, o câncer gástrico representa 4,9% e 6,8% do total em prevalência e em letalidade, respectivamente. Ao redor do

mundo, este tipo de neoplasia permanece sendo uma das mais comuns e uma das mais letais (Bray et al., 2024).

Um estudo publicado no Japão destacou que o tempo de sobrevivência e a qualidade de vida do paciente estão intimamente relacionados ao estágio em que o câncer foi diagnosticado, pois tumores em fases mais avançadas, com metástases disseminadas, tendem a ser mais resistentes às estratégias terapêuticas e mais agressivos (Ito et al., 2021). Nessa análise, a precarização em métodos de diagnóstico precoce e a falta de abordagens alternativas para o tratamento clínico são alguns dos motivos que impulsionam o número de mortes. E como o CG apresenta um comportamento insidioso nos primeiros estágios de desenvolvimento, a grande parcela dos pacientes acometidos com essa malignidade já se encontram em estágios avançados no momento do diagnóstico (Rawla; Barsouk, 2019).

Este tipo de malignidade é classificado como sendo o quinto tipo mais recorrente na população mundial, estando na mesma posição em relação ao número de mortes. Além disso, nota-se que as maiores taxas de CG se encontram na Ásia oriental (23/100 mil), na Europa oriental (16,2/100 mil) e na América do sul (12,8/100 mil), enquanto que o continente africano (com média de 4,5/100 mil) e a América do norte (5,2/100 mil) detêm das menores taxas de incidência (Bray et al., 2024).

Uma observação importante é que o público masculino é frequentemente mais afetado pelo CG, apresentando cerca de duas vezes mais casos e número de mortes em relação ao sexo oposto. Para 2022, foram estimados 627.229 casos na população masculina e 341.121 na população feminina, enquanto que as taxas de mortalidade apresentaram os valores de 427.421 e de 232.432 para os mesmos gêneros, respectivamente (Bray et al., 2024).

Além disso, percebe-se que o Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) tem uma forte influência na epidemiologia da doença, visto que o CG tem uma maior prevalência em países com IDH considerado alto, apesar disso a proporção do número de mortes é maior em países com IDH inferior. Para esses países com IDH superior, o CG ocupa o quinto lugar, na população masculina, em incidência (15,1/100 mil) e o 4º, em mortalidade (9,5/100 mil), já para as mulheres, a sua posição cai para a oitava colocação em ocorrência e vai para o sétimo lugar em letalidade, sendo 6,8/100 mil e 4,1/100 mil, respectivamente. Enquanto que no contexto de IDH considerado médio ou baixo, o CG representa o quinto lugar em incidência com 6,4/100 mil, e o sexto em mortalidade (5,7/100 mil) em homens. E para as mulheres, com 3,6/100 mil em frequência e 3,2/100 mil para letalidade, isso reflete a sexta posição para as 2 categorias (Bray et al., 2024).

Ademais, os dados epidemiológicos sobre o CG em contexto nacional são preocupantes, Santos e colaboradores (2023) publicaram uma estimativa no Brasil para o triênio 2023-2025. Esse estudo deduziu que haverá um total de 13.340 novos casos para o homem e 8.140 para as mulheres. E as regiões com maior taxa de incidência são: Norte (11,78/100 mil) e Nordeste (10,7/100 mil) para os homens, enquanto que para o sexo oposto, são Norte (5,46/100 mil) e Centro-Oeste (5,15/100 mil) (INCA, 2023).

### 1.3.2 Classificação

Assim, como bem exposto anteriormente, fica claro que a epidemiologia do CG é moldada de acordo com a região e pelo gênero isso acontece, pois existem diversos fatores que influenciam o risco de desenvolver um CG, como algumas infecções e fatores dietéticos (Thrift; Wenker; El-Serag, 2023). Dessa forma, esse tipo de neoplasia é definido como uma malignidade altamente heterogênea, na qual pode apresentar inúmeras variabilidades de caráter morfológico e molecular para pacientes distintos e até para o mesmo tumor (Yoo et al., 2020).

Com isso, surgiram vários sistemas de classificação histológicos e morfológicos, como formar de tentar descrever as diferenças presentes neste tipo de tumor, todavia algumas dessas classificações se destacaram e tornaram-se as mais populares no campo científico. Uma delas é a classificação emitida pela OMS em 2010, que define vários subgrupos, como carcinoma tubular, mucinoso, papilar e pouco coeso (Machlowska et al., 2020). Já a outra ideia de classificação seria a de Lauren, considerada com maior relevância prognóstica e utilizada na prática clínica, na qual adota uma divisão entre 2 classes do adenocarcinoma, a saber, o tipo difuso e intestinal (Chen et al., 2016).

Esse critério formalizado por Lauren foi construído a partir de inúmeras características e diferenças observadas, como a histopatologia, a epidemiologia e a etiologia entre os dois subtipos propostos. Dentre as principais características destacadas pelo pesquisador, podemos citar que o tipo intestinal é bem diferenciado histologicamente e há uma maior prevalência em homens com idade avançada. Em contrapartida, o tipo difuso apresenta um aspecto histológico não diferenciado e não foi encontrada uma predileção por sexo, mas são frequentes os casos em indivíduos jovens (MA et al., 2016; Hu et al., 2012).

O adenocarcinoma é um dos subtipos de CG, que surge a partir de células glandulares das camadas que revestem o estômago. Embora não seja o único tipo de CG, representa a maioria dos casos clínicos diagnosticados em pacientes, refletindo cerca de 90% dos cânceres de estômago (Karimi et al., 2014). Há outras variações de malignidade que podem surgir no

estômago, incluindo leiomiiossarcomas, derivados das células musculares que revestem a mucosa, e o linfoma do tecido linfoide associado à mucosa (MALT), cuja origem vem do tecido linfoide presente no estômago (Karimi et al., 2014).

O CG é dito como uma doença de caráter multifatorial, ou seja, o tumor pode surgir não apenas pela influência de um único indutor, mas sim pela combinação e acumulação de diversos riscos a que o indivíduo pode estar exposto ao longo do tempo e, assim, aumentando a probabilidade do surgimento dessa neoplasia (Rawla; Barsouk, 2019; Yang et al., 2023).

Existem os famosos fatores de risco não modificáveis, como idade, sexo, raça/etnia e genética, e também há os fatores controláveis, isto é, dependendo da nossa tomada de decisão e adoção de hábitos, isso irá influenciar o desenvolvimento do câncer. Dentre esses casos, podemos incluir a infecção bacteriana por *Helicobacter pylori*, obesidade, consumo de tabaco e bebidas alcoólicas, contato com produtos químicos ou radiação (Clinton; Giovannucci; Hursting, 2020; Health Commission of the People's Republic of China, 2022; Joshi; Badgwell, 2021a; Rawla; Barsouk, 2019). Portanto, fica claro que o estilo de vida e a adoção de hábitos saudáveis influenciam sinteticamente a carcinogênese gástrica.

### 1.3.3 Tratamento

Dentre o arsenal de tratamento aplicado ao CG são incluídas as seguintes estratégias: ressecção endoscópica, cirurgia, radioterapia, quimioterapia e terapias direcionadas. Essas opções são comumente utilizadas em conjunto dependendo de alguns fatores clínicos, como o estadiamento do tumor, a sua localização anatômica e condições atribuídas ao paciente. Sobre os procedimentos de endoscopia, esses são técnicas minimamente invasivas e adotadas em pacientes com tumores limitados à região da mucosa e em estágio inicial do CG. São utilizadas para remover lesões pequenas e sem um perfil metastático (Joshi; Badgwell, 2021).

No caso da técnica cirúrgica, a ressecção gástrica permanente sendo a única abordagem de caráter com potencial curativo em pacientes com estágios iniciais, além de se tratar de um procedimento minimamente invasivo e de escolha padrão, visto que os estudos mostram que há uma taxa de sobrevida global em 5 anos acima de 90% para o estágio inicial, todavia na realidade, a maioria dos pacientes são apenas diagnosticados em estágios avançados do tumor (Kim et al., 2018, 2015). Para esses pacientes com CG avançado, a taxa de sobrevida em 5 anos é menor que 10% (Qiu et al., 2024). Ademais, os profissionais da saúde indicam a combinação da quimioterapia, pois melhora a taxa de sobrevivência dos pacientes com tumor localmente avançado (Smyth et al., 2020).

A respeito de outra intervenção clínica utilizada como forma de tratamento contra o CG tem-se a radioterapia. Também é recomendada a combinação com a quimioterapia em casos de pacientes que não utilizaram a quimioterapia pré-operatória. Um estudo clínico randomizado de fase 3 demonstrou que essa modalidade combinatória se torna eficiente, na qual cerca de 600 pacientes com CG até o estágio 3 foram separados em 2 grupos, para realizar apenas a cirurgia ou em combinação com quimiorradioterapia adjuvante. Com isso, os resultados revelaram uma melhor taxa de sobrevida, de aproximadamente 20%, referente ao grupo com a intervenção combinada (Smalley et al., 2012).

E para finalizar o arsenal terapêutico disponível para o CG, cabe salientar a utilização de quimioterápicos, na qual existem as estratégias neoadjuvantes (pré-operatórias), adjuvantes (pós-operatórias) e as terapias direcionadas. A administração de drogas anterior e após o procedimento cirúrgico tem como objetivo mitigar o estadiamento de tumores iniciais e linfonodos proximais e, assim, potencializar a eficiência de cura a longo prazo. Essa estratégia de conciliar as terapias neo e adjuvantes também é chamada de quimioterapia perioperatória (Joshi; Badgwell, 2021).

Nos casos de pacientes com tumores avançados e com alto risco, há a opção de utilizar a terapia neoadjuvante para diminuir o risco de cirurgias desnecessárias caso tenha metástase. Cunningham e colaboradores (2006) realizaram um estudo clínico para avaliar o papel do regime farmacológico em tumores localmente avançados, na qual estiveram presentes aproximadamente 500 pacientes com 3 diferentes tipos de câncer no estômago. Dessa forma, a pesquisa analisou e comparou 2 condições, nas quais uma parcela dos pacientes fora submetida a quimioterapia perioperatória antes do procedimento operatório e o restante, apenas à cirurgia e, assim, os resultados finais concluíram que foram identificados uma melhor sobrevida global, diminui o tamanho e o estágio do tumor, além de melhorar a janela de sobrevida livre da progressão do câncer para o grupo que fez uso da quimioterapia (Cunningham et al., 2006).

No caso da abordagem adjuvante, é corrente a utilização em indivíduos que não receberam a terapia pré-operatória. Essa estratégia foi avaliada em um estudo japonês para analisar se, de fato, a terapia pós-operatória teria um impacto positivo na sobrevida do paciente. Assim, utilizaram-se 2 condições em que os pacientes foram tratados com a terapia adjuvante e comparados com aqueles que realizaram a cirurgia isolada, em um total de 1059 indivíduos acometidos com CG. E os dados obtidos destacam que houve um incremento na sobrevida com uma taxa de sobrevida global em 5 anos de 72% no grupo utilizando a terapia em contraste com 61% na condição cirúrgica isolada (Sakuramoto et al., 2007).

Com o surgimento e a ascensão da imunoterapia como alternativa para pacientes acometidos com CG em estadiamento maligno, isso revolucionou a perspectiva de tratamento para o tumor. Por exemplo, pode-se citar o desenvolvimento de anticorpos anti-PD-1 o qual revelou resultados satisfatórios em indivíduos com CG metastático, pelo qual houve um incremento da sobrevida (Chao et al., 2021).

Em certas circunstâncias em que a doença apresenta metástase ou irrissecável localmente, geralmente recorre-se a quimioterapia como tratamento paliativo, devido ao grau avançado do tumor. Assim, o papel dessa abordagem é aliviar os sintomas, tentar melhorar a qualidade de vida e estender levemente a sobrevida do paciente. Nesta perspectiva, muitos medicamentos são utilizados, a citar fluorouracil, compostos de platina, irinotecano e até terapias alvo-direcionadas (Joshi; Badgwell, 2021).

#### **1.4 Reposicionamento de fármacos**

Tradicionalmente, para disponibilizar um novo medicamento na clínica, é necessário realizar e cumprir 2 etapas básicas, os testes pré-clínicos e os clínicos. Os estudos antes de chegar à etapa clínica são elaborados para atender aos seguintes critérios: identificação da farmacocinética e da farmacodinâmica, teste de eficácia, toxicidade e segurança da molécula em estudo. Em seguida, caso a etapa anterior tenha alcançado resultados promissores, as pesquisas avançam para os ensaios em humanos para assegurar a eficácia e a segurança, e isso define os testes clínicos. Geralmente, a adoção desse procedimento gasta, em média, uma década ou mais, e é necessário o investimento na casa dos bilhões para gerar um novo medicamento aprovado para uso clínico (Shim; Liu, 2014; Xia et al., 2024). Ademais, os resultados esperados são mínimos em comparação ao investimento imposto, pelo qual, pelo menos, uma em cada cem moléculas testadas avança para os ensaios clínicos, e às vezes nem chega ao mercado devido ao potencial terapêutico limitado (Shim; Liu, 2014; Xia et al., 2024).

Ademais, outro dado alarmante é que, na virada do século, embora houvesse um aumento de, aproximadamente, 10 vezes em relação aos investimentos na área de pesquisa e desenvolvimento (P&D) na busca de novos fármacos, o número de moléculas descobertas e aprovadas por agências reguladoras não acompanhou esse investimento, isto é, tendo estagnado a quantidade de fármacos descobertos mesmo com o incremento no campo de P&D (Mullard, 2014). Esses dados escancaram que a tática tradicional na descoberta de novos fármacos é inviável e exigem estratégias alternativas mais eficientes.

Somado a isso, a utilização de drogas citotóxicas é o procedimento tradicional para o tratamento do câncer, embora o desenvolvimento da tolerância aos quimioterápicos seja comum e tenha se tornado um grande problema na clínica. Essa limitação da quimioterapia leva ao desenvolvimento de clones celulares refratários resistentes aos fármacos antineoplásicos (Zhao, 2016). Essa resistência terapêutica é o fator que contribui para a recidiva do tumor e para um prejuízo na sobrevivência dos pacientes. Essa problemática foi observada para a maioria dos medicamentos que compõem o arsenal contra neoplasias graves, incluindo o CG, como os medicamentos cisplatina, 5-fluorouracil (5-FU) e oxaliplatina (Hu et al., 2020; Li et al., 2014; Ramos; Sadeghi; Tabatabaeian, 2021; Wang et al., 2020; Zhang et al., 2008). Sendo assim, é necessário promover novas abordagens de pesquisa para a adoção de fármacos alternativos promissores no contexto de terapia antineoplásica, como forma de ampliar o leque de possibilidades para o tratamento.

Dessa forma, a abordagem de reposicionamento ou redirecionamento farmacológico surge como uma oportunidade valiosa e promissora para o campo terapêutico e clínico. Essa técnica baseia-se no estudo e na exploração de novas aplicações farmacológicas, buscando alvos inéditos fora do escopo do tratamento original do medicamento, a partir de fármacos que são reconhecidos e aprovados por órgãos responsáveis (Kulkarni et al., 2023). O reposicionamento de moléculas traz consigo inúmeras vantagens técnicas, desde a presença de dados prévios importantes, a citar a segurança, toxicidade e dosagem do fármaco de origem, até a economia de tempo e de dinheiro investido nessas pesquisas, uma vez que todos os ensaios pré-clínicos e clínicos foram concluídos, o que diminui o risco de falhas também, logo é poupado recursos financeiros, além do tempo investido na pesquisa (Pinzi; Bisi; Rastelli, 2024). Um estudo demonstrado por Nosengo relatou que os investimentos introduzidos na pesquisa, de uma molécula reposicionada, requerem cerca de 300 milhões de dólares, e é concluído em torno de 7 anos (Nosengo, 2016). Portanto, percebe-se uma economia, em aproximadamente 70% dos gastos, e o prazo de finalização caindo pela metade do tempo, em média, ao ser comparado pelo método clássico.

A elucidação dessas aplicações inéditas sobre determinados fármacos frequentemente acontecia ao acaso ou pela análise dos efeitos colaterais não previstos (Ashburn; Thor, 2004). Todavia, uma nova estratégia na descoberta de aplicações farmacológicas surgiu após os avanços da computação e das “ômicas”. Este campo científico está voltado para a análise em larga escala de dados biológicos e pode ser dividido em áreas como: proteômica, genômica ou transcriptômica, além disso, o volume de informações geradas nesse nicho está em constante ascensão (March-Vila et al., 2017). Dessa forma, essa metodologia computacional é de grande

interesse para a comunidade científica, tendo em vista o seu potencial de exploração para a descoberta de moléculas promissoras na saúde humana.

Dentre os inúmeros bancos de dados pode-se citar o Protein Data Bank (PDB), com o depósito de mais de 220 mil biomoléculas, como proteínas isoladas ou complexadas com ligantes (Burley et al., 2022) ou o PubChem, sendo uma fonte online com mais de trezentos milhões de substâncias armazenadas (Kim; Bolton, 2024). Com isso, são inúmeras as possibilidades para pesquisar e explorar esses dados biológicos, abrindo espaço para abordagens como o estudo de alvos moleculares, mutações genéticas, distúrbios metabólicos, medicamentos promissoras e biomarcadores (Pinzi; Bisi; Rastelli, 2024).

Nessa perspectiva, surge a possibilidade de unir essa estratégia do reaproveitamento de medicamentos aliada com as metodologias computacionais e tornando-se uma abordagem promissora na terapia oncológica, visto que isso fornece um novo caminho para a descoberta de novas terapias, tendo como direcionamento, os alvos moleculares que são essenciais para a sobrevivência do tumor, a citar as 14 marcas do câncer proposto por Hanahan (Hanahan, 2022).

Até o presente momento vários medicamentos já foram utilizados nos estudos de reaproveitamento para a oncologia, dentre eles, alguns ganham destaque no âmbito científico, como metformina, artemisia ou estatinas, sendo todos medicamentos aprovados originalmente para tratar outras doenças. Dentre várias classes de drogas, os benzimidazóis tornaram-se uma figura de destaque neste campo, visto que existem várias pesquisas que demonstram o potencial papel dessas moléculas em combater células neoplásicas, revelando o seu efeito promissor anticancerígeno (Xia et al., 2024).

#### **1.4.1 Mebendazol**

Os benzimidazóis são substâncias orgânicas aromáticas constituídas pela união de estruturas químicas entre o benzeno e o imidazol, e trata-se de uma classe de medicamentos muito utilizada na medicina humana e veterinária (Aliabadi et al., 2025; Nimbalkar et al., 2025; Xia et al., 2024). As principais moléculas que formam esse grupo são: albendazol, flubendazol e mebendazol. Esta última substância, o mebendazol (MBZ), tem ganhado destaque no campo científico por ser um exemplo promissor no reaproveitamento, pois diversos trabalhos destacam o seu potencial efeito anticancerígeno em diversas linhagens celulares tumorais (Aliabadi et al., 2025; Song et al., 2022).

O mebendazol (5-benzoil-1H-benzimidazol-2-ilcarbamato; MBZ) foi estudado pela primeira vez no final da década de 1960 e o seu uso foi aprovado, originalmente, para combater

certos helmintos (Brugmans et al., 1971). À princípio, essa droga foi adicionada no mercado como agente anti-parasitário ao bloquear o crescimento celular, a partir do seu mecanismo de ação ao impedir a captação de nutrientes e interromper a formação dos polímeros de tubulinas, evento importante para a manutenção celular, portanto, caso esse processo seja interrompido, pode levar a morte em células de proliferação rápida (Aliabadi et al., 2025). Após a compreensão do efeito dessa droga no parasita e também pelo avanço nos estudos sobre a biologia do câncer, foi possível direcionar o MBZ para a oncologia. O primeiro estudo que investigou o potencial efeito antineoplásico do MBZ foi feito por Mukhopadhyay et al., no início deste século, no qual observou esse mecanismo *in vitro* com a cultura celular da linhagem de câncer pulmonar (Mukhopadhyay et al., 2002).

Posteriormente, vários estudos relataram resultados similares, pelo destaque que o anti-helmíntico demonstrou ser capaz de interferir no crescimento de linhagens de células cancerígenas e também tal comportamento foi observado *in vivo*, isto é, em modelos animais através do bloqueio da polimerização por microtúbulos (Larsen et al., 2015; Skibinski; Williamson; Riggins, 2018; Williamson et al., 2016; Zhang et al., 2019). Esse efeito gera, como consequência, a interrupção na etapa de divisão celular e pode ocasionar morte celular programada (Petersen; Baird, 2021).

Ao longo dessas últimas duas décadas, houve um forte crescimento nos trabalhos publicados a respeito do MBZ como potencial fármaco para a oncoterapia, na qual várias investigações relataram o potencial uso em estudos pré-clínicos e clínicos (Aliabadi et al., 2025). Um estudo pré-clínico publicado em 2015 testou e avaliou se o MBZ pode representar uma alternativa de escolha como inibidor da angiogênese tumoral (Bai et al., 2015). Além disso, relatórios mostram que a molécula MBZ pode exercer propriedades inibitórias no crescimento tumoral, evoluindo para a morte celular programada para diferentes tipos de câncer, como melanoma, câncer de pulmão, glioma ou câncer de cólon (Larsen et al., 2015). Inclusive, há trabalhos relatando o seu papel no CG, Pinto et al descreveu que esse medicamento foi capaz de inibir a proliferação de uma linhagem gástrica maligna (Pinto et al., 2015).

Portanto, tendo em vista o histórico sobre pesquisas demonstrando o seu potencial efeito antiproliferativo em tumores, essas evidências reforçam a ideia que, de fato, o MBZ pode atuar como uma alternativa promissora na terapia clínica. E assim, isso possibilita novas perspectivas de aplicação do MBZ e abre caminho para novos estudos e pesquisas para explorar os potenciais mecanismos e os alvos moleculares pelo qual o anti-helmíntico pode atuar em linhagens de adenocarcinoma gástrico.

## 1.5 Ancoragem molecular

Para entender o efeito e a segurança de um fármaco, é importante estabelecer estudos sobre como a droga irá se comportar frente ao organismo, quais os seus mecanismos de ação ou alvos moleculares. Após o aprimoramento de ensaios bioquímicos, como purificação com alto rendimento de proteínas ou cristalografia, isso impulsionou os estudos, de maneira precisa, sobre a descoberta na arquitetura de inúmeras macromoléculas e a formação de complexos entre proteína e pequenos ligantes. Ao mesmo tempo que essas estratégias abriram mais espaço para os procedimentos *in silico* na pesquisa de novos fármacos (Gohlke; Hendlich; Klebe, 2000a; Meng et al., 2011; Pagadala; Syed; Tuszynski, 2017).

Docking molecular, também conhecido como encaixe molecular ou atracamento molecular, trata-se da estratégia principal quando se pensa em design racional de medicamentos ou no estudo de complexos proteína e ligante. É uma técnica com potencial preditivo, que permite a realização de simulações computacionais com alta precisão para analisar o modo de interação entre moléculas específicas e um receptor, geralmente, estruturas proteicas (Raval; Ganatra, 2025; Trott; Olson, 2010). Dessa forma, é um ensaio que possibilita a investigação de compostos com potencial terapêutico e oferecendo resultados relativamente confiáveis com uma economia de tempo e de custos comparado à abordagem tradicional no desenvolvimento de novas drogas (Shim; Liu, 2014).

Esse experimento *in silico* teve início no final do século passado e desde então, houve diversos avanços nesta área com o aperfeiçoamento de algoritmos e a criação de programas utilizando diferentes metodologias nos estudos de ancoragem molecular. E recentemente essa área foi beneficiada com a incorporação da inteligência artificial (IA) e de aprendizado de máquina, aprimorando assim as suas capacidades na realização dos cálculos e de prever a formação do complexo (Kuntz et al., 1982; Pagadala; Syed; Tuszynski, 2017). E nos últimos anos vários estudos direcionaram o foco nessa área para revisar e para comprovar a precisão e o desempenho desses sistemas (Agu et al., 2023).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar o papel do fármaco Mebendazol como potencial modulador da via de biossíntese de nucleotídeos no câncer gástrico.

### 2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o perfil de expressão gênica dos transcritos *PRPS1*, *HPRT1*, *MTHFD1*, *TYMS* e *DHODH* no câncer gástrico em bancos de dados online do TCGA;
- Avaliar relação da expressão dos genes de vias de biossíntese de nucleotídeos com a sobrevida de pacientes portadores de adenocarcinoma gástrico por meio de bancos de dados online;
- Avaliar o perfil de expressão dos transcritos *PRPS1*, *HPRT1*, *MTHFD1*, *TYMS* e *DHODH* na linhagem metastática gástrica (AGP-01) e na linhagem não-tumoral gástrica (MNP-01) *in vitro*;
- Avaliar a modulação dos transcritos *PRPS1*, *HPRT1*, *MTHFD1*, *TYMS* e *DHODH* após o tratamento com o fármaco MBZ na linhagem celular de adenocarcinoma gástrico metastático (AGP-01) *in vitro*;
- Avaliar o potencial de interação entre o fármaco MBZ e as proteínas da via de biossíntese de nucleotídeos *PRPS1*, *HPRT1*, *MTHFD1*, *TYMS* e *DHODH*.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Preparo das proteínas e dos ligantes para o ensaio de atracamento molecular

O estudo de docking molecular foi realizado para tentar prever onde o MBZ pode se complexar com as proteínas que participam na via de biossíntese de nucleotídeos, além de analisar a afinidade entre o complexo formado, isto é, as interações que estabilizam o ligante. O banco de dados de macromoléculas Protein Data Bank (PDB – <https://www.rcsb.org/>) foi utilizado para buscar e selecionar as melhores estruturas tridimensionais (3D) dessas proteínas, e o download do arquivo para cada macromolécula foi em formato “.pdb”.

Os seguintes códigos PDB foram selecionados: Fosforribosil Pirofosfato Sintetase 1 – PRPS1 (ID PDB: 8DBI), Hipoxantina Guanina Fosforibosiltransferase 1- HPRT1 (ID PDB: 1HMP), Metilenotetra-hidrofolato Desidrogenase 1 – MTHFD1 (ID PDB: 6ECR), Timidilato Sintetase – TYMS (ID PDB: 5X5D) e Di-hidroorotato Desidrogenase – DHODH (ID PDB: 9CZE). Como parâmetros de busca das macromoléculas, foram utilizadas as seguintes métricas: estruturas obtidas por difração de raio-x por cristalografia ou microscopia crioeletrônica, com resolução igual ou inferior a 2,5 Angstrom (Å). Além disso, foi estabelecido as dimensões da grid box, na qual faz referência ao local no espaço que o ligante pode interagir com o seu receptor.

Tabela 1 - Códigos das proteínas utilizadas e as referidas dimensões da grid box para cada proteína.

Proteína	PDB	Coordenadas			Dimensões
		X	Y	Z	
PRPS1	8DBI	123.00	154.00	132.00	70 x 70 x 70
HPRT1	1HMP	44.00	32.00	11.00	70 x 70 x 70
MTHFD1	6ECR	3.00	33.00	25.00	70 x 70 x 70
TYMS	5X5D	-26.00	26.00	-52.00	60 x 60 x 60
DHODH	9CZE	41.00	41.00	12.00	60 x 60 x 60

Fonte: elaborada pelo autor.

A preparação das proteínas para o docking molecular foi realizada utilizando o software PyMol (<https://www.pymol.org/#download>), sendo removidos os ligantes co-cristalizados e as moléculas de água. Em seguida, o estado de protonação dos resíduos de aminoácidos de todas

as moléculas testadas nas simulações foi ajustado para o pH 7.4, utilizando o servidor PDB2PQR-PropKa (<https://server.poissonboltzmann.org/pdb2pqr>).

O banco de dados PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) foi utilizado para obter a estrutura 3D do mebendazol em formato “.sdf”. Posteriormente, o estado de protonação da molécula foi ajustado no site OpenBabel (<https://www.cheminfo.org/Chemistry/Cheminformatics/FormatConverter/index.html>) para o pH 7.4, em seguida o arquivo da molécula foi carregado no programa Avogadro<sup>®</sup> para realizar a otimização geométrica da estrutura, e, por fim, o arquivo foi salvo em formato “.pdb” e reservado para a realização do docking molecular. Tal estratégia foi realizada também para os outros ligantes utilizados no ensaio, como os inibidores nativos das enzimas e seus respectivos substratos.

Antes das simulações computacionais foi necessário ajustar a extensão dos arquivos dos receptores e dos ligantes, pois o programa VINA não reconhece o formato .pdb, apenas a extensão “.pdbqt”. Dessa forma, foi utilizado o software AutoDockTools (<http://autodock.scripps.edu/downloads/autodock-registration/autodock-4-0-1-and-autogrid-4-0.0>) para realizar esta conversão dos arquivos de pdb para pdbqt.

### **3.2 Atracamento molecular**

Esse ensaio *in silico* foi realizado através do software VINA (Trott; Olson, 2010), adotando uma metodologia que emprega ligantes flexíveis e receptores rígidos. Esse programa utiliza um algoritmo de busca e função empírica para estimar a pontuação, com base na energia de ligação (Kcal/mol) de cada pose gerada. Para padronizar as simulações e aumentar a confiança dos resultados, foram aplicados parâmetros pré-estabelecidos no VINA, como um valor de exaustividade de 150 (exhaustiveness), um intervalo de energia de 9 (energy range) e a geração de 500 poses como resultado final, como é mostrado na tabela abaixo.

Tabela 2 - Parâmetros pré-estabelecidos no procedimento de docking molecular

<b>Parâmetros estabelecidos no VINA</b>	
<b>Fator</b>	<b>Valor</b>
EXHAUSTIVENESS	150
NUM_MODES	500
ENERGY_RANGE	9.0

Fonte: elaborada pelo autor.

Quatro etapas de ancoragem molecular foram executadas para cada enzima: a primeira fase utilizou-se apenas o MBZ como ligante; a segunda fase submeteu os inibidores conhecidos para cada enzima (ADP para PRPS1, immGP para HPRT1, LY34 para MTHFD1, 5-FU para TYMS e brequinar para DHODH); no terceiro momento, acoplou as enzimas aos seus ligantes nativos, isto é, substratos (R5P para PRPS1, PRPP para HPRT1, 5,10-metileno-THF para MTHFD1, dUMP para TYMS e Diidroorotato para DHODH); e, como estratégia final, consistiu em realizar o atracamento dos substratos naturais contra as respectivas enzimas na presença do MBZ.

As poses do MBZ e dos outros ligantes foram minuciosamente analisadas com base na frequência de ligação ao longo da topologia proteica e comparadas com os ligantes nativos de cada enzima para avaliar, com precisão, a melhor pose de interação no modelo.

Para a análise dos complexos obtidos pelo atracamento molecular: os softwares PyMol e Discovery Studio (<https://discover.3ds.com/discovery-studio-visualizer-download>) foram utilizados para a avaliação e a observação das interações, além disso o programa Lig Plot (<https://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/software/LigPlus/>) foi empregado especificamente para confirmar a robustez das interações não polares e hidrofóbicas estabelecidas no modelo receptor e ligante.

Antes do procedimento de ancoragem com o fármaco MBZ, foi realizado a estratégia de reatracamento molecular, também chamado de redocking, como forma de validação rigorosa da metodologia. Tal técnica inicia-se com a escolha de um modelo proteico de alta resolução co-cristalizado com um ligante conhecido no banco de dados de proteínas PDB. Após a escolha do complexo que servirá de referência, é necessário isolar o ligante da proteína e submeter a uma simulação de atracamento molecular. Com isso, será comparado os resultados do docking

molecular com o modelo experimental, como forma de comprovar o desempenho do software e dos parâmetros da simulação computacional em tentar reproduzir o complexo proteína-ligante determinado experimentalmente (Hevener et al., 2009).

Como métrica, esse ensaio foi analisado por meio do cálculo do desvio quadrático médio da raiz (RMSD), na qual calcula a diferença estrutural no espaço entre duas conformações moleculares. E, como parâmetro do cálculo, se o valor for  $\leq 2\text{Å}$ , o método é validado, pois a pose predita é muito próxima do resultado experimental.

Os seguintes códigos PDB foram selecionados para avaliar o processo de redocking molecular entre o receptor e o ligante co-cristalizado no complexo: Fosforribosil Pirofosfato Sintetase 1 – PRPS1 (ID PDB: 8DBI), Hipoxantina Guanina Fosforibosiltransferase 1- HPRT1 (ID PDB: 1HMP), Metilenotetra-hidrofolato Desidrogenase 1 – MTHFD1 (ID PDB: 6ECR), Timidilato Sintetase – TYMS (ID PDB: 5X5D) e Di-hidrooorotato Desidrogenase – DHODH (ID PDB: 1D3H).

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

Para a análise de expressão *in silico* foi utilizado o servidor GEPIA<sup>®</sup> (Gene Expression Profiling Interactive Analysis – <https://gepia.cancer-pku.cn/>), que disponibiliza dados gratuitos provenientes de estudos de transcriptoma de amostras de câncer ao redor do mundo, incluindo o TCGA<sup>®</sup> (The Cancer Genome Atlas – <https://www.cancer.gov/ccg/research/genome-sequencing/tcga>) e GTex<sup>®</sup> (The Genotype-Tissue Expression – <https://commonfund.nih.gov/GTEx>) (Tang et al., 2017). O banco de dados foi utilizado para analisar o perfil de expressão dos genes *PRPS1*, *HPRT1*, *MTHFD1*, *TYMS* e *DHODH* entre as 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<sup>®</sup> (<https://kmplot.com/analysis/>) (Dudley,1; Wickham,2; COOMBS,3, 2016).

### 3.4 Cultura celular

No presente trabalho foi utilizada as seguintes linhagens celulares: AGP-01 (adenocarcinoma gástrico metastático) (Leal et al., 2009) linhagem celular derivada de tecido tumoral gástrico que foi estabelecida pelo nosso grupo de pesquisa a partir de adenocarcinoma tumoral gástrico, sendo derivada de fluido ascítico gástrico do tipo intestinal, além dela foi utilizada também a MNP-01 (linhagem gástrica não tumoral), na qual é derivada do epitélio

gástrico saudável (Mesquita et al., 2018). As linhagens foram cultivadas em meio DMEM Low Glicose (Meio Eagle- modificado por Dulbecco - DMEM; Gibco ®) (Da Silva et al., 2022), suplementado com 10% de SBF (Soro Bovino Fetal - Gibco®) e 1% de antibióticos (penicilina/estreptomicina 5000U/5000ug/mL - Invitrogen®). As linhagens celulares foram mantidas em estufa de cultura com atmosfera de CO<sup>2</sup> a 5%, a 37 °C.

Tabela 3 - Linhagens celulares utilizadas e as suas respectivas características

<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
MNP-01	Mucosa estomacal normal	-	-	-	MESQUITA <i>et al.</i> , 2018

Fonte: elaborada pelo autor.

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 experimentos, o meio foi descartado, as células foram lavadas com tampão fosfato-salino (PBS) 1X e tripsinizadas para desprendê-las do fundo da garrafa.

### 3.5 Substâncias químicas

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

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

A expressão gênica dos alvos farmacológicos foi realizada por meio da reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR), utilizando a transcriptase reversa. Primeiramente, em

placa de 6 poços, as linhagens celulares gástricas AGP-01 e MNP-01 foram cultivadas na concentração de  $7 \times 10^4$  células/poço. Após 24 horas de crescimento celular, as células foram tratadas ou não por mais 24 horas com MBZ (0,1  $\mu$ M) ou 5-FU (1  $\mu$ M), baseado na concentração de Inibição de 50% das Células ( $CI_{50}$ ) avaliada em estudos anteriores após 72 horas de tratamento (Da Silva *et al.*, 2023)

Posteriormente, as células foram coletadas e a extração do ácido ribonucleico (RNA) foi realizada por meio do reagente TRIzol<sup>®</sup> (Life Technologies<sup>®</sup>, EUA) conforme as recomendações do fabricante e, posteriormente, submetidas a transcrição reversa para obtenção do DNA complementar utilizando o kit High Capacity cDNA Reverse Transcriptase<sup>®</sup> (Thermo Scientific, EUA). A concentração e a qualidade do RNA foram determinadas usando o espectrofotômetro NanoDrop (Kisker, Germany) e o gel de agarose 1%, respectivamente. As amostras foram armazenadas na temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$  até serem utilizadas.

A PCR em tempo real foi realizada utilizando o equipamento ABI 7500 Real-Time PCR system (Applied Biosystems, EUA) e o sistema de detecção SYBR Green<sup>®</sup> Gene Expression Assay (Life technologies, EUA). Os transcritos analisados estão descritos na tabela 4. Todos os experimentos de RT-qPCR seguiram as exigências feitas por *Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments – MIQE Guidelines* (BUSTIN *et al.*, 2009) e o nível de expressão foi calculado usando o método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  (SCHMITTGEN; LIVAK, 2008).

Os níveis de expressão relativa de mRNA dos genes alvos *PRPS1* (NM\_002764.4), *HPRT1* (NM\_000194.3), *TYMS* (NM\_001071.4), *MTHFD1* (NM\_005956.4), e *DHODH* (NM\_001361.5) foram normalizados e determinados utilizando o gene *RPLP0* (NM\_001002.4) como controle normalizador. Foi determinada uma eficiência de primer superior a 95% para todos os genes descritos.

Tabela 4 - Sequências dos oligonucleotídeos utilizados para RT-qPCR

Gene	Sequência (5' - 3') Senso / Reverso	Referência da sequência (NCBI)
PRPS1	ACCTCCATTGCAGACAGGCT GATGGCCACCCGATCCTTCA	NM_002764.4
HPRT1	GCCTATAGACTATCAGTTCCCTTTGG TGCTGTGGTTTAAAGAGAATTTTTTCA	NM_000194.3
MTHFD1	GGGCGAGCTTCATCACTCCT TCTCCAGGAAACGCTTGGCA	NM_005956.4
TYMS	GGGATGCCAATGGATCCCGA TCTGCCCAAATGCCTCCA	NM_001071.4
DHODH	GACCCAGAGTCTTCCGCCTC TTCCACCACTGAAAGCCCGT	NM_001361.5
RPLP0	CTTGTCTGTGGAGACGGATTAC TCTTCCTTGGCTTCAACCTTAG	NM_001002.4

Fonte: elaborada pelo autor.

### 3.7 Análise estatística

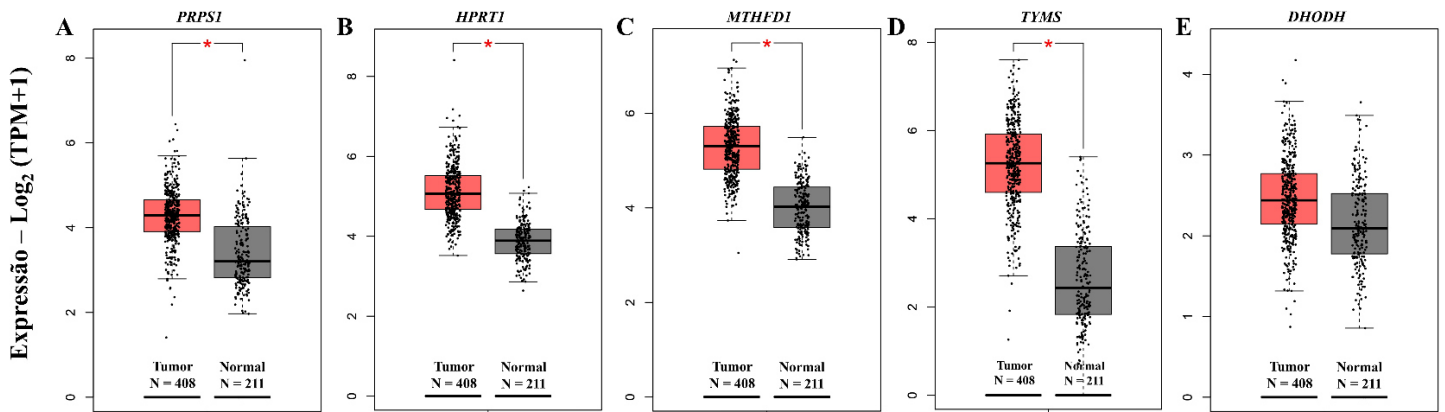
Os experimentos foram conduzidos em, no mínimo, três repetições biológicas independentes, sendo cada repetição realizada em triplicata técnica. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão (DP). A distribuição dos dados foi avaliada pelo teste de normalidade de kolmogorov-Smirnov. A comparação entre grupos foi realizada utilizando a análise de variância (ANOVA) para comparação de três ou mais grupos. E o pós-teste de bonferroni foi aplicado quando houve diferença significativa, como feito de comparações múltiplas entre pares de grupos. Diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando o valor de p foi inferior a 0,05 ( $p < 0,05$ ), o que corresponde a um intervalo de confiança de 95%. O software GraphPad Prism 8.0 foi empregado para a análise estatística dos dados e o desenho dos gráficos.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 A investigação sobre a expressão diferencial mostrou que os genes que fazem parte do metabolismo de nucleotídeos estão desregulados em amostras de CG

Com o objetivo de investigar o perfil de expressão de genes relacionados ao metabolismo de nucleotídeos e compreender a sua importância para o CG como um promissor alvo molecular na terapia, dessa forma utilizou-se o banco de dados online GEPIA que contém informações a respeito da expressão gênica de amostras clínicas do TCGA, GTEx, GEO e dentre outros. Para isso, o servidor GEPIA foi escolhido para avaliar o perfil de expressão dentre 5 genes do metabolismo de nucleotídeos, são eles: *PRPS1*, *HPRT1*, *MTHFD1*, *TYMS* e *DHODH*. Sendo assim, destacou-se que os genes *PRPS1*, *HPRT1*, *MTHFD1* e *TYMS* apresentaram uma expressão significativamente superior ( $p < 0,05$ ) em amostras de CG (N = 408) em comparação às amostras não tumorais (N = 211). Embora o nível de expressão para o gene *DHODH* não tenha sido significativo, percebe-se que o tecido não neoplásico apresenta uma tendência de expressão inferior quando comparado às amostras de câncer, conforme evidenciado na figura 5.

Figura 5 - Análise da expressão gênica de alvos do metabolismo de nucleotídeos em amostras clínicas de CG



O perfil de expressão dos transcritos (A) *PRPS1*, (B) *HPRT1*, (C) *MTHFD1*, (D) *TYMS* e (E) *DHODH* foi investigado por meio de banco de dados online. Os gráficos, do tipo boxplots, gerados pelo software GEPIA compara o nível de expressão gênica (eixo Y) entre duas condições, tumor versus normal (eixo X), para os 5 genes supracitados em amostras de tecido tumoral (N=408, caixa vermelha) e o tecido gástrico normal (N=211, caixa cinza). As diferenças significativas são indicadas pelo asterisco vermelho (\*) para cada gráfico ( $p < 0,05$ ).

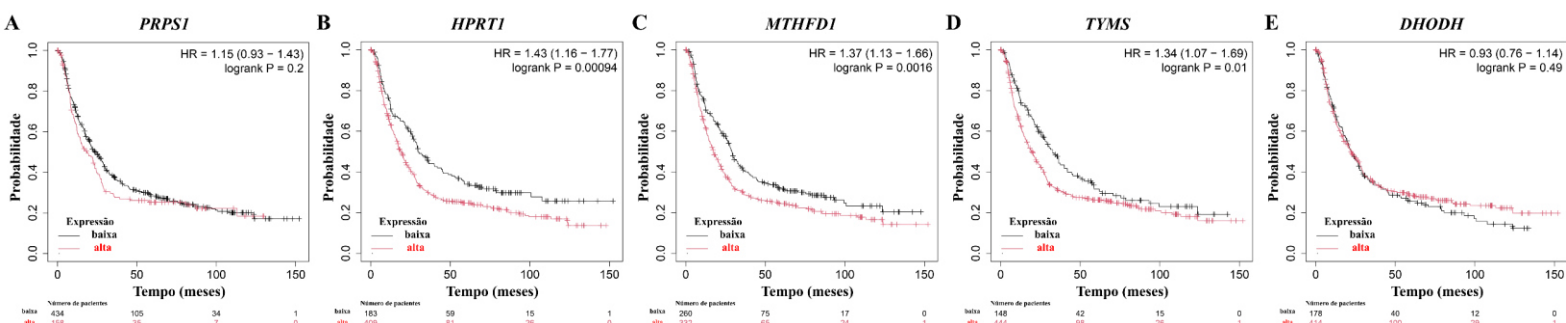
Fonte: elaborada pelo autor.

Apesar do último transcrito não apresentar expressão significativamente mais elevada, a literatura esclarece que o gene *DHODH* é consistentemente hiperexpresso em tecidos de tumor gástrico, podendo desempenhar uma função promotora na progressão do câncer (He et al., 2022; Peng et al., 2024). O fator que poderia ter influenciado esses resultados contraditórios é pela capacidade limitada do servidor GEPIA em discriminar os dados de transcritos entre os subtipos de CG, isto é, a heterogeneidade dos transcritos pode estar mascarando as reais informações a respeito do perfil de expressão no tipo adenocarcinoma (Li et al., 2021).

#### 4.2 A avaliação do nível de transcritos em bancos de dados online revelou que a regulação positiva dos tais genes pode influenciar em um pior prognóstico

Em seguida, utilizou-se o servidor online Kaplan Meier Plotter para avaliar se a alta ou a baixa expressão dos referidos genes que compõem o metabolismo de nucleotídeos influenciam na curva de sobrevivência de indivíduos com CG. Dessa forma, os resultados do programa revelaram que a expressão alta para os genes *HPRT1*, *MTHFD1* e *TYMS* em amostras de pacientes acometidos com CG (N=592) influencia, de maneira significativa, para uma queda na taxa da sobrevida global (SG), sugerindo um pior prognóstico para pacientes com este tipo de tumor (FIGURA 6). Enquanto que para os outros 2 genes, *PRPS1* e *DHODH*, o aumento ou a redução do nível desses transcritos não está correlacionado, de maneira significativa, a um pior quadro na sobrevida global de pacientes com CG.

Figura 6 - Análise da correlação entre a taxa de transcritos do metabolismo de nucleotídeos e o prognóstico de pacientes com CG ao longo do tempo



O Kaplan-Meier Plotter foi utilizado para analisada as curvas de sobrevivência global (SG) em pacientes com CG divididos em 2 condições: alta expressão (linha vermelha) e baixa expressão (linha preta) para os seguintes genes: (A) PRPS1, (B) HPRT1, (C) MTHFD1, (D) TYMS e (E) DHODH. O gráfico avalia a probabilidade (eixo Y) de sobrevida dos indivíduos ao longo do tempo em meses (eixo X). As diferenças significativas são indicadas pelo asterisco vermelho (\*) para cada gráfico ( $p < 0,05$ ).

Fonte: elaborada pelo autor.

De fato, esses resultados reiteram a importância da reprogramação metabólica para a manutenção e a evolução do fenótipo maligno no tumor, além da participação indispensável dos genes desregulados que compõe e que orquestram o metabolismo de nucleotídeo para sustentar o poder proliferativo. Um trabalho investigando a importância dessa via no câncer revelou que a síntese desregulada de nucleotídeos influencia integralmente em todas as atividades e funções celulares para diversos tipos de câncer. O autor comenta que se trata de uma dependência metabólica pan-câncer (Mullen; Singh, 2023).

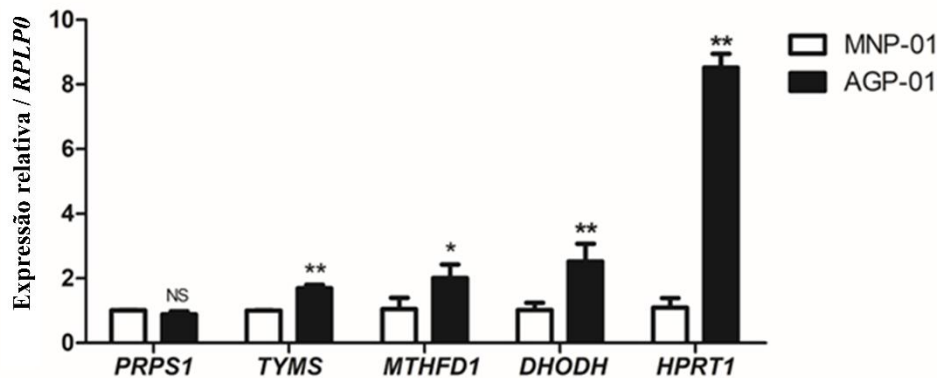
Com isso, esses resultados *in silico* revelam que esses genes apresentam um papel crítico na manutenção tumoral, podendo atuar como alvos farmacológicos de interesse clínico. Assim, a modulação da expressão desses genes poderia apresentar um efeito terapêutico desejável e podendo contribuir em uma evolução positiva no prognóstico para indivíduos afetado por CG.

#### **4.3 O fármaco mebendazol foi capaz de modular o nível de todos os transcritos do metabolismo de nucleotídeos na linhagem AGP-01**

Como forma de validar a taxa de expressão dos genes do metabolismo de nucleotídeo para a linhagem celular tumoral AGP-01 e também para tentar compreender os efeitos moleculares que o fármaco MBZ pode ocasionar na linhagem tumoral, com isso foi realizada a investigação do nível de expressão para os seguintes genes: *PRPS1*, *HPRT1*, *MTHFD1*, *TYMS* e *DHODH* através da técnica RT-qPCR.

Assim, os resultados destacaram que os genes *HPRT1*, *MTHFD1*, *TYMS* e *DHODH* ( $p < 0,0001$ ) apresentaram uma hiperexpressão na linhagem maligna quando comparada à linhagem não tumoral MNP-01.

Figura 7 - A linhagem AGP-01 apresenta uma hiperexpressão na maioria dos genes do metabolismo de nucleotídeos



Fez uso da RT-qPCR para quantificar a taxa de transcritos para os genes estudados. O mRNA total foi extraído das linhagens AGP-01 e MNP-01 e os níveis transcricionais dos alvos metabólicos foram comparados. A expressão foi normalizada pelo gene *RPLP0* e o grupo MNP-01 foi utilizado como calibrador do experimento. Os dados são apresentados como a média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes, e a análise estatística foi realizada com o teste t de Student. As diferenças significativas são indicadas por \* $p < 0,001$  e \*\* $p < 0,0001$ . NS: Não significativo.

Fonte: elaborada pelo autor.

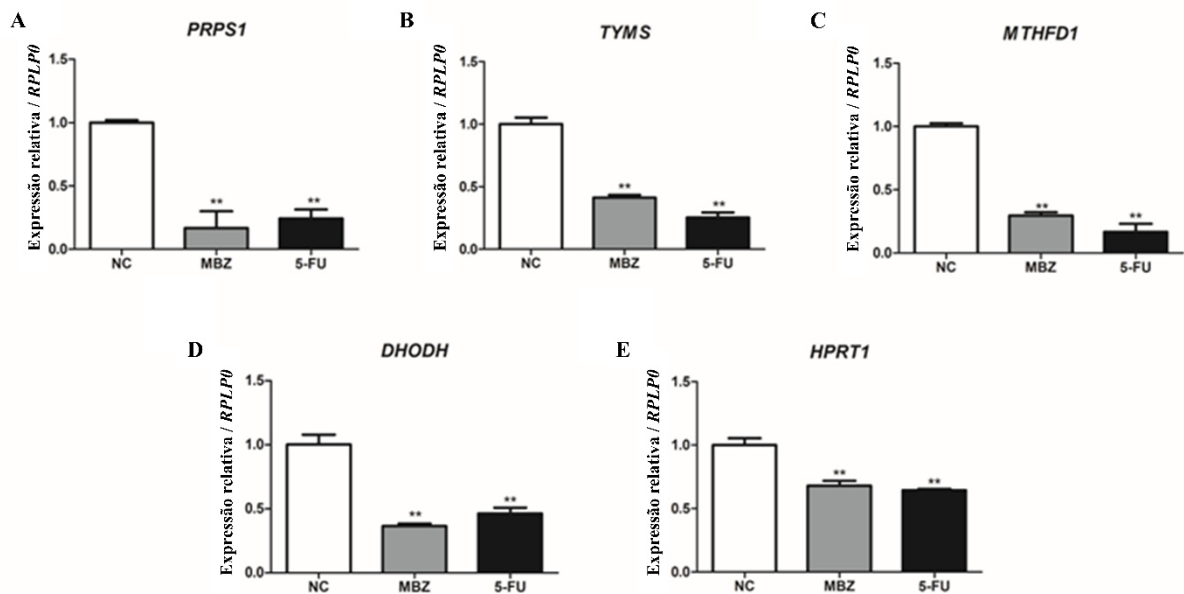
Após a análise dos resultados, percebeu-se que um dos genes da via de biossíntese de nucleotídeos, o *PRPS1*, não apresentou uma variação significativa entre a linhagem tumoral e a saudável, porém o mesmo gene apresentou um perfil de hiperexpressão na abordagem *in silico* exposta anteriormente. Sob a mesma lógica, notou-se o mesmo caso para o gene *DHODH*, no qual não foi encontrado um valor significativamente estatístico sob a análise do banco de dados GEPIA, embora houvesse uma desregulação das taxas do transcrito *DHODH* entre as linhagens celulares avaliadas neste trabalho.

Esse fato pode ser justificado tendo em vista o caráter heterogêneo que o CG apresenta sob a ótica molecular. Como o GEPIA é alimentado com dados transcriptômicos de amostras clínicas ao redor do planeta, assim, a análise dos resultados irá fornecer um perfil representado por vários fenótipos do CG sobre a expressão genética. E como a linhagem de CG utilizada neste trabalho foi estabelecida a partir de um paciente brasileiro, então provavelmente haverá traços moleculares distintos em comparação aos outros fenótipos ao redor do mundo (Leal et al., 2009; Yoo et al., 2020).

Outrossim, após o tratamento com o fármaco MBZ na linhagem AGP-01, os dados revelaram que essa molécula foi capaz de reduzir significativamente os níveis de mRNA para todos os genes estudados ( $p < 0,0001$ ) após 24 horas em contato e para uma concentração não citotóxica (0,1  $\mu\text{M}$ ), evidenciando um efeito modulador comparável ao observado com o

quimioterápico 5-FU, na qual é um inibidor bem conhecido do metabolismo de nucleotídeos (FIGURA 8).

Figura 8 - A análise do efeito modulador através do MBZ na expressão gênica na linhagem AGP-01



A figura destaca que o fármaco MBZ garantiu uma redução na expressão gênica dos alvos referentes ao metabolismo de nucleotídeos. O mRNA total foi extraído da linhagem AGP-01 e os níveis transcricionais dos alvos metabólicos foram comparados a partir dos genes (A) PRPS1, (B) TYMS, (C) MTHFD1, (D) DHODH e (E) HPRT1. A capacidade moduladora na expressão gênica do MBZ na linhagem tumoral também foi avaliada após 24 horas de contato do fármaco em uma concentração considerada não citotóxica (0,1  $\mu$ M) com a linhagem AGP-01, e os resultados foram comparados com o controle positivo 5-FU. A expressão foi normalizada pelo gene RPLP0 e o controle negativo (CN) foi utilizado como calibrador do experimento. Os dados são apresentados como a média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes, e a análise estatística foi realizada com o teste ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni. As diferenças significativas são indicadas por \* $p < 0,001$  e \*\* $p < 0,0001$ . 5-FU: 5-fluorouracil. MBZ: Menbedazol. NC: Controle negativo.

Fonte: elaborada pelo autor.

É importante comentar que a concentração do fármaco MBZ estabelecida neste ensaio baseia-se em estudos anteriores realizados pelo nosso grupo de pesquisa, no qual o referido trabalho avaliou e investigou o potencial papel do anti-helmíntico em prejudicar a proliferação celular para algumas linhagens tumorais e, assim, revelar o seu efeito citotóxico pela determinação da  $IC_{50}$  (Concentração inibitório de 50%) (Da Silva et al., 2023). Além disso,

partindo-se da premissa que é necessária a presença de células viáveis para realizar os estudos metabólicos e os possíveis efeitos do MBZ, assim, foi realizado um ensaio para determinar uma concentração não citotóxica ou citostática na linhagem AGP-01 para o fármaco.

Com isso, essa pesquisa revelou que o tratamento com a linhagem tumoral na concentração de 0,1  $\mu\text{M}$  foi o suficiente para não ser observados eventos de morte celular ou interferências do ciclo celular em 24 horas em contato. Portanto, esse valor permite a prática de ensaios metabólicos subsequentes, visto que a proliferação celular não foi afetada pela molécula de estudo.

Logo, essa modulação da expressão dos genes, que integram o metabolismo de nucleotídeos, induzida pelo fármaco MBZ, pode explicar e ser um dos mecanismos pelos quais essa molécula apresenta um potencial efeito antineoplásico em linhagens tumorais. Já é bem conhecido o mecanismo clássico do MBZ em ocasionar a morte de células malignas, na qual leva a inibição da polimerização dos microtúbulos, no entanto outras pesquisas relatam que o papel bioquímico dessa molécula pode ir muito além disso, visto que novos alvos moleculares e efeitos adicionais foram observados e relatadas em outras pesquisas (Guerini et al., 2019; Pinto et al., 2015).

Diversos estudos descreveram o potencial papel do MBZ em modular ou afetar outras vias desreguladas no câncer, como a inibição da angiogênese, interferindo em certas proteínas-chave ou até efeito imunomodulador (Bai et al., 2015b; Blom et al., 2017; Sung et al., 2019). Além disso, Da Silva et al. destacaram que o MBZ reduziu a taxa de transcritos relacionados ao metabolismo glicolítico na linhagem celular de CG metastática AGP-01, a mesma utilizada no presente estudo (Da Silva et al., 2023).

Dentro da coleção de quimioterápicos disponíveis na clínica, o 5-fluorouracil (5-FU) destaca-se sendo um dos principais medicamentos de escolha no regime de tratamento oncológico, visto que é um fármaco de baixo custo e com relativa eficácia relatada e muito utilizado em tumores do trato gastrointestinal, sobretudo para o câncer colorretal (Argilés et al., 2020; Chen et al., 2019; Ghafouri-Fard et al., 2021a; Silva, 2022).

Nas últimas duas décadas, houve um aumento na utilização desse fármaco, sendo também adotada a estratégia de uso em combinação com outros fármacos antineoplásicos (Hamam et al., 2017; Okada et al., 2016; Sakai et al., 2019; Zhao et al., 2015). O efeito dessa molécula é garantido, sobretudo, pela inibição de uma enzima que faz parte da via de biossíntese de nucleotídeos, a timidilato sintase (TS) e, assim, gerando o seu efeito citotóxico ao comprometer a formação de intermediários indispensáveis para a célula (Peters et al., 1994; Riahi-Chebbi et al., 2019).

Os componentes monofosfato de fluorodesoxiuridina (FdUMP), o trifosfato de fluorodesoxiuridina (FdUTP) e o trifosfato de fluorouridina (FUTP) são os metabólitos conhecidos do fármaco 5-FU. Cada uma dessas moléculas tem um papel diferente, no entanto, complementar, para garantir, no final, o efeito antiproliferativo na célula. O FdUMP afeta a enzima TS, sendo um inibidor potente contra essa proteína, com isso provocando danos indiretos no DNA por um desbalanço nas concentrações de certos nucleotídeos. Já o metabólito FdUTP compromete o material genético diretamente ao ser incorporado erroneamente no DNA. E o último ligante, o FUTP, se associa ao outro tipo de ácido nucléico presente na célula, o RNA, causando danos significativos. Assim, fica claro que esse fármaco causa um prejuízo em múltiplos pontos moleculares críticos para a célula, desde o comprometimento da via de biossíntese das pirimidinas, até um comprometimento na capacidade de replicação do material genético da célula (Christensen et al., 2019; Ghafouri-Fard et al., 2021b; Longley; Harkin; Johnston, 2003).

Apesar do seu proeminente uso na clínica como quimioterápico, ainda é recorrente a aparição de inúmeros efeitos colaterais para uma parcela dos pacientes, cuja toxicidade é devida à prescrição incorreta da concentração do medicamento e/ou à deficiência bioquímica de uma proteína que auxilia na depuração do princípio ativo (Amstutz; Froehlich; Largiadèr, 2011; Morawska et al., 2018a). Sabe-se que os efeitos indesejados afetam vários órgãos que compõe o nosso corpo, como o trato gastrointestinal, o sistema hematopoiético, sistema nervoso, sistema cardíaco, sistema ocular e a pele (EUROFARMA,2015) (Grem, 2000; Sara et al., 2018)

Uma pesquisa realizada por Morawska et al. observou que até 30% dos pacientes que fizeram uso de fluoropirimidinas tiveram uma reação elevada em relação a toxicidade (Morawska et al., 2018). Além disso, considerando os danos no tecido gastrointestinal, outro estudo avaliou que para cada 10 pacientes que utilizavam o quimioterápico, cerca de 4 deles, apresentavam lesões nas mucosas (Harris, 2006; Hong et al., 2019). Com isso, considerando que o 5-FU é um dos fármacos tradicionalmente utilizados para tratar tumores gastrointestinais, torna-se necessário investigar a adoção de terapias alternativas mais seguras para tentar mitigar esses efeitos de toxicidade que levam a uma baixa adesão pelo paciente, e danos indesejados pelo uso incorreto do 5-FU.

Assim, o fármaco MBZ mostra-se um forte candidato como estratégia de terapia alternativa com maior segurança, na qual já há relatos na literatura esclarecendo o seu papel promissor em diversos tipos de cânceres, incluindo até tumores gastrointestinais, além da sua segurança no uso como quimioterápico tanto em ensaios pré-clínicos quanto em estudos clínicos (Nimbalkar et al., 2025). Em um estudo *in vitro* estabelecido por Pinto e colaboradores,

eles identificaram que o anti-helmíntico foi capaz de prejudicar na progressão e migração em um modelo de câncer gástrico (Pinto et al., 2015). Outrossim, ainda há referências destacando o seu papel citotóxico e antiproliferativo em outros tipos de tumores, a citar o câncer de mama, de pulmão, tumores cerebrais e câncer de cólon (Bai et al., 2015; Joe et al., 2022; Meco et al., 2023; Sasaki et al., 2002).

Já para os estudos em pacientes com câncer em estágio avançado, as pesquisas clínicas revelam efeitos positivos similares aos estudos pré-clínicos. Com um ensaio para avaliar a eficácia do MBZ e o seu grau de segurança no ser humano, os dados observados indicaram que o fármaco se mostrou eficaz contra vários modelos de tumores, incluindo câncer de mama, pâncreas, tireoide e de cólon, além de ter sido bem tolerado (Joe et al., 2022).

Por se tratar de um fármaco reconhecido pelas agências de saúde e sendo utilizado há mais de 40 anos no mercado, já se sabe muito a respeito da segurança e da toxicidade dessa molécula, a qual é definida como medicamento relativamente seguro mesmo ao administrar essa droga por longos períodos e em altas doses (Meco et al., 2023). Ademais, os efeitos adversos relatados sob o uso deste fármaco são considerados mínimos, nos quais são comuns os sintomas de náuseas, vômitos ou queda no apetite (Chai; Jung; Hong, 2021; Mansoori et al., 2021). Há relatos sobre alguns efeitos colaterais graves, no entanto são raros de acontecer, como toxicidade hepática ou reações de hipersensibilidade (Bai et al., 2011; Pantziarka et al., 2014).

#### **4.4 O atracamento molecular evidenciou que o ligante MBZ interage em pontos críticos presentes nas enzimas do metabolismo das purinas e das pirimidinas**

Para investigar o modo de interação do fármaco MBZ nas enzimas que fazem parte da biossíntese de nucleotídeos foi realizado o procedimento de ancoragem molecular contra os alvos moleculares PRPS1, HPRT1, MTHFD1, TYMS e DHODH. Além de esclarecer a questão se esse ligante pode funcionar como um potencial inibidor dessas proteínas específicas.

Antes de seguir com os ensaios *in silico* de cada proteína contra os seus ligantes, primeiramente adotamos a abordagem de reatracamento molecular para validar o procedimento experimental utilizada neste trabalho, isto é, verificar a precisão do sistema em realizar os cálculos e prever a melhor conformação do ligante e comparando com dados experimentais. Conforme exposto na tabela 5, todos os valores de redocking molecular, utilizando a métrica do RMDS, foram inferiores a 2 Å.

Tabela 5 - Valores do RMDS a respeito do redock proposto no trabalho

<b>Análise do ensaio de reatracamento molecular</b>	
<b>Proteína</b>	<b>RMSD</b>
PRPS1	1.418
HPRT1	1.769
MTHFD1	1.538
TYMS	1.132
DHODH	0.926

Esta tabela esclarece e organiza os resultados a respeito do ensaio de reatracamento molecular realizado para as enzimas do metabolismo de nucleotídeos co-cristalizadas com o ligante (PRPS1, HPRT1, MTHFD1, TYMS e DHODH). Foi realizado o cálculo a partir do RMSD para avaliar a variação da posição de cada átomo do ligante após a simulação do docking em relação à sua conformação de referência. Valores de RMSD inferiores a 2.0 Å são considerados resultados satisfatórios.

Fonte: elaborada pelo autor.

Os achados na literatura relatam que a maioria dos trabalhos utilizam o limite de até 2 Å para validar como resultados satisfatórios em relação à metodologia empregada (Cole et al., 2005; Gohlke; Hendlich; Klebe, 2000; Hevener et al., 2009b; Kontoyianni; McClellan; Sokol, 2004; Kramer; Rarey; Lengauer, 1999). Dessa forma, os dados obtidos são positivos na validação do procedimento adotado e é possível realizar o atracamento utilizando os ligantes de interesse em seguida.

#### 4.4.1 Estudos com a proteína PRPS1

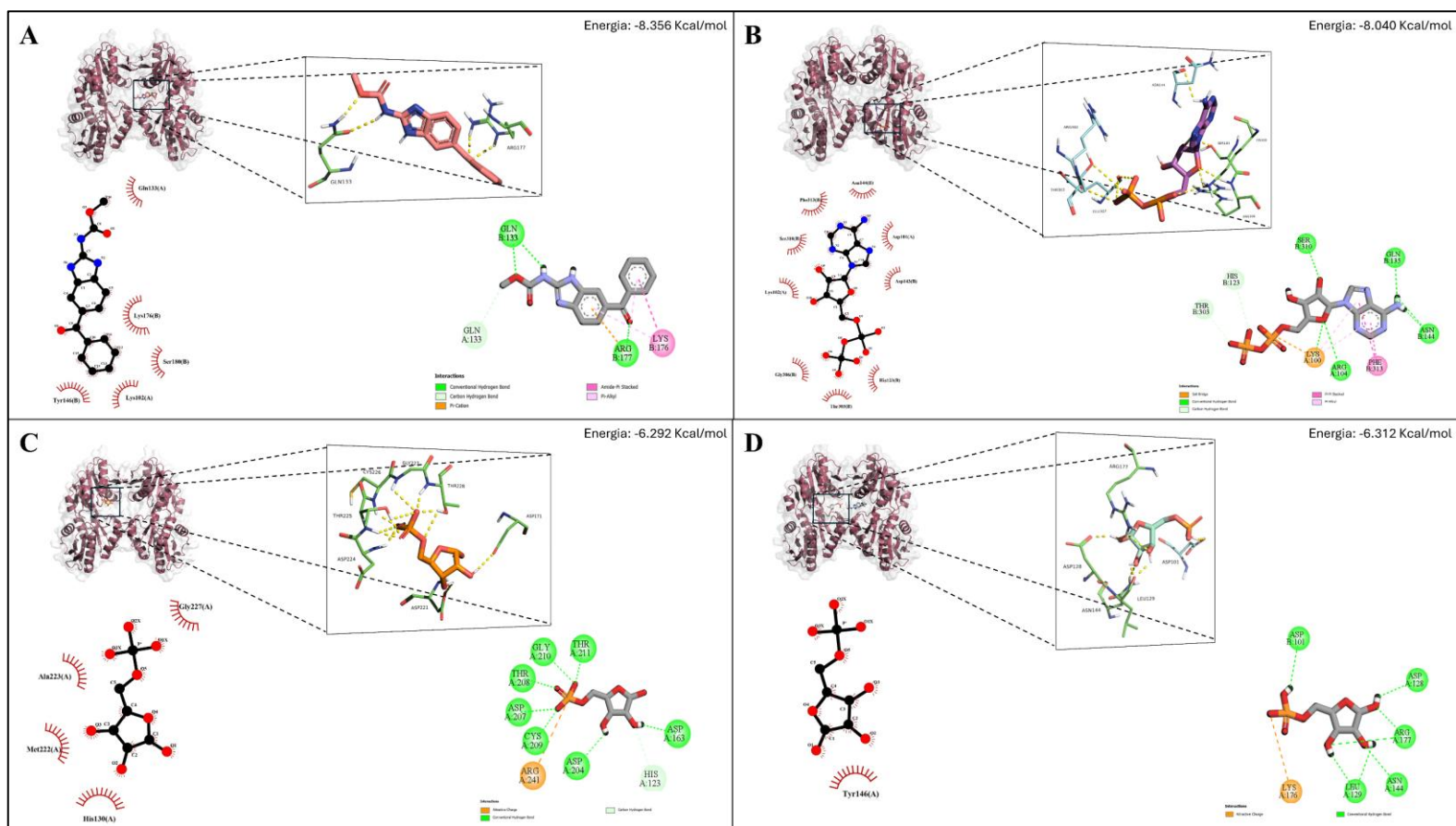
A análise dos resultados de atracamento expõe que o complexo formado entre a proteína e o ligante MBZ é estabilizado por ligações de hidrogênio através dos resíduos Gln<sup>133</sup> e Arg<sup>177</sup>, além de outras ligações não polares, como Pi-cation, Pi-alquil e empilhamento amida-Pi, com os resíduos Arg<sup>177</sup>, Lys<sup>176</sup> e Lys<sup>176</sup>, respectivamente. Outros tipos de interação também foram observados, como os contatos hidrofóbicos, entre Lys<sup>102</sup>, Gln<sup>133</sup>, Tyr<sup>146</sup>, Lys<sup>176</sup> e Ser<sup>180</sup>. A afinidade de interação entre o ligante MBZ e a proteína PRPS1 apresentou uma energia de - 8.356 Kcal/mol.

Já o docking molecular contra o seu inibidor alostérico natural, a adenosina difosfato (ADP), mostrou se ligar em uma região afastada do local de interação com o MBZ, sendo sustentado por mais interações intermoleculares comparando ao fármaco, apresentando contatos, como ponte salina, ligação de hidrogênio, Pi-Pi empilhamento e Pi-alquil entre os resíduos Lys<sup>100</sup>, Arg<sup>104</sup>, His<sup>123</sup>, Gln<sup>135</sup>, Asn<sup>144</sup>, Thr<sup>303</sup>, Ser<sup>310</sup> e Phe<sup>313</sup>. Ademais, o substrato nativo da proteína, ribose-5-fosfato(R5P), ligou-se na região ortostérica e apresentou diversas ligações de hidrogênio para estabilizar o ligante, a citar os resíduos His<sup>123</sup>, Asp<sup>163</sup>, Asp<sup>204</sup>, Asp<sup>207</sup>, Thr<sup>208</sup>, Cys<sup>209</sup>, Gly<sup>210</sup> e Thr<sup>211</sup>, além da presença de uma interação por carga com o resíduo Arg<sup>241</sup>.

Enquanto que a inspeção dos resultados referente ao atracamento do substrato na presença do ligante MBZ contra a enzima PRPS1 revelou uma mudança clara no local de interação do R5P, ocorrendo, sobretudo, um deslocamento do grupamento fosfato no interior do bolsão catalítico. Isso indica provavelmente que o contato do MBZ pode ter influenciado o modo como o R5P se ancora na proteína. Percebe-se também que o fármaco proposto MBZ tem uma afinidade mais vigorosa quando comparado ao substrato R5P, com uma energia de -8,356 Kcal/mol e de -6.292 Kcal/mol, respectivamente.

Na estrutura tridimensional, nota-se que o ligante ribose-5-fosfato, após a presença do MBZ, sofreu um deslocamento do bolsão que forma o sítio ativo, na qual estava presente, agora interagindo diretamente com os resíduos Asp<sup>101</sup>, Asp<sup>128</sup>, Leu<sup>129</sup>, Asn<sup>144</sup> e Arg<sup>177</sup> a partir de ligações de hidrogênio, e o tipo de interação iônica permaneceu, mas estabelecida por outro resíduo, neste caso pelo Lys<sup>176</sup>. Além disso, as interações hidrofóbicas foram reduzidas em comparação na ausência do MBZ, na qual é visualizada apenas entre o resíduo Tyr<sup>146</sup>. Houve também uma mudança mínima da afinidade com o substrato na presença do MBZ passando de -6,292 Kcal/mol para -6,312 Kcal/mol. Dessa forma, os dados demonstram que o MBZ interage de forma mais vigorosa com a enzima do que seu substrato e pode afetar o modo de interação com o substrato nativo da PRPS1.

Figura 9 - Análise do atracamento molecular com a proteína PRPS1



Esse diagrama apresenta a análise de docking molecular da enzima PRPS1 com os seus ligantes, ilustrando: A) o atracamento da PRPS1 com o mebendazol (MBZ); B) o atracamento da PRPS1 com o inibidor alostérico conhecido ADP; C) o atracamento da PRPS1 com o seu substrato enzimático, o R5P; e D) o atracamento da PRPS1 realizado contra o substrato na presença do MBZ.

Fonte: elaborada pelo autor.

A enzima PRPS1 gera um produto chave no metabolismo celular, a molécula PRPP. Esse intermediário metabólico torna-se importante para a biossíntese de nucleotídeos, além de contribuir para a formação de certos aminoácidos, como a histidina e triptofano (Li et al., 2007). Dada a sua importância, essa proteína é definida como um nó regulatório que conecta a via das pentoses-fosfato ao metabolismo de nucleotídeos e também rigorosamente regulada em várias formas para garantir a manutenção das concentrações de intermediários críticos na via das purinas e das pirimidinas (Hvorecny et al., 2023).

Dentre as possibilidades de regulação da atividade enzimática da proteína PRPS1, pode-se destacar a participação do ligante ADP. Essa molécula atua como um inibidor potente, agindo tanto como inibidor competitivo como inibidor alostérico, sendo definido pela concentração

dos substratos (Li et al., 2007). Com isso, o ADP pode se ligar no sítio ativo disputando o espaço com o substrato ATP ou também é possível o ligante ADP interagir em uma região fora do local ortostérico, sendo chamado de sítio alostérico. Uma vez que o ADP se liga nessa região fora do sítio catalítico, ele compete com o íon fosfato, cofator fundamental na manutenção do estado enzimático ativo, e pode influenciar em uma mudança da conformação da proteína e, assim, interferindo na atividade catalítica.

O sítio alostérico da proteína humana é conservada e é representada pelos resíduos de aminoácidos Gln<sup>135</sup>, Asp<sup>143</sup>, Asn<sup>144</sup> e Ser<sup>308</sup> até Phe<sup>313</sup> por uma das subunidades, além da região Lys<sup>100</sup>-Arg<sup>104</sup> referente à outra subunidade da enzima (Hvorecny et al., 2023; Li et al., 2007). De maneira comparativa, os resultados *in silico* realizados neste trabalho obtiveram um comportamento semelhante em relação à formação do complexo enzima:ADP, visto que foi identificado alguns contatos em comum com os resultados *in vitro*.

Um fator interessante observado foi que o fármaco MBZ não demonstrou o mesmo comportamento do inibidor ADP, na qual o anti-helmíntico se ligou próximo à fenda que forma o sítio catalítico da enzima, mais especificamente na região de interação que permite o contato com o substrato ATP (Hvorecny et al., 2023). Essa porção é formada pelos resíduos Phe<sup>92</sup>-Ser<sup>108</sup> e Asp<sup>171</sup>-Gly<sup>174</sup>, e o ligante MBZ apresentou alguns contatos bem próximos e apenas 1 resíduo compartilhado com o arranjo do ATP, sendo o Lys<sup>102</sup>. Como hipótese, é possível inferir que esse fenômeno possa comprometer a eficiência na geração do intermediário PRPP, uma vez que, na presença do ligante MBZ, o substrato R5P teve uma mudança do arranjo de interação e a sua disposição no sítio ativo também foi alterada, além da presença do anti-helmíntico em uma região de acoplamento com o substrato ATP.

Tabela 6 - Pontuação obtida pelo VINA para cada molécula pequena utilizada como ligante para o docking molecular com a proteína PRPS1

Ligantes	Score (Kcal/mol)			
	Tipo de ancoragem molecular			
	Fármaco MBZ	Ligante nativo	Inibidor conhecido	Ligante nativo na presença do MBZ
MBZ	-8.356	*	*	*
R5P	*	-6.292	*	-6.312
ADP	*	*	-8.394	*

A tabela expõe os valores referente a pontuação ou energia de afinidade obtida para cada ligante atracada contra a enzima PRPS1.

\*não participou do docking molecular

MBZ: mebendazol

R5P: Ribose-5-fosfato

ADP: adenosina difosfato

Fonte: elaborada pelo autor.

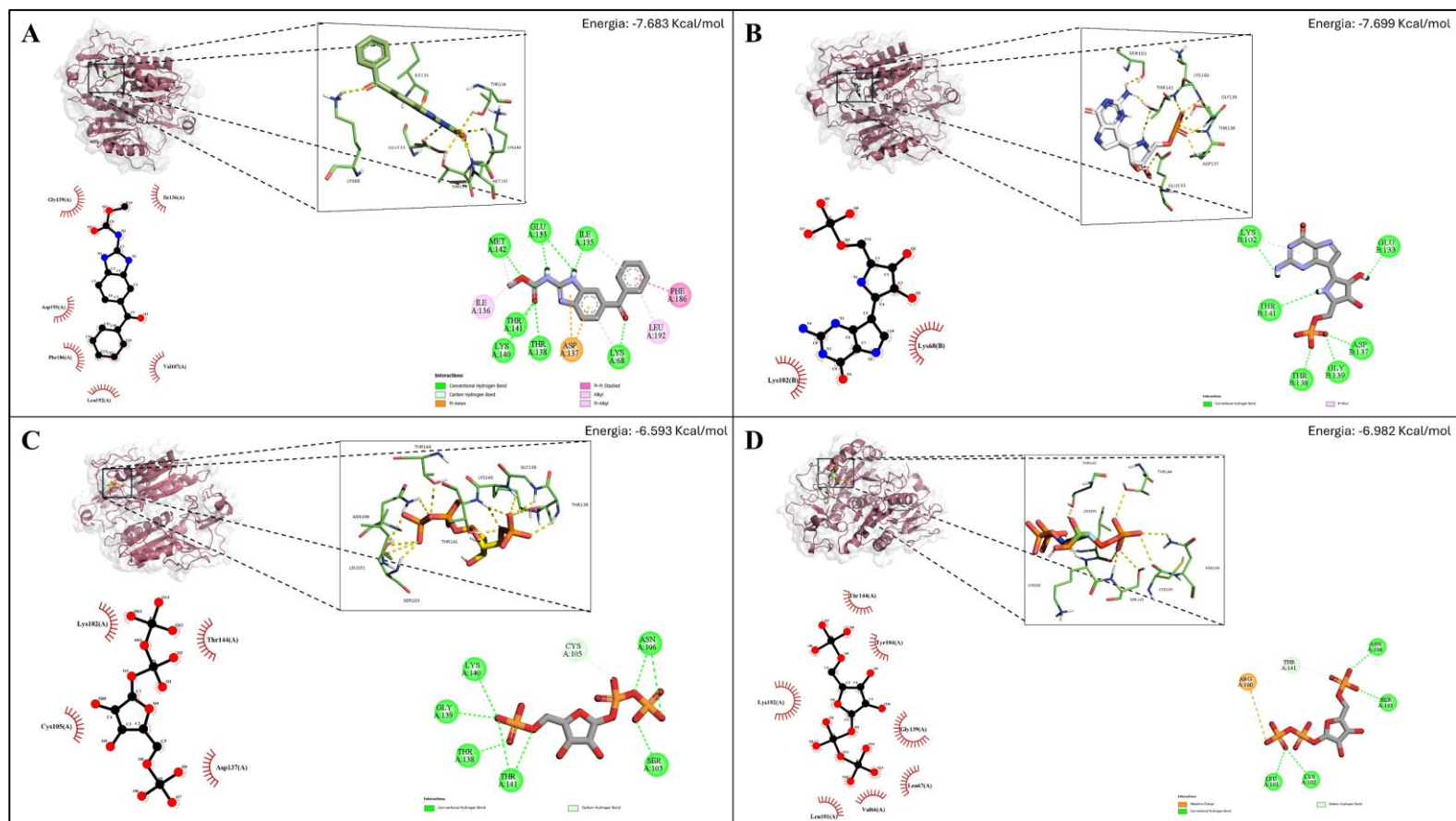
#### 4.4.2 Estudos com a proteína HPRT1

A estratégia de docking molecular também investigou a interação com a enzima HPRT1. A figura 10A mostra que o MBZ estabeleceu múltiplos tipos de interações com a proteína, o principal foram contatos do tipo ligação de hidrogênio com os resíduos Lys<sup>68</sup>, Glu<sup>133</sup>, Ile<sup>135</sup>, Thr<sup>138</sup>, Lys<sup>140</sup>, Thr<sup>141</sup> e Met<sup>142</sup>. Ainda houve outras formas de interações, como Pi-anion, Pi-Pi empilhamento, alquil e Pi-alquil entre os resíduos Asp<sup>137</sup>, Phe<sup>186</sup>, Ile<sup>136</sup> e Leu<sup>192</sup>, respectivamente. Adicionalmente, teve contatos hidrofóbicos também entre os resíduos Ile<sup>136</sup>, Gly<sup>139</sup>, Phe<sup>186</sup>, Val<sup>187</sup>, Leu<sup>192</sup> e Asp<sup>193</sup>. Percebe-se que esse ligante interagiu no bolsão ortostérico da enzima com uma energia de interação de -7.683 Kcal/mol.

De maneira similar, como observado na figura 10B, na presença do inibidor immGP, este ligante ocupa o sítio ativo por meio de interações com os resíduos de aminoácidos Lys<sup>102</sup>, Glu<sup>133</sup>, Asp<sup>137</sup>, Thr<sup>138</sup>, Gly<sup>139</sup> e Thr<sup>141</sup> do tipo ligação de hidrogênio e com uma afinidade de -7,699 Kcal/mol. A figura 7C exibe a simulação computacional da HPRT1 com seu substrato nativo 5-fosforribosil-1-pirofosfato (PRPP), e percebe-se que o ligante estabelece contato com um bolsão interno da enzima, interagindo com os resíduos Ser<sup>103</sup>, Cys<sup>105</sup>, Asn<sup>106</sup>, Thr<sup>138</sup>, Gly<sup>139</sup>, Lys<sup>140</sup> e Thr<sup>141</sup>, com uma energia de -6,593 Kcal/mol, sendo caracterizado como o sítio catalítico dessa enzima.

E quando a proteína HPRT1 foi submetida ao docking com o seu substrato sob a influência do MBZ, percebeu-se que o MBZ leva a mudanças no arranjo dos aminoácidos que interagem com o substrato nativo, embora o substrato tenha interagido no mesmo local de antes. A energia de interação também mudou para -6,982 Kcal/mol.

Figura 10 - Análise do atracamento molecular com a proteína HPRT1



Esse diagrama apresenta a análise de docking molecular da enzima HPRT1 com os seus ligantes, ilustrando: A) o atracamento da HPRT1 com o mebendazol (MBZ); B) o atracamento da HPRT1 com o inibidor enzimático conhecido immGP; C) o atracamento da HPRT1 com o seu substrato enzimático, o PRPP; e D) o atracamento da HPRT1 realizado contra o substrato na presença do MBZ.

Fonte: elaborada pelo autor.

Os resultados revelaram que o MBZ interagiu de maneira similar com a enzima ao comparar com seu inibidor immGP, e com uma afinidade levemente superior em comparação ao seu substrato. Além disso, observa-se que a simples presença do MBZ disposta no sítio ativo possa ter prejudicado na acomodação do substrato nesta região e, com isso, interferindo na formação do complexo estável entre a proteína e o ligante natural.

O inibidor ImmucilinGP (immGP) trata-se de uma molécula sintética análoga ao GMP, na qual é um dos produtos da catálise realizado pela enzima HPRT1. Em um trabalho baseado na caracterização da HPRT1 feita pelo pesquisador Shi e colaboradores (1999), o referido autor realizou o processo de co-cristalização da proteína juntamente com o ligante immGP e observaram que ele se ligou na fenda do sítio ativo entre a folha beta central da região do núcleo

e a pequena folha beta da região da cobertura (Shi et al., 1999). Além disso, a pesquisa investigou os resíduos de interação que forma o complexo, relatando os contatos entre os resíduos de aminoácidos Lys<sup>165</sup>, Asp<sup>137</sup>, Phe<sup>186</sup> e Ile<sup>135</sup>, Val<sup>187</sup>, Asp<sup>193</sup>, Arg<sup>199</sup>, Lys<sup>68</sup>, Asp<sup>134</sup>, Glu<sup>133</sup>, Tyr<sup>104</sup>, Thr<sup>138</sup>, Thr<sup>141</sup> e Gly<sup>139</sup>.

De maneira similar, os dados *in silico* obtidos neste trabalho sugerem que o inibidor apresentou um comportamento parecido com os resultados *in vitro* no artigo apresentado, visto que foi possível observar o compartilhamento entre vários resíduos de aminoácidos. E comparando com o ligante MBZ, os resultados são interessantes, uma vez que os dados indicam que a molécula em estudo se ligou na mesma região que o inibidor immGP, além de compartilhar resíduos de aminoácidos que estabilizam o inibidor. Dessa forma, esses resultados fornecem uma possível explicação sobre o modo de ligação que o fármaco MBZ pode atuar nesta proteína da via de salvamento das purinas e indicando um possível efeito inibidor, visto que ela pode estar competindo contra o substrato pela fenda do sítio ativo da enzima HPRT1.

Tabela 7 - Pontuação obtida pelo VINA para cada molécula pequena utilizada como ligante para o docking molecular com a proteína HPRT1

Ligantes	Score (Kcal/mol)			
	Tipo de ancoragem molecular			
	Fármaco MBZ	Ligante nativo	Inibidor conhecido	Ligante nativo na presença do MBZ
MBZ	-7.683	*	*	*
PRPP	*	-6.593	*	-6.982
immGP	*	*	-7.699	*

A tabela expõe os valores referente a pontuação ou energia de afinidade obtida para cada ligante atracada contra a enzima HPRT1.

\*não participou do docking molecular

MBZ: mebendazol

PRPP: Fosforribosil pirofosfato

ImmGP: ImmucilinGP

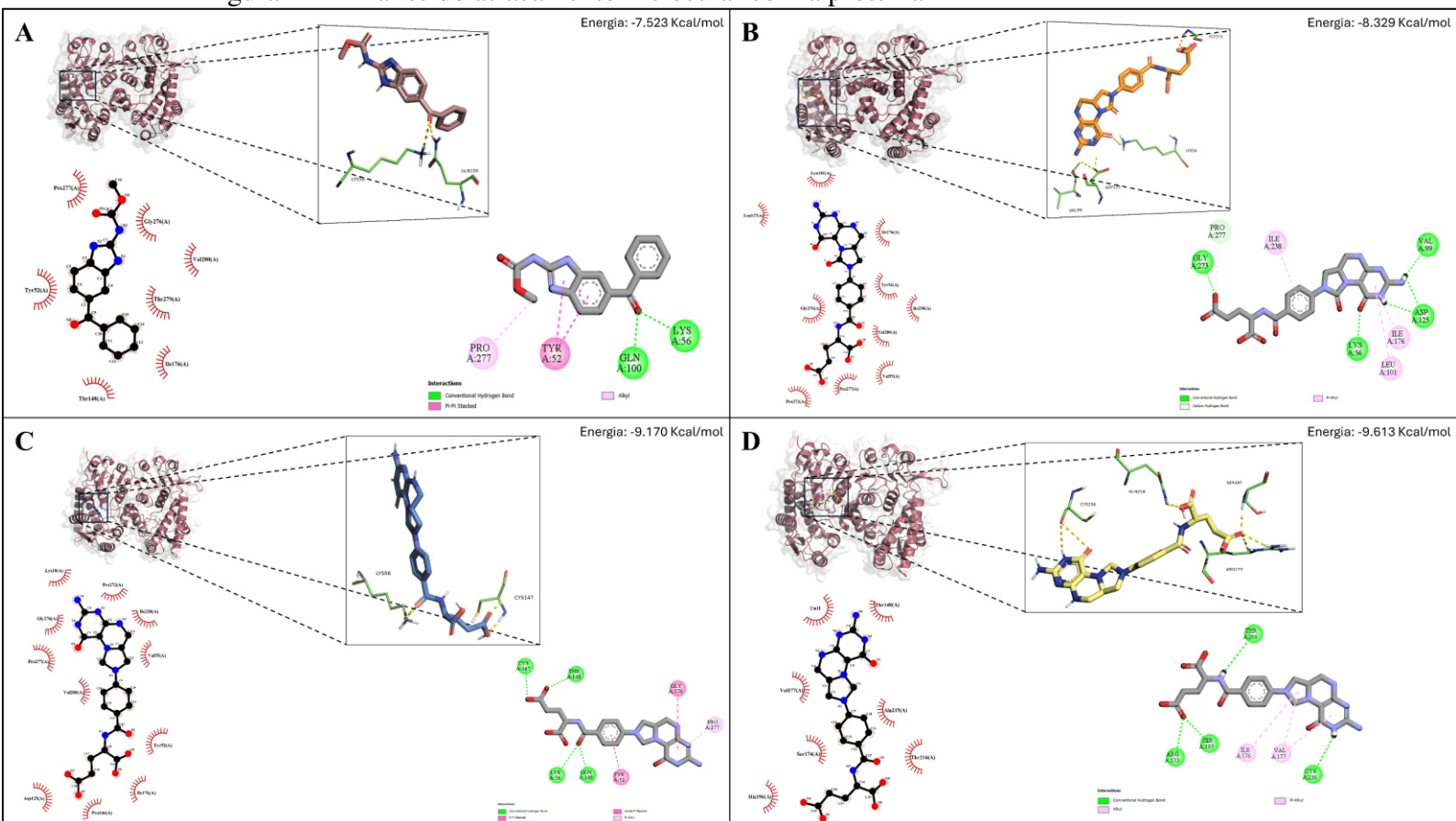
Fonte: elaborada pelo autor.

#### 4.4.3 Estudos com a proteína MTHFD1

Em relação à enzima MTHFD1, a figura 11A destaca que o MBZ apresentou um comportamento de interação similar ao exemplo anterior, na qual se acomodou na porção ortostática da proteína estabelecendo ligação de hidrogênio com os resíduos de aminoácidos Lys<sup>56</sup> e Gln<sup>100</sup>, e apresentando uma energia de interação de -7.523 Kcal/mol, além de ser observado outros tipos de ligação, como empilhamento Pi-Pi e alquil entre os resíduos Tyr<sup>52</sup> e Pro<sup>277</sup>, respectivamente. Também se destaca os contatos hidrofóbicos com a proteína pelos aminoácidos Tyr<sup>52</sup>, Thr<sup>148</sup>, Ile<sup>176</sup>, Gly<sup>276</sup>, Pro<sup>277</sup>, Thr<sup>279</sup> e Val<sup>280</sup>. O inibidor utilizado neste experimento foi a molécula L34 e esse ligante interagiu no mesmo bolsão e sendo estabilizado pelos resíduos Lys<sup>56</sup>, Val<sup>99</sup>, Leu<sup>101</sup>, Asp<sup>125</sup>, Ile<sup>176</sup>, Ile<sup>238</sup>, Gly<sup>273</sup> e Pro<sup>277</sup>.

O acoplamento do substrato natural, 5,10-metilenotetraidrofolato (5,10-metileno-THF), exposto na figura 11C, com a proteína revelou sua interação com os resíduos Tyr<sup>52</sup>, Lys<sup>56</sup>, Cys<sup>147</sup>, Thr<sup>148</sup>, Gly<sup>276</sup> e Pro<sup>277</sup> no sítio ativo com uma energia de -9,170 Kcal/mol. Todavia, quando o substrato é acoplado na presença do MBZ, existe uma mudança na disposição do ligante, sugerindo que o MBZ pode interferir no acoplamento do substrato no bolsão catalítico.

Figura 11 - Análise do atracamento molecular com a proteína MTHFD1



Esse diagrama apresenta a análise de docking molecular da enzima MTHFD1 com os seus ligantes, ilustrando: A) o atracamento da MTHFD1 com o mebendazol (MBZ); B) o atracamento da MTHFD1 com o inibidor enzimático conhecido L34; C) o atracamento da MTHFD1 com o seu substrato enzimático, N5,N10-metileno-THF; e D) o atracamento da MTHFD1 realizado contra o substrato na presença do MBZ.

Fonte: elaborada pelo autor.

É importante comentar que, embora o MBZ tenha uma afinidade forte contra o MTHFD1, o substrato apresentou uma energia de interação superior em relação ao anti-helmíntico, na qual foi na ordem de -9.170 Kcal/mol para o 5,10-metileno-THF contra -7.523 Kcal/mol para o fármaco. O efeito de interferência do MBZ é demonstrado pela mudança conformacional do substrato quando ambos estão presentes. Ademais, um trabalho mostra que essa enzima é definida como um alvo molecular interessante no design de terapias direcionadas (Tedeschi et al., 2015).

O artigo proposto por Bueno descreve a caracterização cristalográfica do complexo formado entre a enzima MTHFD1 e outros 3 inibidores, e dentre eles, foi utilizado o inibidor chamado L34 neste projeto, também sendo uma molécula considerada análoga do substrato enzimático (Bueno; Dawson; Hunter, 2019; Schmidt et al., 2000). Como resultado similar à proteína anterior, o inibidor proposto interagiu no bolsa que representa o sítio ativo da enzima, sendo sustentado pelas interações com os resíduos Lys<sup>56</sup>, Leu<sup>101</sup>, Asp<sup>125</sup> e Gly<sup>273</sup>. E, como resultado surpreendente, os dados *in silico* revelaram as mesmas interações destacadas *in vitro*, além de outros contatos adicionais detectados no programa. Em adição, o MBZ apresentou um comportamento similar, se acomodando na mesma região de interação do análogo do substrato. Novamente, sugerindo que o fármaco MBZ pode exercer um efeito inibitório contra a proteína MTHFD1 ao disputar pelo mesmo local de interação com o 5,10-metileno-THF.

Tabela 8 - Pontuação obtida pelo VINA para cada molécula pequena utilizada como ligante para o docking molecular com a proteína MTHFD1

Score (Kcal/mol)				
Ligantes	Tipo de ancoragem molecular			
	Fármaco MBZ	Ligante nativo	Inibidor conhecido	Ligante nativo na presença do MBZ
MBZ	-7.523	*	*	*
5,10-metileno-THF	*	-9.170	*	-9.613
L34	*	*	-8.329	*

A tabela expõe os valores referente a pontuação ou energia de afinidade obtida para cada ligante atracada contra a enzima MTHFD1.

\*não participou do docking molecular

MBZ: mebendazol

5,10-metileno-THF: 5,10-metilenotetraidrofolato

L34: Ácido (2S)-2-amino-3-{4-[2-amino-4-oxo-4,6-diidro-3H-pirimidin-5-il]fenil}sulfonil}propiónico

Fonte: elaborada pelo autor.

#### 4.4.4 TYMS

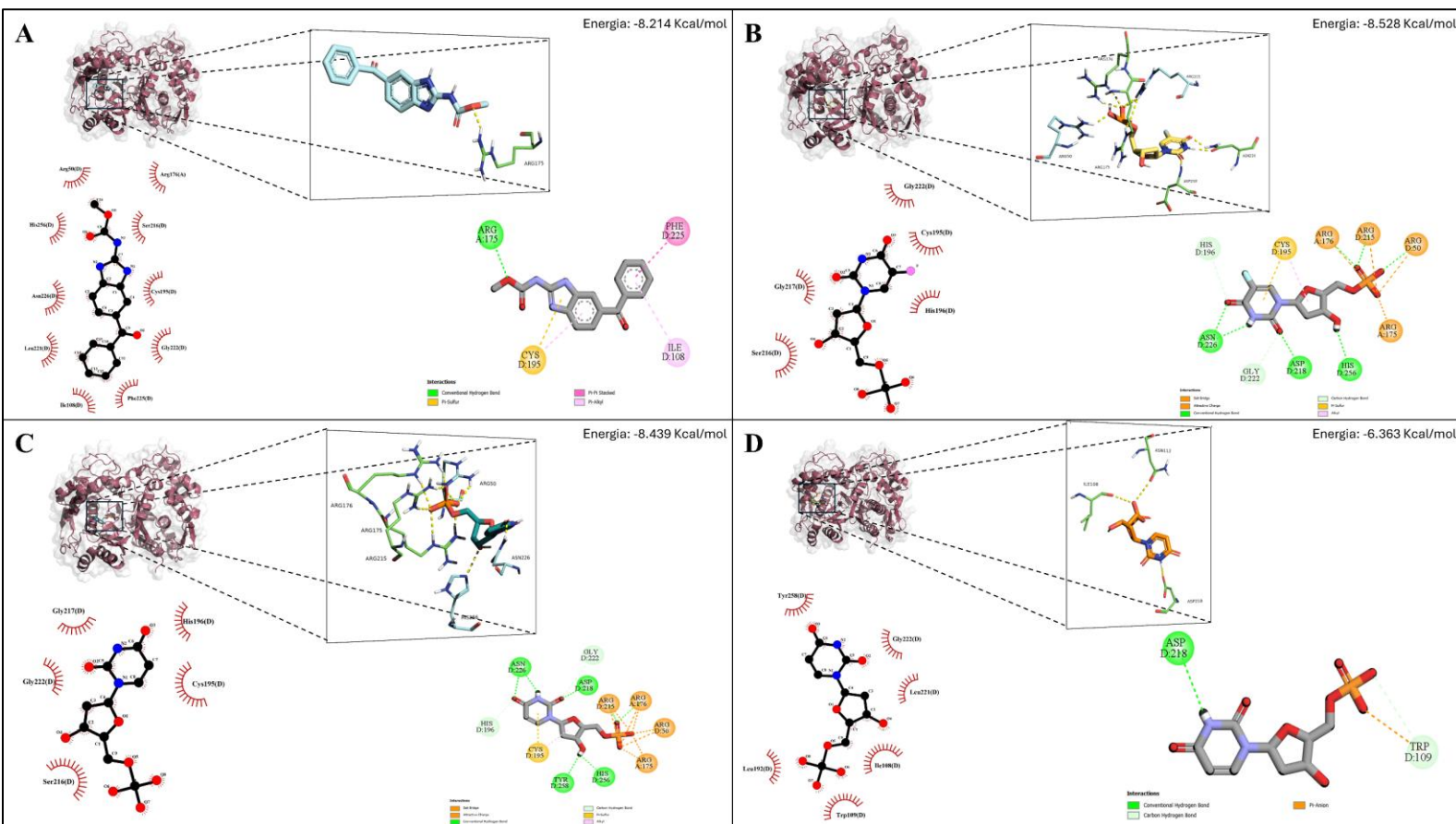
O MBZ forma um complexo com a proteína TYMS na figura 12A (timidilato sintase) por meio de interação polar com o resíduo Arg<sup>175</sup> com uma afinidade de -8,214 Kcal/mol. Interações como Pi-sulfu, empilhamento Pi-Pi e Pi-alquil também foram destacadas com os resíduos Cys<sup>195</sup>, Phe<sup>225</sup> e Ile<sup>108</sup>, respectivamente. Os contatos hidrofóbicos no complexo proteína e ligante acontecem com os resíduos Arg<sup>50</sup>, Ile<sup>108</sup>, Arg<sup>176</sup>, Cys<sup>195</sup>, Ser<sup>216</sup>, Leu<sup>221</sup>, Gly<sup>222</sup>, Phe<sup>225</sup>, Asn<sup>226</sup> e His<sup>256</sup>.

A análise do docking contra o inibidor FdUMP (figura 12B) revelou uma estabilização suportada pelos resíduos de aminoácidos Arg<sup>50</sup>, Arg<sup>175</sup>, Arg<sup>176</sup>, Cys<sup>195</sup>, His<sup>196</sup>, Arg<sup>215</sup>, Asp<sup>218</sup>, Gly<sup>222</sup>, Asn<sup>226</sup> e His<sup>256</sup>. Além disso, os resultados, baseando-se no ligante nativo dUMP e a proteína, mostraram que a molécula foi acoplada no mesmo bolsão que o MBZ se estabilizou e esse complexo é mantida pelos resíduos Arg<sup>50</sup>, Arg<sup>175</sup>, Arg<sup>176</sup>, Cys<sup>195</sup>, His<sup>196</sup>, Asp<sup>218</sup>, Gly<sup>222</sup>, Asn<sup>226</sup>, His<sup>256</sup> e Tyr<sup>258</sup>, apresentando uma afinidade de -8,439 Kcal/mol.

E, por fim, a figura 12D revela que o estudo do atracamento do substrato na presença do MBZ revelou uma modificação no modo de interação com o seu substrato, sugerindo que o MBZ talvez interfira no complexo formado entre a enzima e o seu respectivo substrato e, como efeito, esse fenômeno pode prejudicar na catálise para a formação do produto enzimático.

Posteriormente, foi identificado que, sob a influência do fármaco MBZ, as interações que estabilizam o substrato sofreram uma queda no número de interação quando comparada na presença somente do ligante dUMP, na qual é observado apenas 2 resíduos de aminoácidos fazendo interação entre Trp<sup>109</sup> e Asp<sup>218</sup>.

Figura 12 - Análise do atracamento molecular com a proteína TYMS



Esse diagrama apresenta a análise de docking molecular da enzima TYMS com os seus ligantes, ilustrando: A) o atracamento da TYMS com o mebendazol (MBZ); B) o atracamento da TYMS com o inibidor enzimático conhecido FdUMP; C) o atracamento da TYMS com o seu substrato enzimático, dUMP; e D) o atracamento da TYMS realizado contra o substrato na presença do MBZ.

Fonte: elaborada pelo autor.

Um detalhe peculiar foi que houve uma mudança pronunciada da afinidade com o substrato após a presença do MBZ, passando de -8,439 para -6,363 Kcal/mol, mostrando que o MBZ possa ter interferido na afinidade que estabiliza o complexo enzima e substrato.

O 5-fluoro-2'-desoxiuridina-5'-monofosfato (FdUMP) trata-se de um análogo do substrato dUMP e representa um inibidor potente da enzima TYMS (Costi et al., 2005). Um trabalho investigou o efeito desse ligante na enzima e essa molécula se liga no sítio ativo

interagindo com os seguintes resíduos: Tyr<sup>258</sup>, His<sup>256</sup>, Asn<sup>218</sup>, Asn<sup>226</sup>, Gln<sup>216</sup>, His<sup>196</sup>, Tyr<sup>135</sup>, Cys<sup>195</sup>, Ser<sup>216</sup>, Arg<sup>215</sup>, Arg<sup>176</sup>, Arg<sup>50</sup> e Arg<sup>175</sup> (Pozzi et al., 2019). E os resultados *in silico* obtidos pelo docking molecular revelaram dados similares a respeito dos contatos e o modo de interação com a proteína. E no contexto do docking contra a molécula MBZ, os dados indicaram resultados parecidos.

Tabela 9 - Pontuação obtida pelo VINA para cada molécula pequena utilizada como ligante para o docking molecular com a proteína TYMS

Ligantes	Score (Kcal/mol)			
	Tipo de ancoragem molecular			
	Fármaco MBZ	Ligante nativo	Inibidor conhecido	Ligante nativo na presença do MBZ
MBZ	-8.214	*	*	*
<u>dUMP</u>	*	-8.439	*	-6.363
<u>FdUMP</u>	*	*	-8.528	*

A tabela expõe os valores referente a pontuação ou energia de afinidade obtida para cada ligante atracada contra a enzima TYMS.

\*não participou do docking molecular

MBZ: mebendazol

dUMP: desoxiuridina monofosfato

FdUMP: 5-fluoro-2'-desoxiuridina-5'-monofosfato

Fonte: elaborada pelo autor.

#### 4.4.5 DHODH

E os estudos com a última proteína DHODH mostraram que o MBZ interagiu em uma porção em volta de 2 alfa-hélices (figura 13A), que juntas fazem parte do domínio que constitui um canal. Além disso, esse complexo foi suportado por ligação de hidrogênio pelos resíduos GLY<sup>48</sup> e Arg<sup>136</sup>. Sendo observado também os contatos do tipo Pi-Pi empilhamento, alquil, Pi-sigma e Pi-alquil com os resíduos Pro<sup>52</sup>, Ala<sup>55</sup>, Val<sup>134</sup>, Val<sup>143</sup>, Tyr<sup>356</sup> e Thr<sup>360</sup>. Sendo estabilizado por uma energia de ligação relativamente alta em comparação aos dados anteriores, com um valor de -11,102 Kcal/mol.

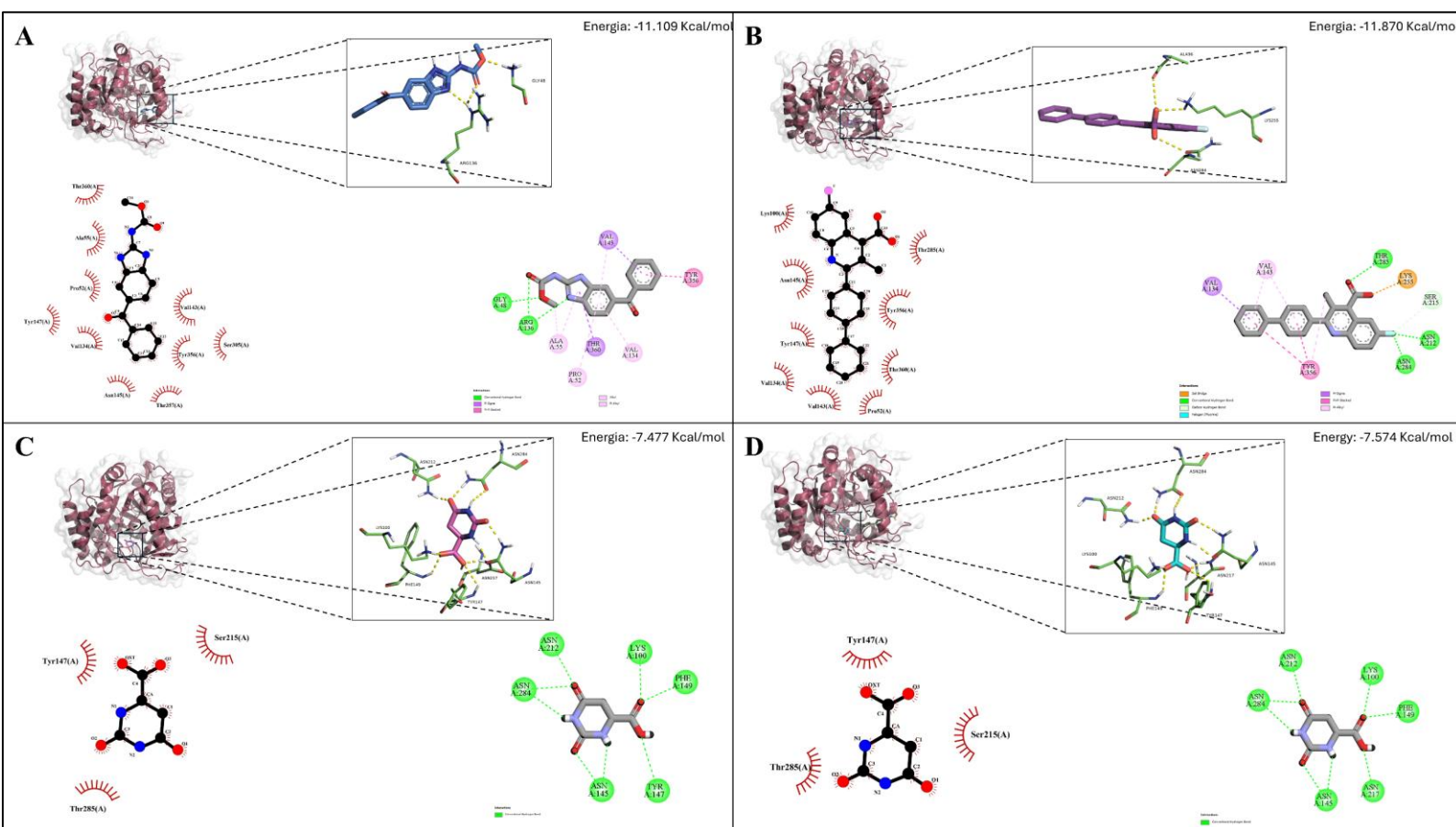
O inibidor chamado de brequinar mostrou interações com os resíduos Asn<sup>212</sup>, Ser<sup>215</sup>, Asn<sup>284</sup> e Thr<sup>285</sup> do tipo ligação de hidrogênio (figura 13B). E interações não polares com os

resíduos Val<sup>134</sup>, Val<sup>143</sup>, Lys<sup>255</sup> e Tyr<sup>356</sup>. Além dos contatos hidrofóbicos com os aminoácidos Pro<sup>52</sup>, Lys<sup>100</sup>, Val<sup>134</sup>, Val<sup>143</sup>, Asn<sup>145</sup>, Tyr<sup>147</sup>, Thr<sup>285</sup>, Tyr<sup>356</sup> e Thr<sup>360</sup>.

O substrato natural da DHODH, ácido di-hidro-orótico (ORO) ligou-se próximo ao sítio ativo da enzima, como é exposto na figura 10C, interagindo com os resíduos Lys<sup>100</sup>, Asn<sup>145</sup>, Tyr<sup>147</sup>, Phe<sup>149</sup>, Asn<sup>212</sup> e Asn<sup>284</sup>, estabelecendo apenas interações do tipo ligação de hidrogênio, com uma energia de interação de -7,477 Kcal/mol.

E, por fim, a análise do docking molecular do substrato na presença do MBZ revelou mudanças sutis no modo de interação com o ORO, na qual houve uma conservação da maioria dos resíduos e uma alteração mínima na energia que estabiliza o ligante.

Figura 13 - Análise do atracamento molecular com a proteína DHODH



Esse diagrama apresenta a análise de docking molecular da enzima DHODH com os seus ligantes, ilustrando: A) o atracamento da DHODH com o mebendazol (MBZ); B) o atracamento da DHODH com o inibidor enzimático conhecido BRE; C) o atracamento da DHODH com o seu substrato enzimático, di-hidro-orotato; e D) o atracamento da DHODH realizado contra o substrato na presença do MBZ.

Fonte: elaborada pelo autor.

Uma observação interessante é que, o MBZ interagiu em um canal que pode comprometer a passagem do substrato até o encontro com o seu sítio ativo. Além disso, o fármaco MBZ apresentou uma afinidade superior ao substrato, sugerindo que ele possa competir e evitar a reação catalítica contra o ligante natural da enzima.

Pesquisas revelaram que o brequinar apresenta um potencial efeito terapêutico de inibição da proteína DHODH, considerado um agente antiproliferativo, além de trabalhos investigando o papel promissor dessa molécula para o tratamento contra tumores (Chen et al., 1992; Maroun et al., 1993; Natale et al., 1992; Peters et al., 1990; Urba et al., 1992). A enzima DHODH contém um domínio helicoidal, próximo a extensão N-terminal, na qual representa o canal de passagem que leva ao sítio ativo da proteína, e o próprio inibidor brequinar interagem nesta região que forma o túnel (Liu et al., 2000).

Liu et al., publicou uma pesquisa estudando o papel do inibidor na tentativa de compreender a alta afinidade do brequinar pela DHODH humana (Liu et al., 2000). E os resultados destacaram que a molécula assume uma conformação na qual uma extremidade do ligante está enterrada no ambiente polar do túnel, enquanto os anéis aromáticos estão posicionados na região hidrofóbica da proteína. Outrossim, foi possível identificar os principais contatos estabelecidos pelo complexo e o autor identificou os seguintes: Gln<sup>47</sup>, Arg<sup>136</sup>, Thr<sup>360</sup>, His<sup>56</sup>, Met<sup>43</sup>, Ala<sup>59</sup>, Leu<sup>68</sup>, Pro<sup>364</sup>, Tyr<sup>356</sup> e Val<sup>134</sup>.

Esses achados corroboram com os resultados observados *in silico* da proteína contra o inibidor, de tal modo que o ligante estabeleceu um arranjo de interação e uma conformação no espaço muito próxima aos resultados obtidos *in vitro*. Da mesma forma que o docking molecular utilizando o MBZ foi obtido dados comparáveis ao brequinar. Por se tratar de um inibidor potente e seletivo contra a DHODH, essa formação do complexo com o brequinar pode inviabilizar a disponibilidade do substrato presente no sítio ativo, uma vez que o inibidor está acoplado no túnel que dá acesso a cavidade ortostérica (Liu et al., 2000). Portanto, tal sugestão também pode ser estendida ao fármaco de estudo, MBZ, visto que ele apresentou um comportamento semelhante, assim é possível que o anti-helmíntico possa bloquear a atividade da enzima que faz parte do biossintese das pirimidinas.

Tabela 10 - Pontuação obtida pelo VINA para cada molécula pequena utilizada como ligante para o docking molecular com a proteína DHODH

Score (Kcal/mol)				
Ligantes	Tipo de ancoragem molecular			
	Fármaco MBZ	Ligante nativo	Inibidor conhecido	Ligante nativo na presença do MBZ
MBZ	-11.109	*	*	*
ORO	*	-7.477	*	-7.574
BRE	*	*	-11.870	*

A tabela expõe os valores referente a pontuação ou energia de afinidade obtida para cada ligante atracada contra a enzima DHODH.

\*não participou do docking molecular

MBZ: mebendazol

ORO: di-hidro-orotato

BRE: Brequinar

Fonte: elaborada pelo autor.

## 5 CONCLUSÃO

O referido trabalho propôs um estudo para avaliar o potencial papel do fármaco MBZ como modulador da via de biossíntese de nucleotídeos, na qual foi destacado, especificamente, o possível efeito dessa molécula no perfil de expressão de alguns genes e qual o comportamento desse anti-helmíntico frente a proteínas do metabolismo das purinas e das pirimidinas. A análise dos resultados indicou que a molécula reposicionada foi capaz de modular a taxa de transcritos de *PRPS1*, *HPRT1*, *MTHFD1*, *TYMS* e *DHODH*, e os referidos genes estavam desregulados nos experimentos realizados. Além disso, foi observado que o MBZ se ancorou próximo ao domínio catalítico das enzimas no ensaio *in silico*. Por conclusão, os resultados indicam que os referidos genes podem ser selecionados futuramente como biomarcadores promissores na clínica para auxiliar no prognóstico e na estratégia de tratamento, e as enzimas se tornam candidatos promissores para alvos farmacológicos no enfoque do metabolismo de nucleotídeos.

Ainda assim, torna-se indispensável pesquisas futuras para validar o comportamento do MBZ referente aos alvos moleculares, a partir de simulações computacionais mais avançadas e sistemas mais complexos, como a própria dinâmica molecular, por exemplo. Além de adotar ensaios *in vitro* para quantificar os intermediários biossintéticos produzidos após o tratamento com o MBZ. E avançar os estudos do MBZ para a pesquisa com o modelo *in vivo*, com o objetivo de avaliar o efeito antitumoral em sistemas biológicos mais complexos.

## REFERÊNCIAS

- AGU, P. C. *et al.* Molecular docking as a tool for the discovery of molecular targets of nutraceuticals in diseases management. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 13398, 17 ago. 2023.
- AIRD, Katherine M.; ZHANG, Rugang. Nucleotide Metabolism, Oncogene-Induced Senescence and Cancer. **Cancer letters**, v. 356, n. 2, p. 204–210, 28 jan. 2015.
- ALI, Eunus S.; BEN-SAHRA, Issam. Regulation of nucleotide metabolism in cancers and immune disorders. **Trends in cell biology**, v. 33, n. 11, p. 950–966, nov. 2023.
- ALIABADI, Amin *et al.* Critical dysregulated signaling pathways in drug resistance: highlighting the repositioning of mebendazole for cancer therapy. **Frontiers in Pharmacology**, v. 16, 25 jul. 2025.
- AMIN, Mahul 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, mar. 2017.
- AMSTUTZ, Ursula; FROEHLICH, Tanja K.; LARGIADÈR, Carlo R. Dihydropyrimidine dehydrogenase gene as a major predictor of severe 5-fluorouracil toxicity. **Pharmacogenomics**, v. 12, n. 9, p. 1321–1336, set. 2011.
- ARGILÉS, G. *et al.* Localised colon cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. **Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology**, v. 31, n. 10, p. 1291–1305, out. 2020.
- ASHBURN, Ted T.; THOR, Karl B. Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. **Nature Reviews. Drug Discovery**, v. 3, n. 8, p. 673–683, ago. 2004.
- BAEISSA, Hanadi M. *et al.* Mutational patterns in oncogenes and tumour suppressors. **Biochemical Society Transactions**, v. 44, n. 3, p. 925–931, 9 jun. 2016.
- BAI, Ren-Yuan *et al.* Antiparasitic mebendazole shows survival benefit in 2 preclinical models of glioblastoma multiforme. **Neuro-Oncology**, v. 13, n. 9, p. 974–982, set. 2011.
- BAI, Ren-Yuan *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, abr. 2015.
- BECKER, M. A. *et al.* Cloning of cDNAs for human phosphoribosylpyrophosphate synthetases 1 and 2 and X chromosome localization of PRPS1 and PRPS2 genes. **Genomics**, v. 8, n. 3, p. 555–561, nov. 1990.
- BECKER, M. A. Phosphoribosylpyrophosphate synthetase and the regulation of phosphoribosylpyrophosphate production in human cells. **Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology**, v. 69, p. 115–148, 2001.

- BLOM, Kristin *et al.* The anticancer effect of mebendazole may be due to M1 monocyte/macrophage activation via ERK1/2 and TLR8-dependent inflammasome activation. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 39, n. 4, p. 199–210, ago. 2017.
- BOUKALOVA, Stepana *et al.* Dihydroorotate dehydrogenase in oxidative phosphorylation and cancer. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1866, n. 6, p. 165759, 1 jun. 2020.
- BRAY, Freddie *et al.* Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. [*S.d.*].
- BROWN, Geoffrey. Oncogenes, Proto-Oncogenes, and Lineage Restriction of Cancer Stem Cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 18, p. 9667, jan. 2021.
- BROWN, Joel S. *et al.* Updating the Definition of Cancer. **Molecular Cancer Research**, v. 21, n. 11, p. 1142–1147, 1 nov. 2023.
- BRUGMANS, Jo P. *et al.* Mebendazole in Enterobiasis Radiochemical and Pilot Clinical Study in 1,278 Subjects. **JAMA**, v. 217, n. 3, p. 313–316, 19 jul. 1971.
- BUENO, Renata; DAWSON, Alice; HUNTER, William N. An assessment of three human methylenetetra-hydrofolate dehydrogenase/cyclohydrolase–ligand complexes following further refinement. **Acta Crystallographica. Section F, Structural Biology Communications**, v. 75, n. Pt 3, p. 148–152, 20 fev. 2019.
- BURDELSKI, Christoph *et al.* Overexpression of thymidylate synthase (TYMS) is associated with aggressive tumor features and early PSA recurrence in prostate cancer. **Oncotarget**, v. 6, n. 10, p. 8377–8387, 25 fev. 2015.
- BURLEY, Stephen K. *et al.* Protein Data Bank: A Comprehensive Review of 3D Structure Holdings and Worldwide Utilization by Researchers, Educators, and Students. **Biomolecules**, v. 12, n. 10, p. 1425, out. 2022.
- CARTHEW, Richard W. Gene Regulation and Cellular Metabolism: An Essential Partnership. **Trends in genetics : TIG**, v. 37, n. 4, p. 389–400, abr. 2021.
- CHAI, Jong-Yil; JUNG, Bong-Kwang; HONG, Sung-Jong. Albendazole and Mebendazole as Anti-Parasitic and Anti-Cancer Agents: an Update. **The Korean Journal of Parasitology**, v. 59, n. 3, p. 189–225, 30 jun. 2021.
- CHAKRAVARTHI, Balabhadrapatruni V. S. K.; NEPAL, Saroj; VARAMBALLY, Sooryanarayana. Genomic and Epigenomic Alterations in Cancer. **The American Journal of Pathology**, v. 186, n. 7, p. 1724–1735, jul. 2016.
- CHAO, Joseph *et al.* Assessment of Pembrolizumab Therapy for the Treatment of Microsatellite Instability-High Gastric or Gastroesophageal Junction Cancer Among Patients in the KEYNOTE-059, KEYNOTE-061, and KEYNOTE-062 Clinical Trials. **JAMA oncology**, v. 7, n. 6, p. 895–902, 1 jun. 2021.

CHEN, Jie *et al.* De novo nucleotide biosynthetic pathway and cancer. **Genes & Diseases**, v. 10, n. 6, p. 2331–2338, 16 maio 2022.

CHEN, S. F. *et al.* Inhibition of dihydroorotate dehydrogenase activity by brequinar sodium. **Cancer Research**, v. 52, n. 13, p. 3521–3527, 1 jul. 1992.

CHEN, Yun *et al.* Comparing Paclitaxel Plus Fluorouracil Versus Cisplatin Plus Fluorouracil in Chemoradiotherapy for Locally Advanced Esophageal Squamous Cell Cancer: A Randomized, Multicenter, Phase III Clinical Trial. **Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 37, n. 20, p. 1695–1703, 10 jul. 2019.

CHEN, Yun-Chi *et al.* Clinicopathological Variation of Lauren Classification in Gastric Cancer. **Pathology & Oncology Research**, v. 22, n. 1, p. 197–202, 1 jan. 2016.

CHRISTENSEN, Sharon *et al.* 5-Fluorouracil treatment induces characteristic T>G mutations in human cancer. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, p. 4571, 8 out. 2019.

CHRISTOFK, Heather R. *et al.* The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth. **Nature**, v. 452, n. 7184, p. 230–233, mar. 2008.

CISZEWSKI, Wojciech M. *et al.* Thymidylate Synthase Overexpression Drives the Invasive Phenotype in Colon Cancer Cells. **Biomedicines**, v. 10, n. 6, p. 1267, jun. 2022.

CLINTON, Steven K.; GIOVANNUCCI, Edward L.; HURSTING, Stephen D. The World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research Third Expert Report on Diet, Nutrition, Physical Activity, and Cancer: Impact and Future Directions. **The Journal of Nutrition**, v. 150, n. 4, p. 663–671, abr. 2020.

COLE, Jason C. *et al.* Comparing protein–ligand docking programs is difficult. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 60, n. 3, p. 325–332, 2005.

COLLINS, Jason T. *et al.* Anatomy, Abdomen and Pelvis, Small Intestine. *In: StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2025.

COSTI, M. P. *et al.* **Thymidylate Synthase Structure, Function and Implication in Drug Discovery**. Text. Disponível em: <<https://www.ingentaconnect.com/content/ben/cmc/2005/00000012/00000019/art00005>>. Acesso em: 18 nov. 2025.

CUNNINGHAM, David *et al.* Perioperative chemotherapy versus surgery alone for resectable gastroesophageal cancer. **The New England Journal of Medicine**, v. 355, n. 1, p. 11–20, 6 jul. 2006.

DA SILVA, Emerson Lucena *et al.* Differences in glucose concentration shows new perspectives in gastric cancer metabolism. **Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA**, v. 82, p. 105357, ago. 2022.

- DA SILVA, Emerson Lucena *et al.* Mebendazole targets essential proteins in glucose metabolism leading gastric cancer cells to death. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 475, p. 116630, 15 set. 2023.
- DANIELS, Ian R.; ALLUM, William H. The Anatomy and Physiology of the Stomach. *In*: FIELDING, John W. L.; HALLISSEY, Michael T. (Orgs.). **Upper Gastrointestinal Surgery**. London: Springer, 2005. p. 17–37.
- DEBERARDINIS, Ralph J. *et al.* The Biology of Cancer: Metabolic Reprogramming Fuels Cell Growth and Proliferation. **Cell Metabolism**, v. 7, n. 1, p. 11–20, 1 jan. 2008.
- DUDLEY,<sup>1</sup> William N.; WICKHAM,<sup>2</sup> Rita; COOMBS,<sup>3</sup> NICHOLAS. An Introduction to Survival Statistics: Kaplan-Meier Analysis. **Journal of the Advanced Practitioner in Oncology**, v. 7, n. 1, p. 91–100, 2016.
- ELSTROM, Rebecca L. *et al.* Akt Stimulates Aerobic Glycolysis in Cancer Cells. **Cancer Research**, v. 64, n. 11, p. 3892–3899, 1 jun. 2004.
- ESCOLL, Pedro; BUCHRIESER, Carmen. Metabolic reprogramming: an innate cellular defence mechanism against intracellular bacteria? **Current Opinion in Immunology**, Allergy and hypersensitivity • Host pathogens. v. 60, p. 117–123, 1 out. 2019.
- FABRI, Mario *et al.* Research Techniques Made Simple: Profiling Cellular Energy Metabolism. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 141, n. 12, p. 2767- 2774.e2, 1 dez. 2021.
- FANALE, Daniele *et al.* Caretakers and Gatekeepers. *In*: **Encyclopedia of Life Sciences**. [S.l.]: John Wiley & Sons, Ltd, 2017. p. 1–10.
- FINLEY, Lydia W. S. What is cancer metabolism? **Cell**, v. 186, n. 8, p. 1670–1688, 13 abr. 2023.
- GHAFOURI-FARD, Soudeh *et al.* 5-Fluorouracil: A Narrative Review on the Role of Regulatory Mechanisms in Driving Resistance to This Chemotherapeutic Agent. **Frontiers in Oncology**, v. 11, 19 abr. 2021.
- GOHLKE, Holger; HENDLICH, Manfred; KLEBE, Gerhard. Função de pontuação baseada em conhecimento para prever interações proteína-ligante 1. **Journal of Molecular Biology**, v. 295, n. 2, p. 337–356, 14 jan. 2000.
- GONSALVES, Nirmala. Eosinophilic Gastrointestinal Disorders. **Clinical Reviews in Allergy & Immunology**, v. 57, n. 2, p. 272–285, out. 2019.
- GREM, Jean. 5Fluorouracil: Forty-Plus and Still Ticking. A Review of its Preclinical and Clinical Development. **Investigational new drugs**, v. 18, p. 299–313, 1 dez. 2000.
- GUAN, Jinqiu *et al.* MTHFD1 regulates the NADPH redox homeostasis in MYCN-amplified neuroblastoma. **Cell Death & Disease**, v. 15, n. 2, p. 124, 9 fev. 2024.

- GUERINI, Andrea Emanuele *et al.* Mebendazole as a Candidate for Drug Repurposing in Oncology: An Extensive Review of Current Literature. **Cancers**, v. 11, n. 9, p. 1284, 31 ago. 2019.
- GUO, Shaoqiang *et al.* DHODH inhibition represents a therapeutic strategy and improves abiraterone treatment in castration-resistant prostate cancer. **Oncogene**, v. 43, n. 19, p. 1399–1410, maio 2024.
- HAMAM, Rimi *et al.* Enhanced efficacy of 5-fluorouracil in combination with a dual histone deacetylase and phosphatidylinositide 3-kinase inhibitor (CUDC-907) in colorectal cancer cells. **Saudi Journal of Gastroenterology: Official Journal of the Saudi Gastroenterology Association**, v. 23, n. 1, p. 34–38, 2017.
- HANAHAN, Douglas. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. **Cancer Discovery**, v. 12, n. 1, p. 31–46, 12 jan. 2022.
- HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. The Hallmarks of Cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57–70, 7 jan. 2000.
- HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 4 mar. 2011.
- HARRIS, Debra J. Cancer treatment-induced mucositis pain: strategies for assessment and management. **Therapeutics and Clinical Risk Management**, v. 2, n. 3, p. 251–258, set. 2006.
- HE, Daochuan *et al.* A síntese de pirimidinas de novo alimenta a glicólise e confere quimiorresistência no câncer gástrico. **Cancer Letters**, v. 549, p. 215837, 28 nov. 2022.
- HE, Min; CHAO, Lin; YOU, Yi-Ping. PRPS1 silencing reverses cisplatin resistance in human breast cancer cells. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 95, n. 3, p. 385–393, jun. 2017.
- HEALTH COMMISSION OF THE PEOPLE'S REPUBLIC OF CHINA, National. National guidelines for diagnosis and treatment of gastric cancer 2022 in China (English version). **Chinese Journal of Cancer Research**, v. 34, n. 3, p. 207–237, 30 jun. 2022.
- HEVENER, Kirk E. *et al.* Validation of Molecular Docking Programs for Virtual Screening against Dihydropteroate Synthase. **Journal of chemical information and modeling**, v. 49, n. 2, p. 444–460, fev. 2009.
- HONG, Bo-Young *et al.* Chemotherapy-induced oral mucositis is associated with detrimental bacterial dysbiosis. **Microbiome**, v. 7, n. 1, p. 66, 25 abr. 2019.
- HOSODA, Kei; WATANABE, Masahiko; YAMASHITA, Keishi. Re-emerging role of macroscopic appearance in treatment strategy for gastric cancer. **Annals of Gastroenterological Surgery**, v. 3, n. 2, p. 122–129, 19 out. 2018.
- HOXHAIJ, Gerta; MANNING, Brendan D. The PI3K-AKT network at the interface of oncogenic signalling and cancer metabolism. **Nature reviews. Cancer**, v. 20, n. 2, p. 74–88, fev. 2020.

HU, Bing *et al.* Gastric cancer: Classification, histology and application of molecular pathology. **Journal of Gastrointestinal Oncology**, v. 3, n. 3, p. 251–261, set. 2012.

HU, Yunfeng *et al.* LINC00641/miR-582-5p mediate oxaliplatin resistance by activating autophagy in gastric adenocarcinoma. **Scientific Reports**, v. 10, p. 14981, 11 set. 2020.

HVORECNY, Kelli L. *et al.* Human PRPS1 filaments stabilize allosteric sites to regulate activity. **Nature structural & molecular biology**, v. 30, n. 3, p. 391–402, mar. 2023.

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: 15 out. 2025.

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: 15 out. 2025.

ITO, Yuri *et al.* Determinant Factors on Differences in Survival for Gastric Cancer Between the United States and Japan Using Nationwide Databases. **Journal of Epidemiology**, v. 31, n. 4, p. 241–248, 5 abr. 2021.

J. SEDANO, Melina *et al.* Hypoxanthine Phosphoribosyl Transferase 1 Is Upregulated, Predicts Clinical Outcome and Controls Gene Expression in Breast Cancer. **Cancers**, v. 12, n. 6, p. 1522, jun. 2020.

JACKSON, Benjamin T.; FINLEY, Lydia W. S. Metabolic regulation of the hallmarks of stem cell biology. **Cell Stem Cell**, v. 31, n. 2, p. 161–180, 1 fev. 2024.

JOE, Natalie S. *et al.* Mebendazole prevents distant organ metastases in part by decreasing ITGβ4 expression and cancer stemness. **Breast Cancer Research**, v. 24, n. 1, p. 98, 28 dez. 2022.

JOSHI, Smita; BADGWELL, Brian D. Current Treatment and Recent Progress in Gastric Cancer. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 71, n. 3, p. 264–279, maio 2021.

KARIMI, Parisa *et al.* Gastric Cancer: Descriptive Epidemiology, Risk Factors, Screening, and Prevention. **Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology**, v. 23, n. 5, p. 700–713, maio 2014.

KIM, Heewon *et al.* Effectiveness of Gastric Cancer Screening on Gastric Cancer Incidence and Mortality in a Community-Based Prospective Cohort. **Cancer Research and Treatment**, v. 50, n. 2, p. 582–589, abr. 2018.

KIM, Sunghwan; BOLTON, Evan E. PubChem: A Large-Scale Public Chemical Database for Drug Discovery. *In: Open Access Databases and Datasets for Drug Discovery*. [S.l.]: John Wiley & Sons, Ltd, 2024. p. 39–66.

KIM, Young-II *et al.* Long-term survival after endoscopic resection versus surgery in early gastric cancers. **Endoscopy**, v. 47, n. 4, p. 293–301, abr. 2015.

- KONTOYIANNI, Maria; MCCLELLAN, Laura M.; SOKOL, Glenn S. Evaluation of Docking Performance: Comparative Data on Docking Algorithms. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, n. 3, p. 558–565, 1 jan. 2004.
- KORNBERG, A.; LIEBERMAN, I.; SIMMS, E. S. Enzymatic synthesis and properties of 5-phosphoribosylpyrophosphate. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 215, n. 1, p. 389–402, jul. 1955.
- KRAMER, Bernd; RAREY, Matthias; LENGAUER, Thomas. Evaluation of the FLEXX incremental construction algorithm for protein–ligand docking. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 37, n. 2, p. 228–241, 1999.
- KULKARNI, V. S. *et al.* Drug Repurposing: An Effective Tool in Modern Drug Discovery. **Russian Journal of Bioorganic Chemistry**, v. 49, n. 2, p. 157–166, 1 abr. 2023.
- KUNTZ, I. D. *et al.* A geometric approach to macromolecule–ligand interactions. **Journal of Molecular Biology**, v. 161, n. 2, p. 269–288, 25 out. 1982.
- LARSEN, Andrew R. *et al.* Repurposing the antihelmintic mebendazole as a hedgehog inhibitor. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 14, n. 1, p. 3–13, jan. 2015.
- LEAL, Mariana Ferreira *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.
- LI, Benshang *et al.* Negative feedback-defective PRPS1 mutants drive thiopurine resistance in relapsed childhood ALL. **Nature medicine**, v. 21, n. 6, p. 563–571, jun. 2015.
- LI, Chenwei *et al.* GEPIA2021: integrating multiple deconvolution-based analysis into GEPIA. **Nucleic Acids Research**, v. 49, n. W1, p. W242–W246, 29 maio 2021.
- LI, Leanne *et al.* Identification of DHODH as a therapeutic target in small cell lung cancer. **Science translational medicine**, v. 11, n. 517, p. eaaw7852, 6 nov. 2019.
- LI, Sheng *et al.* Crystal structure of human phosphoribosylpyrophosphate synthetase 1 reveals a novel allosteric site. **Biochemical Journal**, v. 401, n. Pt 1, p. 39–47, 1 jan. 2007.
- LI, Xiaoxiao *et al.* FOXM1 mediates resistance to docetaxel in gastric cancer via up-regulating Stathmin. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 18, n. 5, p. 811–823, maio 2014.
- LI, Zhihao *et al.* MTHFD1 Regulates Autophagy to Promote Growth and Metastasis in Colorectal Cancer via the PI3K-AKT–mTOR Signaling Pathway. **Cancer Medicine**, v. 13, n. 22, p. e70267, 2024.
- LIU, Shenping *et al.* Structures of human dihydroorotate dehydrogenase in complex with antiproliferative agents. **Structure**, v. 8, n. 1, p. 25–33, 1 jan. 2000.
- LIU, Yang; YANG, Chunzhang. Oncometabolites in Cancer: Current Understanding and Challenges. **Cancer Research**, v. 81, n. 11, p. 2820–2823, 1 jun. 2021.

LONGLEY, Daniel B.; HARKIN, D. Paul; JOHNSTON, Patrick G. 5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 5, p. 330–338, maio 2003.

LU, Yiwen *et al.* Prognostic significance and immunological role of HPRT1 in human cancers. **Biomolecules and Biomedicine**, v. 24, n. 2, p. 262–291, 1 abr. 2024.

MA, JUNLI *et al.* Lauren classification and individualized chemotherapy in gastric cancer. **Oncology Letters**, v. 11, n. 5, p. 2959–2964, maio 2016.

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

MAHADEVAN, Vishy. Anatomy of the stomach. **Surgery (Oxford)**, Oesophagus and Stomach. v. 32, n. 11, p. 571–574, 1 nov. 2014.

MALHEIROS, Sônia Valéria Pinheiro. REGULAÇÃO DO METABOLISMO CELULAR – UM RESUMO. 2006.

MANSOORI, S. *et al.* A phase 2a clinical study on the safety and efficacy of individualized dosed mebendazole in patients with advanced gastrointestinal cancer. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 8981, 26 abr. 2021.

MARCH-VILA, Eric *et al.* On the Integration of In Silico Drug Design Methods for Drug Repurposing. **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, p. 298, 2017.

MAROUN, J. *et al.* Multicenter phase II study of brequinar sodium in patients with advanced lung cancer. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 32, n. 1, p. 64–66, 1993.

MARTÍNEZ-REYES, Inmaculada; CHANDEL, Navdeep S. Cancer metabolism: looking forward. **Nature Reviews Cancer**, v. 21, n. 10, p. 669–680, out. 2021.

MAZUREK, Marek *et al.* Gastric Cancer: An Up-to-Date Review with New Insights into Early-Onset Gastric Cancer. **Cancers**, v. 16, n. 18, p. 3163, jan. 2024.

MECO, Daniela *et al.* Emerging Perspectives on the Antiparasitic Mebendazole as a Repurposed Drug for the Treatment of Brain Cancers. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 2, p. 1334, jan. 2023.

MENG, Xuan-Yu *et al.* Molecular Docking: A powerful approach for structure-based drug discovery. **Current computer-aided drug design**, v. 7, n. 2, p. 146–157, 1 jun. 2011.

MESQUITA, Felipe Pantoja *et al.* Small benzothiazole molecule induces apoptosis and prevents metastasis through DNA interaction and c-MYC gene suppression in diffuse-type gastric adenocarcinoma cell line. **Chemico-Biological Interactions**, v. 294, p. 118–127, 1 out. 2018.

MILLER, Donald M. *et al.* c-Myc and Cancer Metabolism. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 18, n. 20, p. 5546–5553, 15 out. 2012.

- MORAWSKA, Katarzyna *et al.* 5-FU therapeutic drug monitoring as a valuable option to reduce toxicity in patients with gastrointestinal cancer. **Oncotarget**, v. 9, n. 14, p. 11559–11571, 20 fev. 2018.
- MUKHOPADHYAY, Tapas *et al.* Mebendazole Elicits a Potent Antitumor Effect on Human Cancer Cell Lines Both in Vitro and in Vivo<sup>1</sup>. **Clinical Cancer Research**, v. 8, n. 9, p. 2963–2969, 1 set. 2002.
- MULLARD, Asher. 2013 FDA drug approvals. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 13, n. 2, p. 85–89, 1 fev. 2014.
- MULLEN, Nicholas J.; SINGH, Pankaj K. Nucleotide metabolism: a pan-cancer metabolic dependency. **Nature Reviews Cancer**, v. 23, n. 5, p. 275–294, maio 2023.
- NAGARAJAN, Arvindhan; MALVI, Parmanand; WAJAPYEE, Narendra. Oncogene-directed alterations in cancer cell metabolism. **Trends in cancer**, v. 2, n. 7, p. 365–377, jul. 2016.
- NATALE, R. *et al.* Multicenter phase II trial of brequinar sodium in patients with advanced melanoma. **Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology**, v. 3, n. 8, p. 659–660, set. 1992.
- NAVARRO, Carla *et al.* Metabolic Reprogramming in Cancer Cells: Emerging Molecular Mechanisms and Novel Therapeutic Approaches. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 6, p. 1303, 19 jun. 2022.
- NIMBALKAR, Vikram V. *et al.* Repurposing of Mebendazole as an Anticancer Agent: A Review. **Research Journal of Pharmacy and Technology**, v. 18, n. 4, p. 1619–1624, 12 abr. 2025.
- NOSENGO, Nicola. Can you teach old drugs new tricks? **Nature**, v. 534, n. 7607, p. 314–316, 1 jun. 2016.
- OHSHIMA, Kenji; MORII, Eiichi. Metabolic Reprogramming of Cancer Cells during Tumor Progression and Metastasis. **Metabolites**, v. 11, n. 1, p. 28, 2 jan. 2021.
- OKADA, Kouji *et al.* Combination of the histone deacetylase inhibitor depsipeptide and 5-fluorouracil upregulates major histocompatibility complex class II and p21 genes and activates caspase-3/7 in human colon cancer HCT-116 cells. **Oncology Reports**, v. 36, n. 4, p. 1875–1885, out. 2016.
- PAGADALA, Nataraj S.; SYED, Khajamohiddin; TUSZYNSKI, Jack. Software for molecular docking: a review. **Biophysical Reviews**, v. 9, n. 2, p. 91–102, 16 jan. 2017.
- PANTZIARKA, Pan *et al.* Repurposing Drugs in Oncology (ReDO)-mebendazole as an anti-cancer agent. **Ecancermedicalscience**, v. 8, p. 443, 2014.
- PAVLOVA, Natalya N.; THOMPSON, Craig B. THE EMERGING HALLMARKS OF CANCER METABOLISM. **Cell metabolism**, v. 23, n. 1, p. 27–47, 12 jan. 2016.

- PENG, Yanmei *et al.* POLQ inhibition attenuates the stemness and ferroptosis resistance in gastric cancer cells via downregulation of dihydroorotate dehydrogenase. **Cell Death & Disease**, v. 15, n. 4, p. 248, 4 abr. 2024.
- PETERS, G. J. *et al.* In vivo inhibition of the pyrimidine de novo enzyme dihydroorotic acid dehydrogenase by brequinar sodium (DUP-785; NSC 368390) in mice and patients. **Cancer Research**, v. 50, n. 15, p. 4644–4649, 1 ago. 1990.
- PETERS, G. J. *et al.* Thymidylate synthase inhibition after administration of fluorouracil with or without leucovorin in colon cancer patients: implications for treatment with fluorouracil. **Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 12, n. 10, p. 2035–2042, out. 1994.
- PETERSEN, Jakeb S. S. M.; BAIRD, Sarah K. Treatment of breast and colon cancer cell lines with anti-helminthic benzimidazoles mebendazole or albendazole results in selective apoptotic cell death. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 147, n. 10, p. 2945–2953, 20 jun. 2021.
- PIMENTEL, Andréa Maia; ROCHA, Raquel; SANTANA, Genoile Oliveira. Crohn's disease of esophagus, stomach and duodenum. **World Journal of Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics**, v. 10, n. 2, p. 35–49, 7 mar. 2019.
- PINTO, Laine Celestino *et al.* The anthelmintic drug mebendazole inhibits growth, migration and invasion in gastric cancer cell model. **Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA**, v. 29, n. 8, p. 2038–2044, dez. 2015.
- PINZI, Luca; BISI, Nicolò; RASTELLI, Giulio. How drug repurposing can advance drug discovery: challenges and opportunities. **Frontiers in Drug Discovery**, v. 4, 20 ago. 2024.
- POZZI, Cecilia *et al.* Structural Comparison of Enterococcus faecalis and Human Thymidylate Synthase Complexes with the Substrate dUMP and Its Analogue FdUMP Provides Hints about Enzyme Conformational Variabilities. **Molecules**, v. 24, n. 7, p. 1257, jan. 2019.
- QIU, Miao-Zhen *et al.* Tislelizumab plus chemotherapy versus placebo plus chemotherapy as first line treatment for advanced gastric or gastro-oesophageal junction adenocarcinoma: RATIONALE-305 randomised, double blind, phase 3 trial. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 385, p. e078876, 28 maio 2024.
- RAHMAN, Lambratu *et al.* Thymidylate synthase as an oncogene: a novel role for an essential DNA synthesis enzyme. **Cancer Cell**, v. 5, n. 4, p. 341–351, abr. 2004.
- RAMOS, Alisha; SADEGHI, Samira; TABATABAEIAN, Hossein. Battling Chemoresistance in Cancer: Root Causes and Strategies to Uproot Them. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 17, p. 9451, 31 ago. 2021.
- RANA, Tanha Ashok; PRAJAPATI, Akhilesh. Unleashing the potential of ferroptosis, autophagy, and mitochondrial dynamics as emerging modalities in cancer treatment. **World Journal of Clinical Oncology**, v. 16, n. 7, p. 107788, 24 jul. 2025.

- RAVAL, Keval; GANATRA, Tejas. Basics, types and applications of molecular docking: A review. **IP International Journal of Comprehensive and Advanced Pharmacology**, v. 7, n. 1, p. 12–16, 20 jul. 2025.
- RAWLA, Prashanth; BARSOUK, Adam. Epidemiology of gastric cancer: global trends, risk factors and prevention. **Przegląd Gastroenterologiczny**, v. 14, n. 1, p. 26–38, 2019.
- RIAHI-CHEBBI, Ichrak *et al.* The Phenolic compound Kaempferol overcomes 5-fluorouracil resistance in human resistant LS174 colon cancer cells. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 195, 17 jan. 2019.
- SAKAI, Makoto *et al.* Docetaxel, cisplatin, and 5-fluorouracil combination chemoradiotherapy for patients with cervical esophageal cancer: a single-center retrospective study. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 83, n. 6, p. 1121–1126, jun. 2019.
- SAKURAMOTO, Shinichi *et al.* Adjuvant chemotherapy for gastric cancer with S-1, an oral fluoropyrimidine. **The New England Journal of Medicine**, v. 357, n. 18, p. 1810–1820, 1 nov. 2007.
- SARA, Jaskanwal D. *et al.* 5-fluorouracil and cardiotoxicity: a review. **Therapeutic Advances in Medical Oncology**, v. 10, p. 1758835918780140, 18 jun. 2018.
- SASAKI, Ji-ichiro *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, nov. 2002.
- SCHMIDT, Andrea *et al.* Structures of Three Inhibitor Complexes Provide Insight into the Reaction Mechanism of the Human Methylenetetrahydrofolate Dehydrogenase/Cyclohydrolase. **Biochemistry**, v. 39, n. 21, p. 6325–6335, 1 maio 2000.
- SHI, Diana D. *et al.* Emerging roles of nucleotide metabolism in cancer. **Trends in cancer**, v. 9, n. 8, p. 624–635, ago. 2023.
- SHI, Wuxian *et al.* The 2.0 Å structure of human hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase in complex with a transition-state analog inhibitor. **Nature Structural Biology**, v. 6, n. 6, p. 588–593, jun. 1999.
- SHIM, Joong Sup; LIU, Jun O. Recent Advances in Drug Repositioning for the Discovery of New Anticancer Drugs. **International Journal of Biological Sciences**, v. 10, n. 7, p. 654–663, 10 jun. 2014.
- SHUVALOV, Oleg *et al.* Linking Metabolic Reprogramming, Plasticity and Tumor Progression. **Cancers**, v. 13, n. 4, p. 762, 12 fev. 2021.
- SILVA, Mariana Conceição. 5-FLUOROURACIL: UMA REVISÃO DA LITERATURA. **Arquivos do Mudi**, v. 26, n. 2, p. 112–125, 5 set. 2022.
- SKIBINSKI, Christine G.; WILLIAMSON, Tara; RIGGINS, Gregory 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, dez. 2018.

SMALLEY, Stephen R. *et al.* Updated Analysis of SWOG-Directed Intergroup Study 0116: A Phase III Trial of Adjuvant Radiochemotherapy Versus Observation After Curative Gastric Cancer Resection. **Journal of Clinical Oncology**, v. 30, n. 19, p. 2327–2333, 1 jul. 2012.

SMYTH, Elizabeth C. *et al.* Gastric cancer. **The Lancet**, v. 396, n. 10251, p. 635–648, 29 ago. 2020.

SONG, Bomi *et al.* Repurposing of Benzimidazole Anthelmintic Drugs as Cancer Therapeutics. **Cancers**, v. 14, n. 19, p. 4601, jan. 2022.

SONG, Qingxuan; MERAJVER, Sofia D.; LI, Jun Z. Cancer classification in the genomic era: five contemporary problems. **Human Genomics**, v. 9, p. 27, 19 out. 2015.

SOYBEL, David I. Anatomy and Physiology of the Stomach. **Surgical Clinics**, v. 85, n. 5, p. 875–894, 1 out. 2005.

SULEIMAN, Hadil *et al.* Harnessing nucleotide metabolism and immunity in cancer: a tumour microenvironment perspective. **The FEBS Journal**, v. 292, n. 9, p. 2155–2172, 2025.

SUN, Yongyan *et al.* Energy metabolic dysfunction as a carcinogenic factor in cancer cells. **Clinical and Translational Medicine**, v. 5, p. 14, 6 abr. 2016.

SUNG, So Jung *et al.* Autophagy Is a Potential Target for Enhancing the Anti-Angiogenic Effect of Mebendazole in Endothelial Cells. **Biomolecules & Therapeutics**, v. 27, n. 1, p. 117–125, 1 jan. 2019.

TAIRA, M. *et al.* Tissue-differential expression of two distinct genes for phosphoribosyl pyrophosphate synthetase and existence of the testis-specific transcript. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 1007, n. 2, p. 203–208, 1 mar. 1989.

TANG, Zefang *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, 3 jul. 2017.

TEDESCHI, Philip M. *et al.* Mitochondrial Methylene Tetrahydrofolate Dehydrogenase (MTHFD2) Overexpression is Associated with Tumor Cell Proliferation and is a Novel Target for Drug Development. **Molecular cancer research : MCR**, v. 13, n. 10, p. 1361–1366, out. 2015.

THRIFT, Aaron P.; WENKER, Theresa Nguyen; EL-SERAG, Hashem B. Global burden of gastric cancer: epidemiological trends, risk factors, screening and prevention. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 20, n. 5, p. 338–349, maio 2023.

TOWNSEND, Michelle H.; ROBISON, Richard A.; O'NEILL, Kim L. A review of HPRT and its emerging role in cancer. **Medical Oncology**, v. 35, n. 6, p. 89, 5 maio 2018.

TRAUT, T. W. Physiological concentrations of purines and pyrimidines. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 140, n. 1, p. 1–22, 9 nov. 1994.

TROTT, Oleg; OLSON, Arthur J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading. **Journal of computational chemistry**, v. 31, n. 2, p. 455–461, 30 jan. 2010.

URBA, S. *et al.* Multicenter phase II trial of brequinar sodium in patients with advanced squamous-cell carcinoma of the head and neck. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 31, n. 2, p. 167–169, 1992.

VANDER HEIDEN, Matthew G.; CANTLEY, Lewis C.; THOMPSON, Craig B. Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. **Science (New York, N.Y.)**, v. 324, n. 5930, p. 1029–1033, 22 maio 2009.

VICENTE-DUEÑAS, Carolina *et al.* Function of oncogenes in cancer development: a changing paradigm. **The EMBO Journal**, v. 32, n. 11, p. 1502–1513, 29 maio 2013.

VOGELSTEIN, Bert *et al.* Cancer Genome Landscapes. **Science (New York, N.Y.)**, v. 339, n. 6127, p. 1546–1558, 29 mar. 2013.

WANG, Xiaofeng *et al.* Cisplatin resistance in gastric cancer cells is involved with GPR30-mediated epithelial-mesenchymal transition. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 24, n. 6, p. 3625–3633, mar. 2020.

WARD, Patrick S.; THOMPSON, Craig B. Metabolic Reprogramming: A Cancer Hallmark Even Warburg Did Not Anticipate. **Cancer Cell**, v. 21, n. 3, p. 297–308, 20 mar. 2012.

WILLIAMSON, Tara *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, 18 out. 2016.

WILSON, Rickesha L.; STEVENSON, Christina E. Chapter 56 - Anatomy and Physiology of the Stomach. *In*: YEO, Charles J. (Org.). **Shackelford's Surgery of the Alimentary Tract, 2 Volume Set (Eighth Edition)**. Philadelphia: Elsevier, 2019. p. 634–646.

XIA, Ying *et al.* Drug repurposing for cancer therapy. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 9, n. 1, p. 92, 19 abr. 2024.

XIONG, Guohang *et al.* NRF2-directed PRPS1 upregulation to promote the progression and metastasis of melanoma. **Frontiers in Immunology**, v. 13, 20 set. 2022.

XU, Zhichao *et al.* Structural variants drive context-dependent oncogene activation in cancer. **Nature**, v. 612, n. 7940, p. 564–572, dez. 2022.

YANG, Wen-Juan *et al.* Updates on global epidemiology, risk and prognostic factors of gastric cancer. **World Journal of Gastroenterology**, v. 29, n. 16, p. 2452–2468, 28 abr. 2023.

YOO, Seungyeul *et al.* **Molecular and cellular heterogeneity of gastric cancer explained by methylation-driven key regulators**. bioRxiv, , 28 jan. 2020. Disponível em: <<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.01.27.920744v1>>. Acesso em: 20 out. 2025

YOSHIDA, Go J. Metabolic reprogramming: the emerging concept and associated therapeutic strategies. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research : CR**, v. 34, p. 111, 6 out. 2015.

YU, Hua *et al.* Overexpression of MTHFD1 in hepatocellular carcinoma predicts poorer survival and recurrence. **Future Oncology**, v. 15, n. 15, p. 1771–1780, 18 abr. 2019.

ZHANG, Le *et al.* Mebendazole Potentiates Radiation Therapy in Triple-Negative Breast Cancer. **International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics**, v. 103, n. 1, p. 195–207, 1 jan. 2019.

ZHANG, Ning *et al.* 5-Fluorouracil: Mechanisms of Resistance and Reversal Strategies. **Molecules**, v. 13, n. 8, p. 1551–1569, 5 ago. 2008.

ZHAO, Jihe. Cancer Stem Cells and Chemoresistance: The Smartest Survives the Raid. **Pharmacology & therapeutics**, v. 160, p. 145–158, abr. 2016.

ZHAO, Wei *et al.* HOTAIR is a predictive and prognostic biomarker for patients with advanced gastric adenocarcinoma receiving fluorouracil and platinum combination chemotherapy. **American Journal of Translational Research**, v. 7, n. 7, p. 1295–1302, 15 jul. 2015.