



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
NÚCLEO DE PESQUISAS EM ONCOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ONCOLOGIA E  
CIÊNCIAS MÉDICAS

MARCELLI GEISSE SOUSA DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTINEOPLÁSICO DA IDARRUBICINA  
ASSOCIADA AO MEBENDAZOL EM LINHAGEM DE ADENOCARCINOMA  
GÁSTRICO METASTÁTICO**

BELÉM-PA  
2018

MARCELLI GEISSE SOUSA DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTINEOPLÁSICO DA IDARRUBICINA  
ASSOCIADA AO MEBENDAZOL EM LINHAGEM DE ADENOCARCINOMA  
GÁSTRICO METASTÁTICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Oncologia e Ciências Médicas, área de concentração: Medicina I, do Núcleo de Pesquisas em Oncologia da Universidade Federal do Pará como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Oncologia e Ciências Médicas.

Autor: Marcelli Geisse Sousa de Oliveira

Orientador: Prof. Dr. André Salim Khayat

BELÉM – PA

2018

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD  
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará  
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

---

O48a Oliveira, Marcelli Geisse Sousa de.  
Avaliação do potencial antineoplásico da idarrubicina associada ao mebendazol em linhagem de adenocarcinoma gástrico metastático / Marcelli Geisse Sousa de Oliveira. — 2018.  
98 f. : il. color.

Orientador(a): Prof. Dr. André Salim Khayat  
Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Oncologia e Ciências Médicas, Núcleo de Pesquisas em Oncologia, Universidade Federal do Pará, Belém, 2018.

1. Câncer gástrico . 2. idarrubicina. 3. mebendazol . 4. AGP01. I. Título.

CDD 571.638

---

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTINEOPLÁSICO DA IDARRUBICINA  
ASSOCIADA AO MEBENDAZOL EM LINHAGEM DE ADENOCARCINOMA  
GÁSTRICO METASTÁTICO**

Marcelli Geisse Sousa de Oliveira

Dissertação apresentado ao Programa de Pós-graduação em Oncologia e Ciências Médicas, área de concentração: Medicina I, do Núcleo de Pesquisas em Oncologia da Universidade Federal do Pará como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Oncologia e Ciências Médicas.

Aprovado em: 30 de setembro de 2018

**BANCA EXAMINADORA:**

\_\_\_\_\_ - Orientador  
Prof. Dr. André Salim Khayat  
Universidade Federal do Pará - UFPA

\_\_\_\_\_ - Membro da Banca Examinadora  
Dra. Luciana Gonçalves Quintana  
Universidade Federal do Pará - UFPA

\_\_\_\_\_ - Membro da Banca Examinadora  
Dr. Geraldo Ishak  
Universidade Federal do Pará – UFPA

\_\_\_\_\_ - Membro da Banca Examinadora  
Prof. Dra. Marta Chagas Monteiro  
Universidade Federal do Pará – UFPA

\_\_\_\_\_ - Suplente  
Prof. Dr. Marcello de Oliveira Bahia  
Universidade Federal do Pará - UFPA

## **FONTES FINANCIADORAS E INSTITUIÇÕES PARTICIPANTES**

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES

Núcleo de Pesquisas em Oncologia – NPO

Johns Hopkins Hospital (Baltimore, USA)

Laboratório de Citogenética Humana - LCH

Universidade Federal do Pará – UFPA

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço ao criador e autor da minha vida, DEUS que sempre me iluminou e me ajudou durante toda essa jornada. Me dando força, me ajudando a superar todas as dificuldades e obstáculos que a vida me apresentou. Valeu, DEUS!

Por seguinte, minha família que sempre orou e me impulsionou para galgar patamares ainda maiores, meus pais, Marilene Oliveira e Marcus Oliveira, sempre presente me instruindo e me apoiando em tudo. Ao meu esposo pela paciência, companheirismo e amor.

Aos meus avós, tios, tias, cunhada, primos, primas por todo o apoio e por sempre acreditarem em mim.

A todos meus amigos que sentiram minha falta, que me mandavam muitas mensagens perguntando “quando acaba esse negocio?” kkk. Obrigada por todo apoio.

Aos amigos que fiz no Laboratório denominados “the cellulões” Amanda, Karla, Eliel, muito obrigada mesmo por todo companheirismo, por terem me acompanhado nos almoços na tia do dedo, na Marcilene hahah etc., nos lanches da tarde ou da noite, nas horas intermináveis de experimento, enfim por todo auxílio, a presença de vocês tornou tudo isso mais divertido, obrigada pela parceria e amizade. Aos amigos do “*et al.*” Natasha, Dani, Ad, Ju, Carol, Vanessa, Ariel,... A minha amiga susy que era o socorro sempre presente kkk, quando faltava algum material. Ao estimado Rodrigo por toda ajuda.

A minha querida Luciana Q. Por sempre nos ajudar, quando precisamos de “meio, tripsina, Hanks” LUUUUUU... hahaha “o filtro já tá autoclavado?” Por sempre ser responsiva quando tínhamos alguma dúvida. Muito obrigada você é demais.

A “minha co-orientadora” Taíssa Thomaz, que foi fundamental para a realização desse trabalho, sempre me orientando, ensinando, sempre com muita paciência hehehe, mas principalmente amor e dedicação. Tentando pensar junto comigo, o que estava acontecendo com os experimentos, me ajudando nas diluições de 1:640.000 hahaha eee! Cara muito obrigada mesmo. Você foi essencial.

Por fim, ao meu orientador Andre khayat por toda paciência quando eu não entendia alguma coisa, sempre procurando outra maneira de exemplificar, por toda confiança durante essa jornada, disponibilidade e orientação. Eu só tenho a agradecer por tudo, é difícil mensurar tudo que aprendi com você esses dois anos, é e sempre será um privilégio.

Ao Núcleo de Pesquisa em Oncologia, Laboratório de Citogenética da UFPA, por terem cedido o espaço físico em alguns momentos para realização deste trabalho.

E a todos que contribuíram direta ou indiretamente com este trabalho.

Muito obrigada!

*Quanto mais me aprofundo na Ciência mais me  
aproximo de Deus. Albert Einstein*



## RESUMO

A neoplasia gástrica representa o quarto e quinto tipo de tumor com maior incidência no Brasil, em homens e mulheres, respectivamente. As terapias atuais direcionadas para esta neoplasia apresentam uma taxa de sucesso insatisfatória. Dentre as possíveis estratégias, está a utilização de inibidores específicos que auxiliem na interrupção da progressão tumoral. Neste sentido, o presente estudo avaliou o potencial antineoplásico da idarrubicina em associação ao mebendazol (MBZ) em uma linhagem celular de câncer gástrico metastático, AGP01. A idarrubicina (IDA) capaz de induzir danos ao DNA, através da intercalação entre os pares de bases, quebrando a fita de DNA e interação com a enzima topoisomerase II e o MBZ, por sua vez, atua através da despolimerização da tubulina e posterior desestruturação da função dos microtúbulos. Em vista disso, o estudo teve o intuito de realizar ensaios *in vitro* para avaliar a eficácia destas drogas isoladas e em combinação em uma linhagem estabelecida partir de uma amostra de paciente com câncer gástrico metastático. Os dados revelaram que tanto a IDA quanto o MBZ apresentaram elevada citotoxicidade na linhagem AGP01 (242nM e 300nM), sendo que a maior atividade citotóxica foi conferida na associação das substâncias com a  $CI_{50}$  de 123,8nM para IDA e 153,5nM para o MBZ. Além disso, verificou-se que ambas as substâncias isoladas e em associação retardaram o processo de migração celular 12 horas após o tratamento com IDA isolada na concentração de 121nM quando comparado o CN ( $p<0,05$ ), 12 horas após o tratamento com IDA isolada na concentração de 242nM quando comparado o CN ( $p<0,001$ ), 12 horas após o tratamento nas concentrações 123,9 nM ( $CI_{50}$  da combinação IDA) e 153,5nM ( $CI_{50}$  da combinação MBZ) quando comparado ao CN ( $p<0,05$ ). Além disso, a tanto a IDA quanto o MBZ, isolados e em associação, induziram a apoptose na linhagem AGP01 ( $p<0,001$ ). Adicionalmente, ambas as substâncias tanto isoladamente quanto em associação foram capazes de bloquear o ciclo celular, na fase S para IDA e MBZ+IDA e na fase G2/M para o MBZ. Vale ressaltar que esse é o primeiro estudo que associa a IDA ao MBZ em câncer. Ao avaliarmos os efeitos das substâncias, é de suma importância ressaltar que ao combinarmos as substâncias verificamos que a dose necessária para produzir os mesmo efeitos que as substâncias isoladas, foi reduzida pela metade. Os resultados gerados pelo presente trabalho demonstram que tanto as substâncias isoladas quanto as substâncias em associação apresentam um potencial anticâncer bastante promissor para pacientes no câncer gástrico avançado.

**Palavras-chave:** Câncer gástrico, idarrubicina, mebendazol, AGP01

## ABSTRACT

Gastric cancer represents the fourth and fifth type of tumor with the highest incidence in Brazil, in men and women respectively. Current therapies directed to this type of cancer have an unsatisfactory success rate. Among the possible strategies is the use of specific inhibitors that assist in the interruption of tumor progression. Therefore, the present study evaluated the cytotoxic potential of idarubicin in combination with mebendazole (MBZ) in a metastatic gastric cancer cell line, AGP01. Idarubicin (IDA) capable of inducing DNA damage through intercalation between base pairs, breaking the DNA strand and interacting with the enzyme topoisomerase II and MBZ, in turn, acts through depolymerization of tubulin and subsequent disruption of microtubule function. In view of this, the study aimed to perform *in vitro* tests to evaluate the efficacy of these drugs alone and in combination in a cell line established from a sample of a patients with metastatic gastric cancer. The data revealed that both IDA and MBZ showed high cytotoxicity in the AGP01 (242nM and 300nM) cell line, with the highest cytotoxic activity being conferred on the association of the substances with the  $IC_{50}$  of 123,9nM for IDA and 153,5nM for the MBZ. In addition, both isolated and associated substances delayed the cell migration process 12 hours after treatment with IDA isolated at the concentration of 121nM when compared to the negative control ( $p < 0.05$ ), 12 hours after the treatment with isolated IDA at the concentration of 242nM when compared to the negative control ( $p < 0.001$ ), 12 hours after treatment in the 123,9nM concentration ( $IC_{50}$  of the IDA combination) and 153,5nM ( $IC_{50}$  of the combination MBZ) when compared to the negative control ( $p < 0.05$ ). In addition, both IDA and MBZ, isolated and in association induced apoptosis in the AGP01 cell line ( $p < 0.001$ ). In addition, it was found that both substances, both alone and in combination, were able to block the cell cycle, in the S phase for IDA and MBZ + IDA and in the G2/M phase for MBZ. It is worth mentioning that this is the first study that associates IDA with MBZ in cancer. In assessing the effects of substances, it is of the utmost importance to note that by combining the substances we find that the dose needed to produce the same effects as the isolated substances has been halved. The results generated by the present study demonstrate that both MBZ and IDA present a very promising anticancer potential for patients with advanced gastric cancer.

**Key words:** Gastric cancer, idarubicin, mebendazole, AGP01.

## LISTA DE FIGURAS

	Páginas
<b>Fig. 1</b> - Capacidades adquiridas por uma célula cancerígena necessárias para o crescimento e progressão do tumor	17
<b>Fig. 2</b> - Anatomia do estômago. A imagem fornece mais detalhes das camadas da parede do estômago	19
<b>Fig. 3</b> - Histologia gástrica normal	20
<b>Fig. 4</b> - Combinação de T, N e M. T (extensão do tumor primário) e N (comprometimento linfonodal)	23
<b>Fig. 5</b> - Morfologia das linhagens celulares de câncer gástrico, ACP02, ACP03 e AGP01 em cultura.	29
<b>Fig. 6</b> - mecanismo de ação da idarrubicina na atividade da topoisomerase II e helicases	33
<b>Fig. 7</b> - Estrutura molecular da idarrubicina	35
<b>Fig. 8</b> - Formula molecular do MBZ	38
<b>Fig. 9</b> . Mebendazol induzindo rompimento dos microtúbulos após 14 horas de tratamento na linhagem AGP-01.	40
<b>Fig. 10</b> - Valores em percentual calculados a partir das áreas dos arranhões do ensaio de migração celular nos em 4 tempos após o tratamento com IDA e MBZ+IDA.	55
<b>Fig. 11</b> - Valores em percentual calculados a partir das áreas dos arranhões do ensaio de migração celular nos em 4 tempos após o tratamento com Mebendazol	56
<b>Fig. 12</b> - Fotografias do ensaio de migração celular após 24 horas de tratamento nas duas concentrações com idarrubicina.	57
<b>Fig. 13</b> - Fotografias do ensaio de migração celular após 24 horas de tratamento nas duas concentrações para o MBZ	58
<b>Fig. 14</b> - Fotografias do ensaio de migração celular após 24 horas de tratamento nas duas concentrações para a combinação da idarrubicina com o MBZ	59
<b>Fig. 15</b> - Avaliação do efeito da IDA e MBZ no ciclo celular da linhagem de câncer gástrico AGP01.	61

<b>Fig. 16</b> - Distribuição do ciclo celular da linhagem celular AGP-01, após o tratamento com as substâncias Idarrubicina e Mebendazol, nas concentrações isoladas e combinadas.	61
<b>Fig 17</b> - Gráfico referente ao ensaio de apoptose e viabilidade celular, demonstrando as porcentagens de células em cada fase do ciclo após o tratamento com idarrubicina	63
<b>Fig 18</b> - Gráfico referente ao ensaio de apoptose e viabilidade celular, demonstrando as porcentagens de células em cada fase do ciclo após o tratamento com mebendazol	64
<b>Fig 19</b> - Gráfico referente ao ensaio de apoptose e viabilidade celular, demonstrando as porcentagens de células em cada fase do ciclo após o tratamento com as substâncias combinadas	65
<b>Fig 20</b> - Dot plots típicos utilizados na análise dos efeitos apoptóticos da idarrubicina isolada e em associação da idarrubicina e Mebendazol.	67
<b>Fig. 21</b> - Dot plots típicos utilizados na análise dos efeitos apoptóticos do Mebendazol.	67
<b>Fig. 22</b> - Ilustração de apoptose inicial quando marcadas com o anexinaV-FITC e IP e analisadas por microscópio de fluorescência	68
<b>Fig. 23</b> - Ilustração de apoptose tardia quando marcadas com o anexinaV-FITC e IP e analisadas por microscópio de fluorescência.	68

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1: Classificação do TNM patológico (WASHINGTON, 2010).	24
Tabela 2: Grupamento por estadios (WASHINGTON, 2010).	25
Tabela 3 - Linhagem celular utilizada no presente trabalho.	45
Tabela 4 - DMEM (Dulbecco's modified Eagle's médium), foram utilizados:	45
Tabela 5 - Solução de PBS 10x (dez vezes)	46
Tabela 6 - Tripsina	46
Tabela 7 – Atividade citotóxica da ida e mbz isoladamente e em associação em uma linhagem de câncer gástrico.	53

**LISTA DE ABREVIATURAS**

ACP02	Adenocarcinoma gástrico paraense 02
ACP03	Adenocarcinoma gástrico paraense 03
AGP01	Ascite gástrica paraense 01
AJCC	Comitê Americano de Câncer
ANOVA	Análise de variância
AP1	Complexo adaptador 1 (AP-1)
ATP	adenosina trifosfato
CG	Câncer gástrico
CI50	Concentração capaz de inibir 50 % da atividade
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNR	Daunorrubicina
DOX	Doxirrubicina
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELK1	Regulador c-fos-proto-oncogene
FADD	Proteína associada domínio de morte
FAS/Apo-1/ CD95	Receptor de morte celular
Hh	Via de sinalização Hedgehog
HIPEC	Quimioterapia intraperitoneal hipertérmica
IDA	Idarrubicina
I $\kappa$ B $\alpha$	Inibidor do fator nuclear Kappa B cinase
INCA	Instituto Nacional do Câncer
MA	Ascite maligna
MAX	<i>MYC-ASSOCIATED FACTOR X</i>
MBZ	Mebendazol
MDR 1	Gene de resistência a múltiplas drogas
MTT:	Brometo de 3- (4,5-dimetilazol-2-il) -2,5-defenitetrazolio

MYC	Gene localizado no cromossomo 8, na banda 8q24.1, que codifica uma fosfoproteína nuclear
NCI	<i>National Cancer Institute</i>
NF-KB	Fator Nuclear kappa B
p53	Proteína nuclear 53Kda
PBS	Solução Salina Tamponada com Fosfato
PC	Carcinomatose Peritoneal
pM	Ausência ou presença de metástases à distância
pN	Presença de metástases para linfonodos regionais
pT	Extensão do tumor primário
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SLC47A1	membro da subfamília do transportadores
SRF	Fator de resposta do soro
STAT1 / 2	signal tradutor/ ativador da transcrição 1 e 2
TNM	Classificação de tumores malignos (do inglês Tumour, Node and Metastasis)
TRAIL	Ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF
TNF	Fator de necrose tumoral
UICC	União internacional contra o câncer
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

**SUMÁRIO**

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>15</b>
<b>1.1 Considerações Gerais</b>	<b>15</b>
<b>1.2 Câncer Gástrico</b>	<b>18</b>
1.2.1 ADENOCARCINOMA GÁSTRICO	21
1.2.2 CARCINOMATOSE PERITONEAL	26
1.2.3 LINHAGENS CELULARES DE ADENOCARCINOMA GÁSTRICO	27
1.2.4 TRATAMENTO CÂNCER GASTRICO	28
<b>1.3 Novas estratégias terapêuticas</b>	<b>30</b>
<b>1.4 Antraciclina</b>	<b>31</b>
1.4.1 IDARRUBICINA	35
<b>1.5 Mebendazol</b>	<b>38</b>
<b>2. APLICABILIDADE CLÍNICA</b>	<b>43</b>
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>44</b>
<b>3.1 Objetivo Geral</b>	<b>44</b>
<b>3.2 Objetivos Específicos</b>	<b>44</b>
<b>4. METODOLOGIA</b>	<b>45</b>
<b>4.1 Linhagens Celulares</b>	<b>45</b>
<b>4.2 Soluções</b>	<b>45</b>
<b>4.3 Cultivo Celular</b>	<b>46</b>
<b>4.4 Ensaio de citotoxicidade por MTT</b>	<b>46</b>
<b>4.5 Avaliação do Ciclo Celular por Citometria de Fluxo</b>	<b>48</b>
<b>4.6 Análise do índice de morte celular por citometria de fluxo</b>	<b>49</b>
<b>4.7 Ensaio de migração: Wound Healing</b>	<b>51</b>
<b>5. RESULTADOS</b>	<b>53</b>



<b>6. DISCUSSÃO</b>	<b>69</b>
<b>7. CONCLUSÃO</b>	<b>76</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Considerações Gerais

Com base no documento *World cancer report* (2014) da *International Agency for Research on Cancer* (IARC) da Organização Mundial da Saúde (OMS), é incontestável que o câncer se tornou um problema de saúde pública, principalmente em países em desenvolvimento, onde se espera, que nas próximas décadas, o câncer ocasiona um impacto na população, com taxas de incidências correspondendo a cerca de 80% dos 20 milhões de novos casos estimados para 2025 (INCA, 2016; JEMAL *et al.*, 2011).

O projeto Globocan/IARC, em 2018, realizou uma estimativa mundial, que apontou que dos 14 milhões de novos casos, mais de 60% ocorrem em países em desenvolvimento e dos 8 milhões de óbitos, cerca de 70% ocorrem nestes mesmos países, sendo as taxas de sobrevivência insatisfatórias, devido ao diagnóstico tardio e ao acesso limitado ao tratamento padrão (JEMAL *et al.*, 2011).

De acordo com o Instituto Nacional do Câncer, os tipos de câncer mais incidentes em homens serão próstata (31,7%), câncer de pulmão (8,7%), intestino (8,1%), estômago (6,3%) e cavidade oral (5,2%). Em mulheres, o câncer de mama ocupa a primeira posição com 29,5% de incidência, seguido do câncer de intestino (9,4%), colo do útero (8,1%), pulmão (6,2%) e tireoide (4,0%) (INCA, 2018).

A base genética para o câncer foi definida através da descoberta de mutações que produzem oncogenes com ganho de função e genes supressores de tumor com a perda de função; esta hipótese foi baseada em resultados experimentais de pacientes com câncer colorretal e inspirado por modelos propostos por Armitage e Doll, Nowell, Knudson e outros (BISHOP E WEINBERG, 1996; VOGELSTEIN e KINZLER. 2015).

O câncer decorre do crescimento desordenado de células, com o potencial de invadir tecidos e órgãos, levando a formações de tumores ou neoplasias malignas. A carcinogênese designa-se por uma sequência de eventos que ocorre em múltiplas etapas, ocasionadas por alterações genéticas e epigenéticas, que conferem à célula um potencial proliferativo

exacerbado, entre outras características que estão associadas ao fenótipo maligno (WEINBERG, 2008; HANAHAN e WEINBERG, 2011).

De acordo com Vogelstein e Kinzler (2015), uma célula tumoral se desenvolve a partir de três amplas fases: 1) fase de avanço, onde uma célula adquire uma mutação em um “*driver gene*” (consiste em um gene decisivo para o início da proliferação de células tumorais). 2) fase de expansão, é conduzida por uma segunda mutação em um “*driver gene*” que permite que a célula se prolifere no seu ambiente local apesar das baixas concentrações de fatores de crescimento, nutrientes, oxigênio e adequado contato célula-célula e 3) fase de invasão, a mutação que inicia a fase de avanço é frequentemente muito específica – um número limitado de vias reguladoras do crescimento parece ser capaz de iniciar neoplasia em um dado tipo celular. De acordo com a progressão do tumor, esta especificidade parece ser progressivamente perdida, então um número maior de “*driver gene*” pode transformar uma célula da fase de expansão para a fase de invasão.

O desencadeamento destas modificações no câncer pode ser por diversos fatores, sejam eles extrínsecos como tabaco, radiações, produtos químicos ou agentes infecciosos, como por fatores intrínsecos como mutações genéticas hereditárias, mutações aleatórias ou hormônios. Estes fatores podem agir mutualmente, em que um pode potencializar o outro, iniciando ou promovendo o desenvolvimento de neoplasias (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2009; INCA, 2017).

Tomasetti *et al.* (2017), realizaram um estudo em 17 tipos de câncer em 69 países em todo o mundo e destacaram um terceiro fator que pode estar envolvido no desenvolvimento do câncer, eles descreveram o papel proeminente das mutações replicativas (R), as quais são destacadas como erros inevitáveis que estão associados à replicação do DNA. Descobriram que uma parte substancial das mutações em “*genes drives*” do câncer, são de fato ocasionadas por fatores replicativos. Existem relatos que cerca de três mutações ocorrem cada vez que um célula-tronco normalmente se divide (TOMASETTI *et al.* 2013; LYNCH M. 2010). Mutações no DNA parecem surgir por quatro fontes: 1) efeitos quânticos no emparelhamento de bases (KIMSEY *et al.*, 2015), 2) erros cometidos pela polimerase (KUNKEL, 2009), 3) desaminação hidrolítica das bases (FROMME & VERDINE, 2004) e 4) danos por espécies reativas de oxigênio produzidas endogenamente ou por outros metabólitos (COLLINS, 2005).

Estas mutações ocasionam fenômenos fenotípicos que promovem as transformações celulares e patológicas. Neste sentido, Foulds (1954), descreveu uma revisão sobre análises patológicas em órgãos de ratos nos quais verificou-se uma série de lesões que parecem representar passos intermediários em um processo através do qual as células evoluem progressivamente da normalidade por meio de uma série de estados pré-malignos em cânceres invasivos.

De acordo com Hanahan e Weinberg (2011), essas modificações/alterações celulares (*Hallmarks*) que levam a formação de um tumor maligno podem ser descritas como: 1) manutenção da sinalização proliferativa, 2) insensibilidade a sinais antiproliferativos, 3) escape da destruição pelo sistema imune, 4) capacidade replicativa ilimitada, 5) inflamação promovida pelo tumor, 6) invasão e metástase, 7) indução da angiogênese, 8) instabilidade genômica, 9) resistência à morte celular e 10) desregulação do metabolismo energético celular (Figura 1). Desta forma, a inibição ou reversão destas falhas podem ser importantes estratégias para combater o processo carcinogênico.

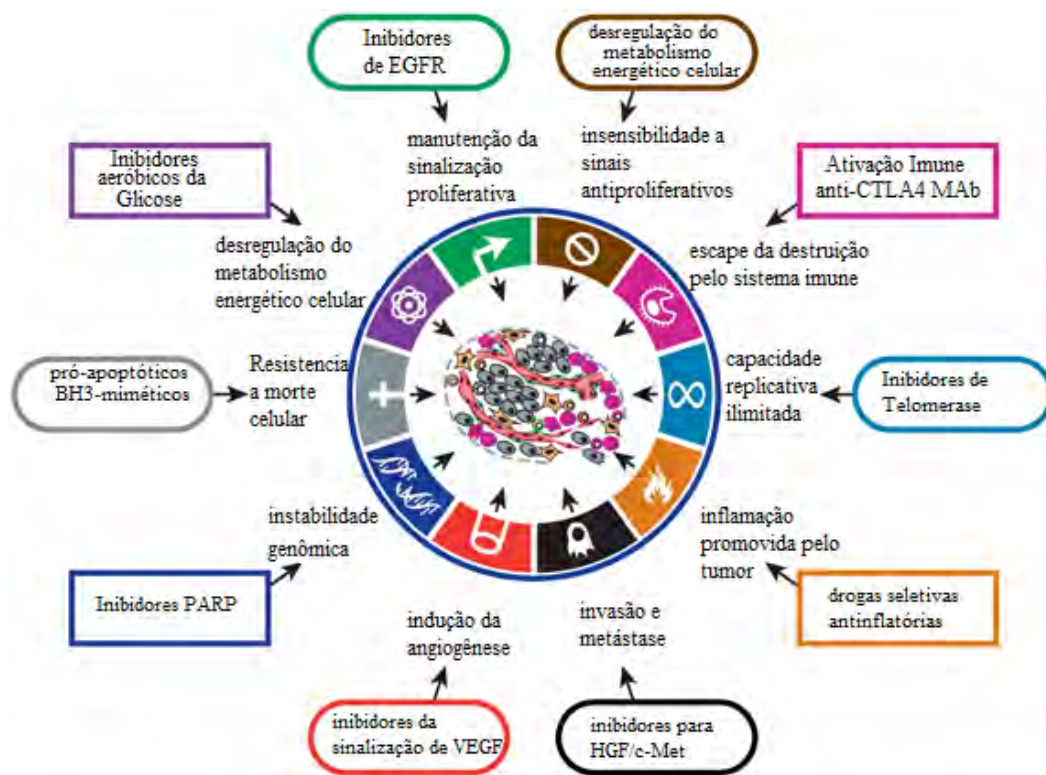


Fig. 1 - Capacidades adquiridas por uma célula cancerígena necessárias para o crescimento e progressão do tumor (Adaptado de: HANAHAN e WEINBERG, 2011).

Vale ressaltar que a ordem com que esses eventos acontecem pode ser bastante variável, dependendo do tipo de câncer. Em certos tumores, uma determinada lesão genética pode conferir à célula duas ou mais capacidades simultâneas, diminuindo o número de etapas necessárias para completar a tumorigênese. A exemplo, destaca-se a perda de função do gene supressor de tumor *TP53*, o qual pode favorecer tanto a resistência à apoptose quanto a angiogênese, assim como conceder características de instabilidade genômica (HANAHAN e WEINBERG, 2000).

Em certos tipos tumorais, uma determinada capacidade pode ser desencadeada através da simultânea alteração genética de dois ou mais genes, aumentando o número necessário para a progressão tumoral. Isto reforça a importância da implementação de inibidores tumorais que abranjam um maior número de marcadores celulares, com a finalidade de suprimir mais eficazmente a progressão tumoral (HANAHAN e WEINBERG, 2000).

Com base no exposto é indiscutível que o câncer é um importante problema de saúde pública e apesar dos inúmeros esforços as medidas de erradicação e controle da doença avançada permanecem ainda indefinidas (JEMAL et al., 2011). Em vista disto, o presente estudo visou avaliar a eficácia de drogas, que tem demonstrado resultados promissores, em um dos cinco tipos de cânceres mais incidentes em todo mundo, o câncer gástrico.

## 1.2 Câncer Gástrico

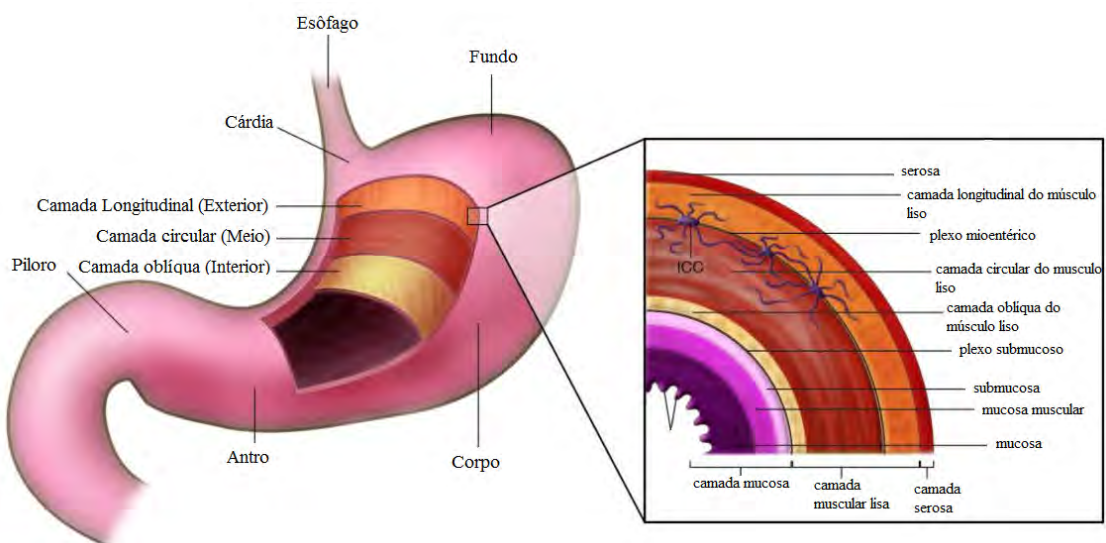
O câncer gástrico representa a quarta neoplasia com maior frequência em todo mundo e em relação à mortalidade, para ambos os sexos, é a terceira causa em nível mundial, com 723 mil mortes, 8,8% do total (INCA, 2018; KONTUREK *et al.*, 2009).

O Instituto Nacional de Câncer (INCA) realizou uma estimativa que para cada ano do biênio 2018/2019 sejam diagnosticados 21.290 novos casos de câncer de estômago, sendo 13.540 em homens e 7.750 em mulheres, no Brasil. Esses valores correspondem a um risco estimado de 13,11 casos novos a cada 100 mil homens e 7,32 para cada 100 mil mulheres. Este tipo de câncer é o quarto mais incidentes em homens e o sexto em mulheres. Verificou-se também que na Região Norte o câncer de estômago é o segundo (12,35/100 mil) mais frequente em homens e o sétimo (5,34/100 mil) em mulheres (INCA, 2018).

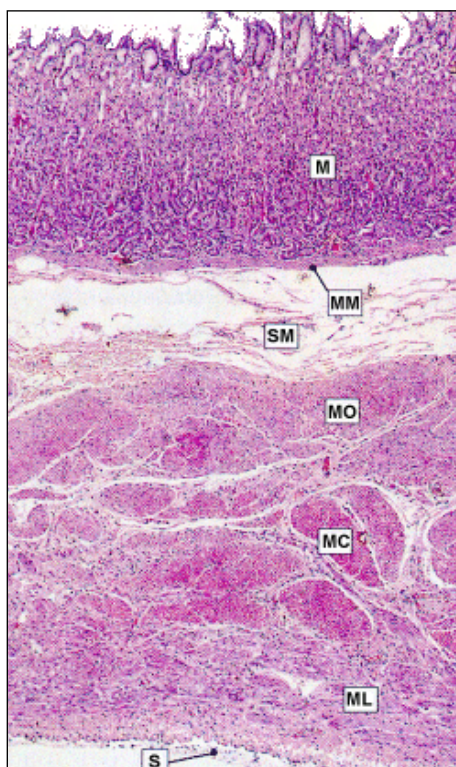
O câncer gástrico tem maior predominância em indivíduos com idade acima de 30 anos; então, a medida que a população envelhece o pico de incidência aumenta rapidamente e constantemente, atingindo os grupos etários mais velhos, tanto em homens como em mulheres (HAMILTON e ALTONEN, 2000).

O câncer gástrico pode iniciar em qualquer parte do estômago e atingir diferentes camadas de tecidos, sendo assim podem ocorrer tipos diferentes de câncer no estômago (INCA, 2014; SHANG, 2005).

Histologicamente, o estômago é constituído por quatro camadas: mucosa, submucosa, muscular e serosa (SOBIN *et al.*, 2004) (Figuras 2 e 3). A camada muscular, por sua vez, é subdividida em muscular oblíqua, muscular circular e muscular longitudinal (Figura 2 e 3) (SOBIN *et al.*, 2004). Anatomicamente, o estômago tem início na junção gastroesofágica e estende-se até o piloro. A cárdia é a parte proximal, localizada logo abaixo do diafragma. Em seguida encontram-se o fundo e o corpo, seguido pela porção distal conhecida como antro, terminando no piloro, responsável por controlar o fluxo de alimento do estômago para o duodeno (Figura 2) (AJCC, 2010). Alguns estudos mostraram que as neoplasias que ocorrem na cárdia, fundo e corpo compartilham características que os diferenciam dos casos que ocorrem no antro, como o tamanho do tumor, aspecto macroscópico, invasão venosa, profundidade da penetração parietal, metástases nodais e o estágio pTNM (PINTO-DE-SOUSA *et al.*, 2001).



**Fig. 2** - Anatomia do estômago. A imagem fornece mais detalhes das camadas da parede do estômago (Adaptado de: COFFEY *et al.*, 2007).



**Fig. 3** - Histologia gástrica normal: M – Mucosa (MM – muscular da mucosa); SM – Submucosa; MO, MC e ML – Musculares oblíqua, circular e longitudinal, respectivamente; S – Serosa (UL, 2017).

A neoplasia gástrica apresenta-se predominantemente de três tipos histológicos, adenocarcinoma, tumor originado na camada mucosa (responsável por 95% dos tumores), linfoma (diagnosticado em cerca de 3% dos casos) e leiomiossarcoma, iniciado em tecidos que dão origem aos músculos (SHANG, 2005).

Diversas alterações genéticas acontecem para ativar a transformação de uma mucosa gástrica normal para um carcinoma gástrico. Entretanto, processos inflamatórios na mucosa gástrica têm sido relatados como um passo primordial para a carcinogênese gástrica. A infecção por *Helicobacter pylori* compreende a causa mais fortemente associada ao aumento no risco para o desenvolvimento de câncer de estômago. Entre os demais fatores ambientais estão, dieta, principalmente pelo elevado uso de sal e de comidas contendo compostos N-nitroso, obesidade, tabagismo, e fatores genéticos (PIAZUELO, 2013; AZARHOUSH *et al.*, 2008; KONTUREK *et al.*, 2009; DE MARTEL *et al.*, 2013; CHANG *et al.*, 2001; DIACONU *et al.*, 2017).

A carcinogênese gástrica é um processo lento e de várias etapas com mudanças moleculares e celulares, assim como a maioria dos tipos de câncer. Basicamente, pode ser

dividido em câncer gástrico esporádico, em que não há evidências hereditárias; e familiar, em que há forte relação com fatores genéticos herdáveis (aproximadamente 10% dos casos de câncer gástrico) (BOLAND; YURGELUN, 2017; DICKEN, *et al.* 2005).

Diversas abordagens podem ser utilizadas no intuito de buscar se conhecer as alterações quantitativas que venham a justificar o processo de carcinogênese e, em última análise, permitam a elaboração de novas estratégias de diagnóstico, de avaliação prognóstica e de novos alvos terapêuticos em neoplasias humanas (SEABRA *et al.*, 2014).

Com base nesses dados é de extrema importância ressaltar que a alta incidência de câncer gástrico em todo mundo representa um grande desafio clínico, devido a múltiplos diagnósticos em estados avançados da doença e a ausência de terapias específicas, tornando-se um problema de saúde pública (MINCIS, 2011; PIAZUELO, 2013).

### 1.2.1 ADENOCARCINOMA GÁSTRICO

Piso *et al.*, (2000) mostraram que, entre os pacientes que tinham diagnóstico histologicamente confirmado de câncer gástrico, o adenocarcinoma (tumor originado na camada mucosa) foi o tipo histológico mais comum.

Em estágios iniciais, o adenocarcinoma é assintomático ou apresenta sintomas inespecíficos, e em recorrência disto, a patologia gástrica é muitas vezes diagnosticada em estágios avançados ou metastáticos. À medida que o tumor se torna mais extenso, pode desenvolver-se um desconforto abdominal superior insidioso, que pode variar entre uma sensação de saciedade pós-prandial precoce e uma dor grave e permanente. Outras formas de apresentação habituais são a anorexia, náuseas e vômitos, estando a disfagia associada a tumores da cárdia (ROUKOS, D.H.; AGNANTIS, N.J., 2002).

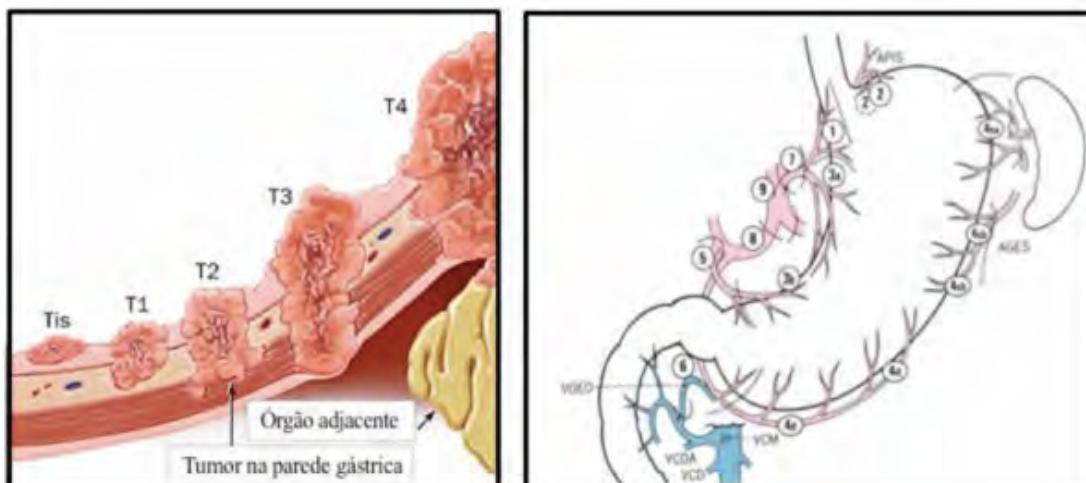
A classificação histológica de Laurén divide os adenocarcinomas de estômago em dois tipos: intestinal e difuso, sendo o tipo difuso o mais frequente (CREW e NEUGUT, 2006; WU *et al.*, 2006; ZHENG *et al.*, 2007). O tipo intestinal apresenta um padrão de crescimento expansivo, células com núcleos grandes e irregulares e uma coesão celular que favorece a formação de estruturas tubulares do tipo glandular, tendo maior predominância em homens e em grupos de idade avançada, sendo mais frequente na localização proximal do que distal (NOMURA, 1996; PISO *et al.*, 2000). Por outro lado, o tipo difuso é constituído de pequenas



células não coesas, infiltrando-se difusamente na parede gástrica com pouca ou nenhuma formação glandular, podendo apresentar células com núcleos periféricos (anel de sinete) devido à elevada produção de mucina (ESPEJO e NAVARRETE, 2003; HAMILTON e ALTONEN, 2000). O tipo difuso é pouco diferenciado, tem prognóstico ruim, apresenta-se em forma de tumores maiores (WU *et al.*, 2006)

Existem diferenças significativas no aparecimento dos tipos de adenocarcinoma gástrico difuso e intestinal. Geralmente o tipo difuso não apresenta lesões pré-neoplásicas evidentes e está geralmente associado a fatores hereditários (CÉSAR *et al.*, 2002), enquanto que o tipo intestinal é precedido de lesões pré-neoplásicas progressivas, como gastrite crônica, atrofia gástrica, metaplasia intestinal e displasia e está associado a fatores ambientais (FENOGLIO-PREISER *et al.*, 2003; KHAN e SHUKLA, 2006; ZHENG *et al.*, 2007; CÉSAR *et al.*, 2002).

Em vista disso, para um diagnóstico mais específico para o adenocarcinoma gástrico, foi realizado um sistema de classificação, estabelecido pela *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) juntamente com a *Union Internationale contre Le Cancer* (UICC), que determina os atributos patológicos, descrevendo os tumores com base na configuração microscópica e no padrão de crescimento, tais como: extensão do tumor primário (pT), ausência ou presença de metástases para linfonodos regionais (pN) e ausência ou presença de metástases à distância (pM), assim como o estadiamento desses tumores. Este sistema resulta na combinação de T, N e M em grupos específicos que irão designar a extensão anatômica do câncer (WASHINGTON, 2010; CREW e NEUGUT 2006; AJCC, 2010). Por conseguinte, o resultado do pTNM determina o estágio da doença, estando diretamente relacionado com o prognóstico do paciente (AJCC, 2010).



**Fig. 4** - Combinação de T, N e M. T (extensão do tumor primário), N (comprometimento linfonodal) e M (metástase à distância). Fonte: (JAPANESE CLASSIFICATION OF GASTRIC CARCINOMA, 2011).

A Tabela 1 demonstra a classificação dos tipos tumorais de acordo com a profundidade do tumor (em Tumor Primário), a presença e/ou ausência de linfonodos comprometidos (em Linfonodos Regionais) e a presença e/ou ausência de metástase à distância (em Metástase à Distância). Em seguida, na Tabela 2, encontra-se o estadiamento do tumor que está relacionado ao prognóstico do paciente e é resultante da combinação da classificação observada na Tabela 1 (WASHINGTON, 2010).

**Tabela 1:** Classificação do TNM patológico (WASHINGTON, 2010).

<b>pT</b>	<b>Tumor Primário</b>
TX	O tumor primário não pode ser avaliado.
T0	Não há evidência de tumor primário.
Tis	Carcinoma <i>in situ</i> : tumor intraepitelial sem invasão da lâmina própria.
T1	Tumor invade a lâmina própria, muscular da mucosa ou submucosa.
T1a	Tumor invade a lâmina própria ou muscular da mucosa.
T1b	Tumor invade a submucosa.
T2	Tumor invade a muscular própria.
T3	Tumor que invade a serosa (peritônio visceral). Tumor penetra no tecido conjuntivo subseroso sem invasão do peritônio visceral ou estruturas adjacentes. Também incluem aqueles que se estendem ao gastrocólico ou ligamentos gastrohepáticos, ou para o omento maior ou menor, sem perfuração do peritônio visceral que cobre estas estruturas.
T4	Tumor invade a serosa (peritônio visceral) ou invade estruturas adjacentes.
T4a	Tumor invade a serosa (peritônio visceral).
T4b	Tumor invade estruturas adjacentes como baço, cólon transverso, fígado, diafragma, pâncreas, parede abdominal, glândula adrenal, rim, intestino delgado e retroperitônio.
<b>pN</b>	<b>Linfonodos Regionais</b>
NX	Os linfonodos regionais não podem ser avaliados.
N0	Ausência de metástase em linfonodos regionais.
N1	Metástase em 1 a 2 linfonodos regionais.
N2	Metástase em 3 a 6 linfonodos regionais.
N3	Metástase em 7 ou mais linfonodos regionais.
<b>pM</b>	<b>Metástase à Distância</b>
MX	A metástase não pode ser avaliada.
M0	Ausência de metástase à distância.
M1	Metástase à distância.

**Tabela 2:** Grupamento por estadios (WASHINGTON, 2010).

Estadiamento	Combinações TNM		
Estadio 0	Tis	N0	M0
Estadio IA	T1	N0	M0
Estadio IB	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
Estadio IIA	T3	N0	M0
	T2	N1	M0
	T1	N2	M0
Estadio IIB	T4a	N0	M0
	T3	N1	M0
	T2	N2	M0
	T1	N3	M0
Estadio IIIA	T4a	N1	M0
	T3	N2	M0
	T2	N3	M0
Estadio IIIB	T4b	N0-1	M0
	T4a	N2	M0
	T3	N3	M0
Estadio IIIC	T4a	N3	M0
	T4b	N2-3	M0
Estadio IV	Qualquer T	Qualquer N	M1

### 1.2.2 CARCINOMATOSE PERITONEAL

Um agravante de grande relevância clínica é a presença de células neoplásicas na cavidade peritoneal. Segundo o *National Cancer Institute* (NCI) dos EUA, a carcinomatose peritoneal (PC) ou ascite maligna (MA) é definida como uma condição em que o líquido contendo células tumorais em quantidade anormal se aloja na cavidade abdominal (HAYES *et al.*, 1999; HAYES *et al.*, 1996). Este quadro constitui um estágio avançado no câncer gástrico e configura um mal prognóstico ao paciente (HAYES *et al.*, 1996).

A fisiopatologia da ascite maligna é multifatorial. Postula-se que a formação de ascite está relacionada com uma combinação de permeabilidade vascular alterada e drenagem linfática obstruída. O alto teor de proteína de ascite maligna indica que há uma alteração na permeabilidade vascular para permitir que grandes moléculas se acumulem no espaço intraperitoneal. Senger *et al.* (1983) mostraram que os vasos do revestimento peritoneal de animais experimentais com tumores de ascites foram significativamente mais permeáveis, devido à presença de um fator de permeabilidade encontrado somente em ascites tumorais.

Garrison, *et al.*, (1986) tentaram explicar a correlação entre os níveis elevados de proteínas e uma taxa de sobrevivência favorável e propuseram a hipótese que certos tumores segregam um fator que altera a permeabilidade vascular e provoca acumulação de fluido na ausência de obstrução linfática. Este fator de permeabilidade vascular, conhecido como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), é responsável por permitir um grau variável de movimento de micro e macromoléculas através do endotélio vascular, na definição de estados fisiológicos normais (NAGY *et al.*, 2008). Zebrowski colaboradores (1999), mostraram que os níveis de VEGF foram significativamente maiores em ascite maligna quando comparado com ascite não malignos.

Em decorrência disto, selecionar uma modalidade de tratamento adequada continua a ser um processo cuidadoso, que deve levar em conta os potenciais riscos e benefícios e a expectativa de vida do paciente. Após cuidadosa revisão da origem do tumor primário do paciente, biologia tumoral, estágio tumoral, status de desempenho do paciente e comorbidades, descolamento cirúrgico e quimioterapia intraperitoneal, devem ser considerados se os benefícios da terapia superam os riscos de operação porque as curvas de sobrevida podem ser estendidas e tratamento paliativo da ascite maligna sintomática podem ser alcançadas em alguns pacientes (SANGISETTY; MINER, 2012).

Até os tempos atuais os métodos de tratamentos específicos para este tipo de acometimento são limitados, sendo a cirurgia de citorredução (resseção de toda superfície peritoneal parietal e visceral invadida macroscopicamente pela neoplasia) e a técnica de quimioterapia no abdômen no intra-operatório, chamada quimioterapia intraperitoneal hipertérmica (HIPEC), sendo as técnicas aplicadas na tentativa de melhores resultados oncológicos (CHUNG e KOZUCH, 2008; RABELO et al., 2012).

Porém, os benefícios terapêuticos para pacientes acometidos com carcinomatose peritoneal não são muito favoráveis. Em suma, há uma carência de estudos randomizados que identifiquem terapias mais eficazes para essa neoplasia. Isto decorre do fato da carcinomatose peritoneal ser resistente às terapias atuais (JACQUET, *et al.*, 1996; YONEMURA, *et al.*, 1995).

Com base no exposto, é possível identificar que existe uma urgente necessidade de introduzir novos agentes terapêuticos na gestão da carcinomatose peritoneal. Em vista disso, o presente trabalho visou contribuir para o conhecimento de possíveis agentes quimioterápicos que sejam eficazes para esta neoplasia através da utilização de uma linhagem celular extraída a partir de ascite carcinomatosa.

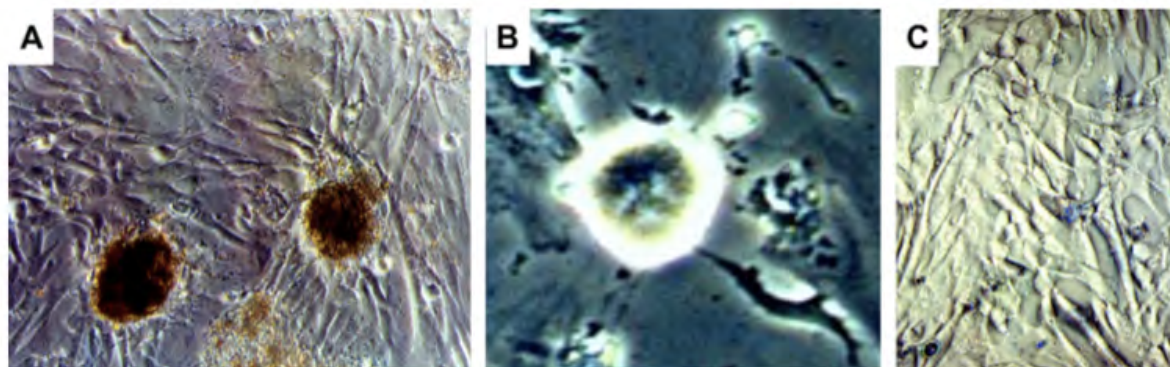
### 1.2.3 LINHAGENS CELULARES DE ADENOCARCINOMA GÁSTRICO

A cultura de linhagens celulares humanas tem gerado importantes esclarecimentos a respeito da biologia molecular do câncer, assim como elucidado o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, que visem inibir o crescimento e progressão dessas células cancerígenas (IAN, 2010).

Para reunir informações sobre a evolução desta neoplasia tem sido utilizado o estabelecimento e caracterização de linhagens celulares de câncer gástrico, uma vez que estas podem refletir em uma diversidade de fenótipos tumorais, fornecendo modelos biológicos úteis para o estudo de malignidades (RIBEIRO *et al.*, 2010). Relativamente há poucas linhagens celulares de câncer gástrico disponíveis (PARK *et al.*, 1997).

Nosso grupo de pesquisa estabeleceu e caracterizou três linhagens tumorais partir de ascite maligna (AGP01), de tumores primários de adenocarcinoma gástrico do tipo difuso (ACP02) e intestinal (ACP03) a partir de pacientes brasileiros (LEAL *et al.*, 2009).

A linhagem AGP01 (Ascite Gástrica Paraense 01), foi obtida a partir de células neoplásicas presentes em amostras da ascite carcinomatosa de adenocarcinoma gástrico de um paciente do Estado do Pará. O tumor ocupava as regiões do corpo e do antro, classificado como sendo tipo intestinal e estadiado como T3N2M1, apresentando padrão de crescimento em monocamadas com divisões alteradas. A constar, que estas são as primeiras linhagens já estabelecidas no Brasil (LEAL *et al.*, 2009).



**Fig. 5** - Morfologia das linhagens celulares de câncer gástrico, ACP02, ACP03 e AGP01 em cultura. (A) Crescimento desorganizado de camada única com algumas aglomerações (x40). (B) divisão celular bipolar (x100). (C) Crescimento desorganizado de camada única em AGP01 (x40) (LEAL *et al.*, 2009)

Observou-se, durante o desenvolvimento da cultura celular das linhagens, que elas crescem de maneira desorganizada com aglomerações e divisões heterogêneas (bipolar e multipolar), e isto contribui para instabilidade cromossômica. As linhagens celulares ACP02, ACP03, e AGP01 partilham alterações genéticas que justificam sua utilização como um modelo de carcinogênese gástrica nesta população (LEAL *et al.*, 2009). Por ser uma linhagem estabelecida a partir do maior grau de invasão do câncer gástrico, a AGP01 foi a linhagem celulares selecionada para o desenvolvimento do presente estudo.

#### 1.2.4 TRATAMENTO CÂNCER GÁSTRICO

O prognóstico do câncer de estômago varia grandemente com o estadiamento sendo a tríade de tratamento mais eficaz a cirurgia, radioterapia e quimioterapia, sendo a gastrectomia, técnica que consiste na ressecção parcial ou total do estômago e linfonodos regionais (com o intuito de evitar disseminação das células tumorais) na tentativa de modificar a história natural da doença (DICKEN *et al.*, 2005; DIKKEN *et al.*, 2012; Japanese Gastric Cancer

Association, 1998). Entretanto, somente cerca de 30 a 50% dos pacientes com esse tipo tumoral podem ser operados e mesmo para pacientes que são submetidos à ressecção total, a taxa de recorrência ainda é elevada (HEJNA *et al.*, 2006).

O tratamento mais eficaz para o cancer gástrico ainda não foi estabelecido, por este motivo que as opções terapêuticas combinadas e a sequencia de tratamento são alvos de estudos a décadas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018).

ROUGIER *et al.* (1994) demonstraram que dois terços dos pacientes que realizaram gastrectomia total e remoção de alguns linfonodos regionais apresentaram recidiva dentro de 2 a 3 anos. Com isso, a quimioterapia e a radioterapia passaram a complementar a abordagem terapêutica, com a finalidade de minimizar este problema (terapia adjuvante e neoadjuvante).

A quimioterapia representa um recurso terapêutico em casos avançados, diversos esquemas de combinações são propostos na tentativa de melhorar a sobrevida global e sobrevida livre de doença do paciente. Neste sentido, Yonemura e colaboradores (1993) mostraram que a taxa de sobrevivência dos pacientes tratados com terapia neoadjuvante (combinação dos quimioterápicos cisplatina, mitomicina C, etoposide, 5- fluorouracil) foi cerca de 2 vezes superior comparados com pacientes controle tratados sem quimioterapia após cirurgia (CUNNINGHAM *et al.*, 2006), outro esquema demonstrou benefício na sobrevida global e sobrevida livre de doença em pacientes com diversos graus de comprometimento quando comparado com cirurgia exclusiva, este inclui 6 ciclos de epirrubicina, cisplatina e fluorouracila infusional (ECF), da mesma forma outros estudos, mostraram que pacientes que realizaram a quimioterapia no perioperatório com esquemas de 2 ou 3 fármacos como fluoropirimidina (fluorouracila ou capecitabina) e fármacos derivados da platina (5FU/ cisplatina, ECX, EOX), obtiveram resultados benéficos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018). Os agentes mais utilizados no tratamento do câncer gástrico são os compostos 5-fluorouracil, cisplatina, epirrubicina e paclitaxel, geralmente usados em combinação. Entretanto, essas abordagens terapêuticas produzam repostas curtas, com taxas de sobrevida de 7 a 10 meses (HIGUCHI *et al.*, 2011).

Portanto, inquestionavelmente, há uma necessidade em adquirir novas drogas para o tratamento do câncer gástrico e novas estratégias terapêuticas com o equilíbrio entre a eficiência e as reações adversas. Já está muito bem estabelecida a gama de vias de mecanismos para as drogas anticâncer. Grande parte das vias relatadas são a da morte celular



e as envolvidas no ciclo celular, em que de forma eficiente a droga possa agir impedindo o crescimento do tumor (MANSILLA *et al.*, 2012; HASSAN *et al.*, 2014; MESQUITA, 2017).

### 1.3 Novas estratégias terapêuticas

Com base no exposto até o momento, é indiscutível que há uma necessidade emergente de implementar novos fármacos antitumorais que auxiliem no tratamento da neoplasia gástrica, tendo ação majoritária em células de câncer e baixa citotoxicidade em células não neoplásicas, com a finalidade de modificar o panorama atual, visando principalmente a redução dos índices de mortalidades ocasionados por esta doença, bem como contribuir de forma significativa para a melhora do prognóstico do paciente.

A melhoria no conhecimento da biologia do câncer tem levado a um aumento considerável no número de fármacos antineoplásicos disponíveis para o tratamento. A melhora nas taxas de sobrevida e expectativa de vida entre pacientes com câncer é o principal objetivo a ser alcançado. Neste contexto, é crucial a continuidade de estudos pré-clínicos para investigar novas combinações de medicamentos e para otimizar os esquemas utilizados para tratar o câncer no contexto clínico.

Tendo em mente que a inibição da progressão tumoral pode ser alcançada a partir do momento em que se impede a célula tumoral de adquirir alterações específicas, ou também anteriormente citadas como *Hallmarks* (pag. 17), os antineoplásicos devem abranger um maior número de alvos que possibilitem impedir a célula tumoral de adquirir alterações que confirmam a elas maior capacidade proliferativa (HANAHAN e WEINBERG, 2011). Em vista disso, o presente trabalho objetivou investigar os potenciais efeitos anticâncer da droga idarrubicina associada ao mebendazol. Determinados estudos destacam a idarrubicina em relação as demais antraciclina possui maior capacidade ligação ao DNA podendo resultar em uma mais forte indução de quebra na cadeia de DNA, possuindo também maior biodisponibilidade intracelular (LOTFI *et al.*, 2002; WIERNIK *et al.*, 1992; AML COLLABORATIVE GROUP. 1998). Enquanto o Mebendazol, interrompe a formação de microtúbulos em células da membrana basal glomerular em modelos pré-clínicos de glioblastoma multiforme (BAI *et al.*, 2011). Inibe o crescimento celular, em diferentes tipos

de câncer, a exemplo: em melanoma (DOUDICAN *et al.*, 2008); carcinoma adrenocortical (MARTARELLI *et al.*, 2008); induz a resposta apoptótica em linhas celulares de câncer do pulmão humano (MUKHOPADHYAY *et al.*, 2002). Assim como a inibe a proliferação celular e a progressão do ciclo celular e induz a apoptose em células de carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço (HNSCC) (ZHANG *et al.*, 2017). E em células de câncer gástrico, foi demonstrado que o Mebendazol inibe a invasão e migração celular (PINTO *et al.*, 2015). A partir disto, tem-se como intuito estudar estes dois fármacos, analisando seu potencial como drogas anticâncer.

#### 1.4 Antraciclinas

As antraciclinas (ANT) são membros da família das quinonas e fazem parte de uma classe de antibióticos, isoladas no início dos anos 1960 do gênero *Streptomyces*. Este grupo eficaz de drogas tem sido utilizado na oncologia a mais de 40 anos. A maioria das antraciclinas são compostos isolados de fontes naturais e antibióticos, entretanto, não possuem a especificidade dos antibióticos antimicrobianos e, portanto, produzem toxicidade significativa. Estão entre as drogas antitumorais mais importantes disponíveis, a exemplo a doxorrubicina (DOX) que é amplamente utilizada para o tratamento de vários tumores sólidos, enquanto a daunorrubicina e a idarrubicina são usadas para o tratamento de leucemias (CRIVELLARI D *et al.*, 2004; PISKA *et al.*, 2017; KARCH *et al.*, 2016).

Esta classe de drogas pode induzir a apoptose de diversas maneiras, através de uma ampla variedade de mecanismos, incluindo, intercalação ao DNA, por meio da sua porção aglicona onde pode inserir-se entre pares de bases de DNA complementares; podem sofrer redução de um ou dois elétrons e produzir compostos reativos que danificam macromoléculas e membranas lipídicas; podem inibir a atividade da topoisomerase II; podem modificar a capacidade das helicases nucleares de dissociarem a fita dupla de DNA em cadeias simples de DNA; podem induzir a apoptose, ativando o fator nuclear kappa B; e por fim, podem também utilizar vias adicionais como TRAIL, p53, e o sistema FAS/FAS ligante para produzir a apoptose em diversas linhagens de celulares ( BACHUR, *et al.*, 1992; ASHIKAWA *et al.*, 2004; LAURENT *et al.*, 2001; LORENZO *et al.*, 2002).

1. A Intercalação ao DNA envolve a inserção da porção da molécula de antraciclina entre os pares de bases de nucleótidos do DNA. O resultado final é a inibição de alongamento da cadeia de DNA.

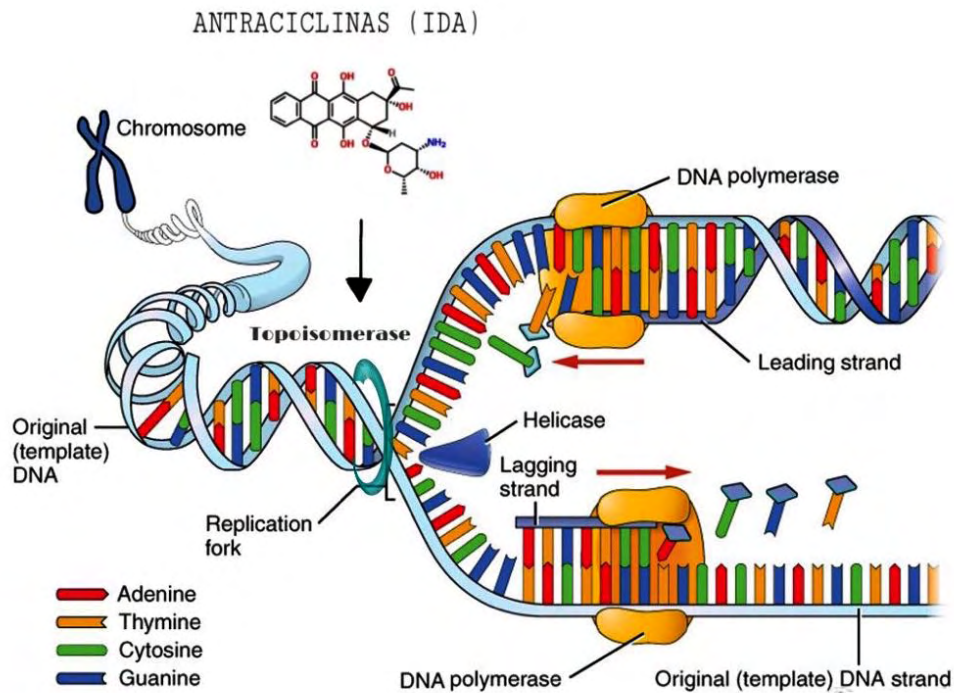
2. A principal via apoptótica de drogas anticâncer atua através da perda da integridade da membrana mitocondrial (KAUFMANN; EARNSHAW, 2000). Um aumento repentino na permeabilidade da membrana mitocondrial, chamada transição de permeabilidade mitocondrial (MPT), é um evento de coordenação central no processo apoptótico (MIGNOTTE; VAYSSIERE, 1998; DATLER *et al.*, 2014). MPT provoca a liberação de citocromo c da mitocôndria; O citocromo c então ativa as caspases efetoras para induzir a formação da escada de DNA. Espécies reativas de oxigênio (ROS), como H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e O<sub>2</sub>, causam apoptose através de MPT (KROEMER *et al.*, 1997; HAMPTON *et al.*, 1998; CHANDRA *et al.*, 2000; MIZUTANI *et al.*, 2002); algumas drogas anticâncer induzem a formação de ROS na apoptose (GEWIRTZ, 1999; MULLER *et al.*, 1998; IKEDA *et al.*, 1999; TADA-OIKAWA *et al.*, 1999; KAJIWARA *et al.*, 2001; MIZUTANI *et al.*, 2005). No entanto, o mecanismo de formação de ROS por drogas anticâncer, incluindo a DOX, ainda precisa ser esclarecido.

3. A topoisomerase II é uma enzima essencial para a replicação do DNA, condensação cromossômica e segregação cromossômica. Os inibidores da topoisomerase II são importantes drogas utilizadas na terapia de muitas neoplasias, incluindo câncer de mama, câncer de pulmão, câncer testicular, linfomas e sarcomas (HANDE, 2008; CHAMPOUX, 2001; WANG, 2002).

Os inibidores da topoisomerase II aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA) são os etoposídeo e drogas das classes das antraciclinas. Tanto os etoposídeos quanto as antraciclinas, impedem a topoisomerase II de religar o DNA clivado. As antraciclinas estabilizam este intermediário topo II / DNA que contém a fita de DNA clivado, levando ao acúmulo de quebras de fita dupla de DNA. Assim, convertem a topoisomerase II em um potente veneno que introduz altos níveis de quebras associadas à proteína no genoma das células tratadas (HANDE, *et al.*, 2008.; DARTSCH; GIESELER, 2007; WATT; HICKSON, 1994; LIU, 1989; OSHEROFF ; CORBETT; ROBINSON, 1994).

4. As helicase são enzimas responsáveis por separar as fitas de DNA. A capacidade de drogas da classe das antraciclinas de inibir a atividade das helicases está diretamente

relacionada com a inibição da topoisomerase, impedindo a clivagem enzimática da cadeia dupla de DNA, interferindo assim, com a sua replicação e transcrição (CRUZ *et al.*, 2016; TAVEIRA *et al.*, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2011).



**Fig. 6** - mecanismo de ação da idarrubicina (Antraciclina) na atividade da topoisomerase II e helicases ( FONTE: HOLLINGSHEAD LM.; FAULDS D 1991)

5. Kazuhiro *et al.* (2003) demonstraram evidências de que a ativação de NF- $\kappa$ B é essencial para os efeitos citotóxicos das antraciclinas. O NF- $\kappa$ B é um fator de transcrição nuclear onipresente que desempenha um importante papel regulador na apoptose e inflamação. Reside no estado inativo no citoplasma como um heterodímero consistindo de subunidades p50, p65 e sub-unidades de NF- $\kappa$ B (I $\kappa$ B $\alpha$ ). O heterodímero p50-p65 é retido no citoplasma pela subunidade inibitória I $\kappa$ B $\alpha$ . Na ativação do complexo, o I $\kappa$ B $\alpha$  sofre fosforilação, subsequente ubiquitinação e degradação, liberando o heterodímero p50-p65 para a translocação para o núcleo.

Pode-se especular que ROS poderia ser envolvido na ativação NF- $\kappa$ B induzida por antraciclina, uma vez que, o NF- $\kappa$ B é considerado um fator transcrição que responde ao estresse oxidativo, e, por outro lado, é conhecido que as antraciclinas podem gerar ROS (BAEUERLE,; BAICHWAL, 1997; BALDWIN JR, 1996; BEG, *et al.*, 1992; BEG, *et al.*, 1993; PAHL, 1999).

6. Como dito anteriormente as antraciclina podem utilizar vias adicionais como TRAIL, p53, e o sistema FAS/FAS ligante para produzir a apoptose em diversas linhagens de celulares. Neste sentido, Lorenzo *et al.* (2002) verificaram que as antraciclina desencadeiam um acúmulo acentuado de p53 e induziu a expressão do gene *CD95* (Fas/Apo-1) e isso pode resultar na parada do ciclo celular e a apoptose em células endoteliais da veia umbilical humana (HUVECs) (SUDA, *et al.*, 1993; ITOH *et al.*, 1991; OEHM 1992; MUZIO *et al.*, 1996; MÜLLER *et al.*, 1998; CLARKE, *et al.*, 1993).

Estudos comprovaram que, assim como outros compostos as antraciclina, aumentam a expressão de Fas e Fas-L na superfície de células leucemicas malignas, hepatocarcinoma e neuroblastoma (SINGH *et al.*, 2009; GENECARDS, 2018; FRIESEN C; KRAMMER; DEBATIN; 1996; MÜLLER, *et al.*, 1997; FULDA, *et al.*, 1997; HERR, *et al.*, 1997).

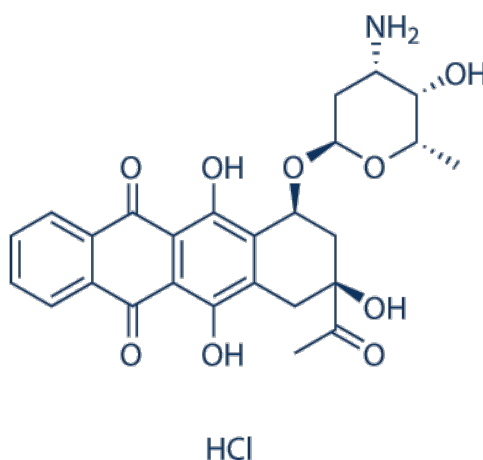
Outros investigadores demonstraram ainda , que a superexpressão de FADD facilita a apoptose induzida por drogas, enquanto que a regulação negativa de FADD diminui da sensibilidade de células de tumor à droga. Por esta razão, foi proposto que a morte celular induzida por doxorubicina (antraciclina) envolve a via Fas / FADD, sem interferir com a produção de Fas-L e que a expressão FADD pode influenciar significativamente a resposta celular a este fármaco (LAURENT; JAFFRÉZOU; 2001; MICHEAU, *et al.*, 1999).

Siegsmund, e colaboradores (1997), avaliaram que dentre as antraciclina a idarrubicina é cerca de 57,5 vezes e 25 vezes mais ativa do que a doxorubicina e a epirubicina, respectivamente. Demonstrando maiores efeito que a daunorrubicina em diversos tipo de canceres. Da mesma forma avaliariam que a Idarrubicina é capaz de ultrapassar a resistência a múltiplos fármacos mediada pela P-glicoproteína (proteína expressa na superfície celular, codificada pelo gene MDR1- resistência a múltiplas drogas - proteínas transmembranares que utilizam a energia da hidrólise ATP para remover droga ativa dentro das células).

Com base nos efeitos demonstrados em diversos tipos de câncer por essa classe especifica de drogas, o presente estudo pretende a avaliar os efeitos provocados pela idarrubicina (antraciclina melhorada) no câncer gástrico.

### 1.4.1 IDARRUBICINA

Idarrubicina é uma forma de sal cloridrato de idarrubicina, sendo um antineoplásico da classe das antraciclinas. A fórmula molecular é  $C_{26}H_{27}NO_9 \cdot HCl$  e o peso molecular é 533,96. Este agente antineoplásico é mais lipofílico do que a daunorrubicina (droga também da classe das antraciclinas) com uma absorção melhorada através da mucosa gastrointestinal (CRIVELLARI *et al.*, 2004).



**Fig. 7** - Estrutura molecular da idarrubicina (SELLECKCHEM, 2018)

A idarrubicina é um inibidor potencialmente eficaz sobre a proliferação de células tumorais. Especificamente o mecanismo de ação da idarrubicina parece ser similar ao das demais antraciclinas, podendo interagir com a polimerase, afetar a regulação da expressão genica e produzir danos causados por radicais livres ao DNA. Incluindo também: intercalação (entre os pares de bases) resultando na quebra da fita de DNA, interação com a enzima topoisomerase II, produzindo quebras na fita de DNA que não podem ser reparadas pela ligase, resultando em inibição do alongamento da cadeia de DNA. A idarrubicina também induz a remoção de histonas da cromatina, que desregula a resposta ao dano ao DNA. Neste sentido a idarrubicina, possui um efeito antitumoral contra uma amplo gama de tumores, enxertados ou espontâneos (DRUGBANK, 2018; CRIVELLARI *et al.*, 2004; BINASCHI *et al.*, 1997; GEWIRTZ, 1999; JENSEN *et al.*, 1993 ; PANG *et al.*, 2013).

Por ser mais lipofílico que as demais antraclinas a idarrubicina possui a maior biodisponibilidade intracelular, acredita-se que devido a isto a idarrubicina apresenta efeito melhorado em células de cancer, possuindo também maior capacidade de ligação ao DNA resultando em uma mais forte indução de quebra na cadeia de DNA (LOTFI *et al.*, 2002; WIERNIK, *et al.*, 1992; AML COLLABORATIVE GROUP. 1998; FUKUSHIMA *et al.*, 1993).

Sua farmacocinética consiste na administração por via intravenosa em pacientes que apresentam funções renal e hepática normais, sendo eliminada da circulação sanguínea com um tempo de meia vida plasmático que varia entre 11 e 25 horas. A idarrubicina produz um metabolismo ativo chamado de idarrubicinol, este é eliminado mais lentamente com um tempo entre 41 e 69 horas. Sua excreção ocorre por via biliar ou renal, na maior parte na forma de idarrubicinol. Alguns estudos demonstram que em pacientes com leucemia o pico das concentrações da idarrubicina e idarrubicinol nas células é alcançado em alguns minutos após sua administração, tais concentrações são cem vezes maiores do que as concentrações plasmáticas. É de suma importância ressaltar que como todo quimioterápico a idarrubicina em altas doses pode provocar efeitos adversos clinicamente relevantes, dentre eles podemos ressaltar - A cardiotoxicidade que pode se manifestar por eventos iniciais (isto é, agudos) ou tardios (isto é, retardados); Toxicidade hematológica; estomatite geralmente aparece no início do tratamento com o fármaco; e outros (HOSPIRA, 2016).

Devido a isto ressaltamos que a combinação de fármacos é uma estratégia extremamente relevante, uma vez que, pode-se reduzir a concentração administrada de agentes tóxicos, mantendo seus efeitos, desta forma destacamos a combinação da idarrubicina um agente potencialmente eficaz, porém capaz de provocar toxicidade com o Mebendazol que tem-se demonstrado benéfico em esquemas de associação, principalmente por não provocar efeitos adversos clinicamente relevantes.

Diversos estudos como o de Lotfi *et al.* (2002) compararam a idarrubicina (IDA) e a daunorubicina (DNR; antraciclina de primeira geração), em relação à citotoxicidade, indução de apoptose e mecanismos de resistência em linhagens de células leucêmicas humanas. Notou-se que a IDA era pelo menos duas vezes mais potente que DNR nas linhas celulares MOLT-4, HL60, CEM e K562. Em cerca de 8 h a IDA induziu aproximadamente 20% a apoptose, enquanto que a DNR levou cerca de 22 h para atingir 20% de taxa de apoptose,

portanto, a IDA induz uma taxa de apoptose mais rápida e mais alta em comparação com o DNR.

Um estudo clínico de fase I demonstrou a atividade da idarrubicina como agente antineoplásico, a dose recomendada foi estabelecida para uso posterior em ensaios de fase II a 40 mg/m<sup>2</sup> (DAGHESTANI, *et al.*, 1985). A eficácia foi observada em leucemia não linfocítica aguda (LLNA) e em leucemia linfóide aguda (LLA) (LOWENTHAL *et al.*, 1987; MALIK *et al.*, 1989).

A IDA oral foi usada pelo *Australian Leukemia Study Group* em um estudo de fase II para pacientes idosos (idade média de 75 anos) com LLNA e síndromes mielodisplásicas se transformando em leucemia aguda (HAROUSSEAU *et al.*, 1987). Dezoito pacientes foram tratados com uma dose de 20 a 25 mg/m<sup>2</sup> por dia durante 3 dias consecutivos (nove pacientes não tratados anteriormente e nove pacientes pré-tratados). Dois dos nove pacientes não tratados obtiveram uma resposta completa e três uma resposta parcial, dando uma taxa de resposta global de 55% (CRIVELLARI *et al.*, 2004).

Da mesma forma a IDA oral, tem sido extensivamente estudada em pacientes afetados por câncer de mama metastático. Em 1995, MARTONI e colaboradores publicaram sua experiência em 25 pacientes com câncer de mama avançado moderadamente pré-tratados. A droga foi administrada a 15 mg/m<sup>2</sup> nos dias 1 a 3 a cada 3 semanas. Eles observaram uma taxa de resposta de 28% com toxicidade aceitável. Da mesma forma, LIONETTO *et al.* (1986) trataram 29 pacientes com menos de 65 anos e não previamente expostos a antraciclinas, com o mesmo esquema. Neste estudo de fase II, observou-se uma taxa de resposta de 31% (uma completa e oito respostas parciais) com uma duração mediana de 6 meses. Toxicidade aceitável foi relatada e nenhum sinal clínico de cardiotoxicidade foi observado.

Um fenótipo de resistência a múltiplas drogas (MDR) pode ser induzido pelas antraciclinas e por diferentes drogas citostáticas. Células que exibem tais fenótipo são capazes de reduzir a concentração intracelular do fármaco e esta capacidade está relacionada à superexpressão de uma família de proteínas transportadoras, glicoproteína-P (Pgp), através do efluxo dependentes de ATP, codificada pelo gene MDR1. No entanto, acredita-se que drogas que possuem maior lipofilicidade, com alta taxa de difusão intracelular, como no caso da idarrubicina, tem maior citotoxicidade em células que apresentam a glicoproteína-P,



driblando seu mecanismo de resistência (TAINTON *et al.*, 2004; CRIVELLARI *et al.*, 2004; TIDEFELT *et al.*, 1996; MARBEUF-GUEYE, C.1999; TOFFOLI, *et al.*, 1994; BORST, *et al.*, 2000; TANIGAWARA, 2000; HIGGINS, 1992).

Para demonstrar a eficácia da idarrubicina sobre linhagens celulares que apresentam resistência a múltiplas drogas, realizou-se um teste em uma linhagem celular de leucemia mielogênica crônica humana (K562) e verificou-se que houve uma expressão aumentada de MDR1 em células tratadas com danorrubicina (DNR) e verapamil (VER) (avaliado por PCR), em relação aos tratadas com idarrubicina isolada e associada com verapamil. Os resultados mostram que a IDA é mais efetiva que a DNR na indução da apoptose e que existem diferenças nos mecanismos de resistência entre as drogas (TAINTON *et al.*, 2004; LOTFI *et al.*, 2002).

## 1.5 Mebendazol

Mebendazol (MBZ), N- [6- (benzoil) -1H-benzimidazol-2-il] carbamato, é um fármaco aprovado pela os EUA *Food and Drug Administration* (FDA), está disponível como um anti-helmíntico de amplo espectro, usado para inúmeros tipos de infestações parasitárias intestinais (PINTO *et al.*, 2015; PUBCHEM, 2004).

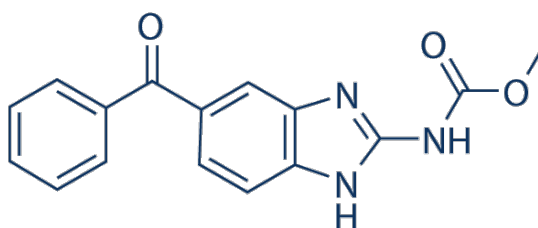


Fig. 8 - Formula molecular do mebendazol (SELLECKCHEM.COM, 2018)

Sua farmacodinâmica consiste na administração por via oral, tendo o pico de concentração plasmática entre 2 a 4 horas, por sofrer efeitos de primeira passagem. É primeiramente metabolizado pelo fígado. Produz metabólitos ativos nas formas amino e aminohidroxilada de mebendazol que encontram-se em concentrações plasmática

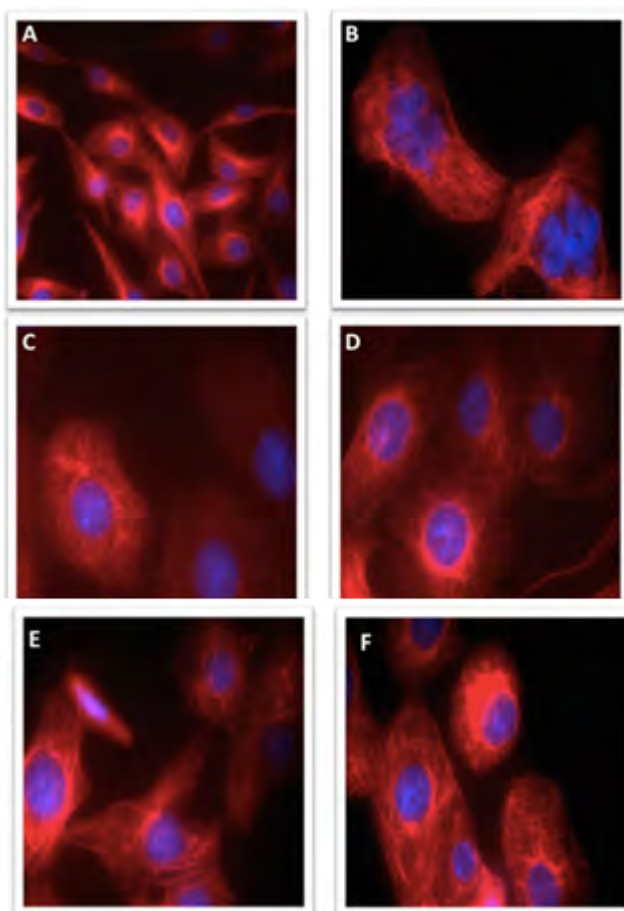
substancialmente maiores que a do mebendazol. O mebendazol, suas formas conjugadas e os seus metabólitos provavelmente sofrem algum grau de recirculação enterohepática e são excretados na urina e na bile. A meia-vida de eliminação aparente após uma administração oral varia de 3 a 6 horas na maioria dos pacientes. Os testes de toxicidade crônica em humanos revelou boa tolerabilidade e não demonstrou ser carcinogênico (MEDLEY-MEBENDAZOL).

Recentemente, o MBZ ganhou atenção substancial como um candidato para o tratamento do câncer, por não ser tóxico, mesmo quando administrados em doses elevadas e não causar efeitos colaterais característicos de outras drogas anti-microtúbulos, como os taxanos e os alcalóides da vinca ( SIMBULAN-ROSENTHAL *et al.*, 2017; MESSARITAKIS *et al.*, 1991).

O MBZ atua no parasita, despolimerizando a tubulina (alfa e beta tubulina) e causando alterações ultra-estruturais. Liga-se a subunidades de tubulina no epitélio do intestino do parasita e assim interrompe as funções dos microtúbulos, ocasionando a parada do ciclo celular, impedindo a proliferação do parasita (EL-ON, 2003; MESSARITAKIS *et al.*, 1991; MUNST *et al.*, 1980; VUTOVA *et al.*, 1999; KOHLER, 2001; MACDONALD *et al.*, 2004). Sabendo que a tubulina tem um papel fundamental na divisão celular, está tem sido implementada como alvo de câncer para várias drogas quimioterápicas, dentre elas, podemos destacar o paclitaxel, a colchicina e a vincristina (BAI *et al.*, 2011).

Pinto *et al.* (2015) demonstraram os efeitos do mebendazol sobre a formação dos microtúbulos em linhagens de cancer gástrico, utilizando a técnica de imunofluorescência indireta por marcação da  $\alpha$ -tubulina, e foi observada uma tendência à despolimerização da tubulina, provocando um rompimento da estrutura dos microtúbulos que é similar ao visto no tratamento com a colchicina (despolimerizador da tubulina) (fig. 9). Um segundo estudo realizado por BAI *et al.* (2011) demonstrou que o mebendazol (MBZ) interrompeu a polimerização de microtúbulos em células 060919 glioblastoma multiforme (GBM). Da mesma forma, verificou-se que o MBZ inibe significativamente linhagens celulares de melanoma *in vitro* e *in vivo*, acompanhado por alterações na polimerização da tubulina e fosforilação de BCL2, evitando a sua interação com Bax, promovendo assim apoptose ( DOUDICAN *et al.*, 2008).

Diversos estudos já comprovam a eficácia do MBZ na inibição do crescimento em diferentes tipos de células cancerígenas, tanto *in vitro* como *in vivo* (BAI *et al.*, 2011; DOUDICAN *et al.*, 2008; MARTARELLI *et al.*, 2008; MUKHOPADHYAY *et al.*, 2002), incluindo sua eficácia sobre a inibição da migração e da invasão celular *in vitro* e sobre formação de metástases *in vivo* (MARTARELLI *et al.*, 2008; PINTO *et al.*, 2015).



**Fig. 9.** Mebendazol induzindo rompimento dos microtúbulos após 14 horas de tratamento na linhagem AGP-01. Controle negativo 0,1  $\mu\text{M}$  (100X), E: Mebendazol 0,5  $\mu\text{M}$  (100X), F: Mebendazol 1,0  $\mu\text{M}$  (100X). (40x), B: Paclitaxel 1  $\mu\text{M}$  (100X), C: Colchicina 0,1  $\mu\text{M}$  (100X), D: Mebendazol (PINTO *et al.*, 2015).

Zhang *et al.* (2017) estimularam as ações do fármaco anti-helmíntico MBZ como um agente anti-HNSCC (anti-carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço). Seus resultados demonstraram que o MBZ exerce atividade anti-proliferativa em células HNSCC humanas, bem como atividade anticancerígena sinérgica com outros compostos anticâncer, além de inibir eficazmente a proliferação celular, a progressão do ciclo celular e a migração celular, e induzir apoptose de células HNSCC.

O MBZ mostrou-se eficaz na redução da atividade da MMP-2 (metaloproteinase de matriz extracelular) na linhagem AGP01, sugerindo a sua ação na inibição da invasão das células cancerosas *in vitro* (PINTO *et al.*, 2015).

Além disso, demonstrou-se que o MBZ pode modular as vias associadas ao câncer, dentre elas: VEGFR-2, ELK1 / SRF, AP1, STAT1 / 2, MYC / MAX (ZHANG *et al.* 2017; BAI *et al.*, 2011; PINTO *et al.*, 2015; NYGREN; FRYKNÄS; AGERUP; LARSSON, 2013).

DAKSHANAMURTHY *et al.* (2012), por meio de ensaios pre clínicos, comprovaram que o MBZ interfere na atividade de VEGFR2 (receptor vascular de fator de crescimento endotelial 2) por competição pelo ATP (BAI RY *et al.*, 2015).

Pinto e colaboradores (2015), também verificaram que o nível de expressão de RNAm de ABCB1 (resistência a múltiplos fármacos de proteína 1 - MDR-1) e ABCC1 (resistência a múltiplos fármacos associada a proteína 1 - MRP1) - (proteínas transmembranares que utilizam a energia da hidrólise ATP para remover droga ativa dentro das células) encontravam-se significativamente diminuído quando tratados com 1,0 µM de MBZ quando comparado com o controle negativo, assim como SLC47A1 (membro da subfamília do transportadores - responsável pela secreção de drogas através das membranas) encontrava-se extremamente diminuído para todas as concentrações testadas de MBZ. Tais resultados sugerem que o MBZ tem o potencial de desempenhar um papel importantíssimo na inibição da expressão do gene MDR em células de ascite maligna (GENECARDS, 2018).

Um estudo demonstrou que o MBZ inibiu potencialmente a sinalização de Hh (via de sinalização Hedgehog) e retardou o crescimento de células de meduloblastoma humano, por meio da diminuição da expressão de efetores da via Hh e inibição da formação de cílios, consequentemente provocando a inibição da proliferação celular e morte celular em linhagens de meduloblastoma (LARSEN *et al.*, 2015).

Mukhopadhyay e colaboradores (2002) mostraram um aumento no citocromo *c* no citoplasma após tratamento com MBZ, de forma dose-dependente. Adicionalmente, vinte e quatro horas após o tratamento foram detectados a ativação de caspase-9 e caspase-8, demonstrando que o após o tratamento com mebendazol ativa a cascata de morte celular programada.

Estudo clínicos também tem relatado a eficácia do MBZ sobre diversos tipos de câncer. Dentre eles, pode-se destacar um estudo clínico que comprovou a eficácia do MBZ

como monoterapia anticâncer, através de um relato de caso de um paciente com carcinoma adrenocortical, em que o tratamento com MBZ inicialmente provocou regressão das metástases. Enquanto recebia o mebendazol como um único tratamento durante 19 meses, a doença manteve-se estável, sem efeitos colaterais clinicamente significativos. O paciente posteriormente progrediu após 24 meses de monoterapia com mebendazol (DOBROSOTSKAYA, *et al.*, 2011).

Em detrimento disto e sabendo que o câncer progride por múltiplas vias, ter como alvo uma única via é geralmente insuficiente. Destaca-se com isso que a combinação de terapias alvos têm sido defendidas como uma nova abordagem para o tratamento do câncer utilizando quer inibidores multi-alvo ou combinações de agentes com único alvo. Devido a segurança clinicamente comprovada do MBZ, sugere-se que o tratamento com este medicamento em combinação com outras terapias já utilizadas podem originar um novo protocolo para inibição do crescimento células do câncer (JANSSEN, 2014; MARTARELLI *et al.*, 2008; LACEY, 1988; SAJID *et al.*, 2006; VAN DER WESTHUIZEN *et al.*, 1984).

## 2. APLICABILIDADE CLÍNICA

É indiscutível que tanto a idarrubicina quanto o mebendazol apresentam atividades citotóxicas promissoras em câncer gástrico, pois é sabido que as terapias utilizadas para esta patologia ainda são limitadas, algumas vezes apenas como tratamento paliativos. O MBZ exibe uma favorável farmacocinética, não demonstra grau de toxicidade ou efeitos adversos clinicamente relevantes. Adicionalmente, tem demonstrado atividade anticâncer em diversos estudos tanto *in vivo* quanto *in vitro*, tais como glioblastoma multiforme, melanoma, carcinoma adrenocortical, câncer de pulmão e inclusive câncer gástrico, demonstrando que esse fármaco exibe um potencial citotóxico e merece atenção e mais estudos para sua utilização como agente anticâncer (BAI *et al.*, 2011; DOUDICAN *et al.*, 2008; MARTARELLI *et al.*, 2008; MUKHOPADHYAY *et al.*, 2002).

Adicionalmente, diferentes estudos destacam a idarrubicina quando comparada com a doxorubicina apresentando maior capacidade ligação ao DNA, maior biodisponibilidade intracelular, podendo resultar em uma indução mais forte de quebra na cadeia de DNA. Experimentos *in vivo* demonstraram que pacientes que fizeram uso da idarrubicina apresentaram melhores taxas de remissão e sobrevivência em leucemia mielóide aguda. Acredita-se que seja devido a sua maior absorção intracelular (LOTFI *et al.*, 2002; WIERNIK PH. *et al.*, 1992; AML COLLABORATIVE GROUP. 1998). Neste sentido, é substancialmente promissor, associar drogas que interajam em diferentes vias, com o objetivo de obter-se um efeito potencializador e/ou sinérgico.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Avaliar a atividade antitumoral da molécula idarrubicina em associação com mebendazol na linhagem de adenocarcinoma gástrico humano metastático AGP01.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Avaliar o potencial citotóxico da idarrubicina e do mebendazol, isoladamente e em associação, na linhagem de adenocarcinoma gástrico AGP01;
- Avaliar o padrão de morte celular provocado pela idarrubicina e pelo mebendazol, isoladamente e em associação, na linhagem de adenocarcinoma gástrico AGP01;
- Avaliar o efeito da idarrubicina e do mebendazol, isoladamente e em associação, na modificação de cinética do ciclo celular na linhagem de adenocarcinoma gástrico AGP01;
- Avaliar a capacidade inibitória da idarrubicina e do mebendazol, isoladamente e em associação, na migração celular na linhagem de adenocarcinoma gástrico AGP01;

## 4. METODOLOGIA

### 4.1 Linhagens Celulares

Foi utilizada a linhagem celular de câncer gástrico AGP01, oriunda de cultura primária do fluido ascítico de adenocarcinoma gástrico já caracterizada citogeneticamente (LEAL *et al.*, 2009).

**Tabela 3** - Linhagem celular utilizada no presente trabalho.

Linhagem	Tipo Histológico	Origem	Classificação Lauren	Estadio
AGP01	Ascite maligna	Humana	Tipo Intestinal	T3N2M1

### 4.2 Soluções

As soluções utilizadas para a manutenção da linhagem celular estão descritas nas tabelas a seguir.

**Tabela 4** - DMEM (Dulbecco's modified Eagle's médium), foram utilizados:

DMEM	10 g
NaHCO <sub>3</sub>	1,2 g
Hepes	2,38 g
Penicilina	0,06 g = 99 U
Estreptomicina	0,1 g
H <sub>2</sub> O destilada	1000 mL
* O pH foi ajustado para a faixa de 7,2 a 7,4.	



**Tabela 5** - Solução de PBS 10x (dez vezes)

NaCl	8g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	21,07 g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	6 g
H <sub>2</sub> O destilada	1000 mL

**Tabela 6** - Tripsina

<b>Tripsina</b>	<b>0,125 g</b>
<b>EDTA</b>	<b>0,02 g</b>

Os componentes da tabela 5 foram misturados em 100 mL de solução de Hanks, e esta solução foi filtrada em membrana de 0,22µm, em condições estéreis.

### 4.3 Cultivo Celular

As células foram cultivadas em ambiente controlado em garrafas de cultura apropriadas para cultivo. A linhagem AGP01 foi cultivada em meio de cultura DMEM, mantidas em estufa com atmosfera em 5% de CO<sub>2</sub> à 37°C. A confluência foi acompanhada constantemente em microscópio invertido. O meio de cultura foi trocado sempre que os nutrientes foram consumidos para a manutenção das células. Para os experimentos, o meio foi desprezado, as células lavadas com PBS 1x e submetidas a tripsina para desprendê-las do fundo da garrafa.

### 4.4 Ensaio de citotoxicidade por MTT

O ensaio por MTT, é amplamente utilizado para medir a proliferação celular e rastrear drogas anticâncer, sendo apropriado para estimar a citotoxicidades das drogas. Inicialmente,

foi desenvolvido por MOSMANN em 1983, como um ensaio quantitativo *in vitro* (PESSOA *et al.*, 2000; BEZERRA *et al.*, 2005).

Este procedimento tem como base a capacidade do succinato desidrogenase, uma enzima do Ciclo de Krebs ativa em mitocôndrias de células viáveis, em converter o sal de tetrazolium (brometo de 3-(4,5-dimetilazol-2-il) -2,5-defenitetrazolio, ou MTT) em cristais de formazan, na cor roxa. O formazan é então solubilizado e a sua concentração determinada pela densidade óptica (PESSOA *et al.*, 2000; BEZERRA *et al.*, 2005).

A principal aplicação dessa técnica é avaliar a viabilidade (contagem de células) e a proliferação de células (ensaios de cultura de células), assim como pode ser utilizado para determinar a citotoxicidade de potenciais agentes medicinais e materiais tóxicos, uma vez que esses agentes estimulariam ou inibiriam a viabilidade celular e o crescimento (BERRIDGE *et al.*, 1993).

#### 4.4.1 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

As células foram semeadas em placas de 96 poços com  $3 \times 10^3$  células/poço (100  $\mu\text{L}$ /poço) e mantidas na estufa com atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$  a  $37^\circ\text{C}$  por 24 h para aderência.

As drogas idarrubicina e mebendazol foram diluídas em DMSO para solução de uso a 1 mM. A partir desta solução, realizou-se duas diluições intermediárias em DMEM para obter uma concentração de 100  $\mu\text{M}$ , a partir da qual foram realizadas diluições seriadas para a obtenção das concentrações de 10  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 2,5  $\mu\text{M}$ , 1,25  $\mu\text{M}$ , 0,625  $\mu\text{M}$  e 0,3125  $\mu\text{M}$ , que foram adicionadas na placa de 96 poços (100  $\mu\text{L}$ /poço), além do controle negativo não tratado. Todas as concentrações foram testadas em quadruplicata para a linhagem AGP01. Após um período de incubação de 72h, o sobrenadante das células foi descartado e adicionado 100  $\mu\text{L}$  de solução de MTT (0,5mg/mL de PBS) e a placa foi incubada novamente na estufa a 5% de  $\text{CO}_2$  por 3h. Em seguida, o sobrenadante foi removido e, posteriormente, foi adicionado 100  $\mu\text{L}$ /poço de DMSO e a placa foi deixada em agitação por 10 minutos, para a completa dissolução dos cristais de formazan. As placas foram lidas no espectrofotômetro de placa a um comprimento de onda de 570 nm. Da mesma forma para realizar o MTT das substâncias combinadas, foi realizado uma curva de concentração a partir dos  $\text{CI}_{50}$  das

substâncias isoladas, considerando que a mesma seria equivalente a 100%. Realizou-se o tratamento com 2 concentrações acima equivalendo a 200% e 400% e 3 concentrações abaixo equivalendo a 50%, 25% e 12,5%.

#### 4.4.2 ANÁLISE DOS DADOS

A análise de dados foi realizada através do percentual de inibição xlog da concentração, determinadas suas  $CI_{50}$  e seus respectivos intervalos de confiança (IC 95%) a partir de regressão não-linear, utilizando o programa Prisma versão 5.0 (GraphPad Software).

### 4.5 Avaliação do Ciclo Celular por Citometria de Fluxo

Alterações que ocorrem a nível de ciclo celular são comumente vistas como características de uma célula tumoral, tais alterações não só afetam os componentes do ciclo, mas também as vias de sinalização dos mecanismos de *checkpoint*. Decorrem principalmente da ativação de oncogenes e inativação de genes supressores de tumor (LOMBARDI e LASAGNI, 2016).

A citometria de fluxo aplicada no estudo de ciclo celular registra os parâmetros cinéticos da população celular, revelando o índice de DNA, aploidia, a fração de proliferação celular, e a porcentagem de células encontradas nas fases G0/G1, S e G2/M. Deste modo, indicando parâmetros uni e multivariáveis, prognósticos e possíveis rumos terapêuticos (MENEGUELO, 2007).

#### 4.5.1 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

As células foram cultivadas em placas de 6 poços numa densidade de  $1 \times 10^6$  células/poço e mantidas por 24 horas na estufa com atmosfera de 5% de  $CO_2$  a  $37^\circ C$  para a aderência. Após esse período, foi realizado o tratamento com as substâncias nas concentrações

estabelecidas 1/2  $CI_{50}$  e  $CI_{50}$  (121nM e 242nM - IDA) e (150nM e 300nM - MBZ) e concentrações combinadas (61,9nM IDA+ 76,8nM MBZ e 123,9nM IDA + 153,5nM MBZ), em triplicata por 24 horas. O controle negativo não foi tratado. Após o término do tratamento, as células foram coletadas por tripsinização e analisadas por citometria de fluxo (BD FACSVerse™) para realização da contagem, de modo que a densidade celular fique a  $1 \times 10^6$  células/eppendorf. Em seguida, as células foram lavadas com PBS 1x e centrifugadas a 800 RPM, o sobrenadante foi descartado e as células então foram fixadas com 400  $\mu$ L de álcool 80% por 60 minutos a 4°C em tubos de 1,5 mL. Ao final deste período, foram centrifugadas a 800 RPM por 5 minutos e o sobrenadante foi retirado. Posteriormente, foram lavadas com PBS 1x e incubadas em solução de RNase livre de DNA (100  $\mu$ g/mL) por 60 minutos a 37°C. No final desse tempo, o iodeto de propídeo foi adicionado diretamente na solução de RNase de modo que ficasse na concentração final de 50  $\mu$ g/mL e deixados por 60min. Dez mil eventos foram analisados por citometria de fluxo (BD FACSverse™).

#### 4.5.2 ANÁLISE DOS DADOS

Os dados foram analisados a partir da média e do erro padrão de três experimentos independentes. Para verificar a ocorrência de diferença significativa entre os grupos, os dados serão comparados por análise de variância (2way ANOVA) seguida por Teste de Bonferroni, com nível de significância de 95% ( $p < 0,05$ ) utilizando o programa Prisma versão 5.0 (GraphPad Software).

#### 4.6 Análise do índice de morte celular por citometria de fluxo

A expressão de fosfatidilserina na superfície externa da membrana é amplamente considerada como um marcador precoce de morte celular ou de necrose, sendo que esta perda de assimetria do fosfolípídeo de membrana contribui para facilitar o reconhecimento por proteínas dependente de íons cálcio, como a Anexina V (BOERSMA *et al.*, 2005; GALLUZZI *et al.*, 2012; MARTIN *et al.*, 1995).

O procedimento de detecção de apoptose e necrose por Anexina-V/7-ADD ou Anexina V-FITC/Iodeto de propídio(IP) consiste na ligação da anexina-V ou AnexinaV-FITC à fosfatidilserina, na membrana das células que estão iniciando o processo apoptótico ou necrótico, e na ligação do 7-AAD ou IP ao DNA das células no processo final da apoptose. Para detecção de apoptose e necrose foi utilizado o Kit de detecção de apoptose Anexina-V/7-AAD (BD Biosciences) de acordo com as instruções do próprio fabricante.

#### 4.6.1 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

As células foram plaqueadas em placas de 12 poços a uma densidade de  $2 \cdot 10^5$  células/poço e mantidas por 24 horas na estufa com atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$  a  $37^\circ\text{C}$  para aderência. Após este período, foi realizado o tratamento com idarrubina e mebendazol isoladamente e em combinação nas concentrações estabelecidas 1/2 do  $\text{CI}_{50}$  e  $\text{CI}_{50}$  (121nM e 242nM - IDA); (150nM e 300nM - MBZ) e concentrações combinadas (61,9nM IDA+ 76,8nM MBZ e 123,9nM IDA + 153,5nM MBZ), em triplicata por 72 horas e o controle negativo não foi tratado. Após a incubação, o sobrenadante foi coletado em um tubo de 2 mL e as células lavadas e tripsinizadas para obtenção das células aderidas, que foram adicionadas diretamente ao tubo 2 mL, onde continha o meio, em seguida o conteúdo foi centrifugado por 5 minutos a 800 rpm. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 500  $\mu\text{L}$  de PBS. Realizou-se a contagem das células de modo que houvesse uma densidade de  $10^6$  células/tubo . A quantidade de células equivalente a  $10^6$  foram adicionadas a um tubo contendo 1ml de buffer (solução tampão do kit BD Biosciences). Em seguida, 100ul foram retirados de cada amostra e adicionados a outro tubo. Posteriormente, foram adicionados 5  $\mu\text{L}$  Anexina-V e 5  $\mu\text{L}$  de 7-AAD. As células foram então incubadas em temperatura ambiente ( $25^\circ\text{C}$ ) por 15 min, e então foi realizada a aquisição dos dados em citômetro de fluxo (BD FACSVerser<sup>TM</sup>).

Para a placa que continha controle negativo mais os tratados com mebendazol, foram adicionados 5  $\mu\text{L}$  Anexina V- FITC e 5  $\mu\text{L}$  de Iodeto de propídio. As células foram então incubadas em temperatura ambiente ( $25^\circ\text{C}$ ) por 15 min, e posteriormente foi realizada à aquisição dos dados em citômetro de fluxo (BD FACSVerser<sup>TM</sup>).

Foram classificadas como células em apoptose inicial aquelas com marcação somente para Anexina-V sendo PE ou FITC, em apoptose tardia aquelas com dupla marcação de Anexina-V PE e 7-AAD ou Anexina V-FITC e IP, em necrose somente marcação para 7-ADD ou IP e células viáveis sem nenhuma marcação.

#### 4.6.2 ANÁLISE DOS DADOS

Os dados foram analisados a partir da média e do erro padrão das triplicatas. Para verificar a ocorrência de diferença significativa entre os grupos, os dados foram comparados por análise de variância (2way ANOVA) seguida por Teste de Bonferroni, com nível de significância de 95% ( $p < 0,05$ ), utilizando o programa Prisma versão 5.0 (GraphPad Software).

#### 4.7 Ensaio de migração: *Wound Healing*

O processo de migração é um evento crucial. Este processo geralmente acontece em respostas a sinais químicos, a exemplo: reparação de feridas, diferenciação celular, desenvolvimento embrionário e metástase tumoral (VICENTE-MANZANARES e HORWITZ, 2011). No câncer, esse mecanismo permite que as células neoplásicas migrem do seu local de origem para diferentes órgãos, por meio dos vasos sanguíneos e linfáticos, propiciando a disseminação neoplásica e conseqüentemente crescimento metastático (CHAMBERS *et al.*, 2002). LIANG *et al.* (2007) descreveram o ensaio migração celular *in vitro* como um método capaz de fornecer dados a respeito da capacidade de migração de modelos celulares *in vitro* de células aderentes. A técnica consiste na raspagem de uma região da monocamada celular criando um “arranhão”, provocando então uma descontinuidade na camada de células, seguida pelo acompanhamento do comportamento e captura de imagens da região “arranhada” com intervalos de tempos regulares (LIANG *et al.*, 2007). O processo de inibição da migração das células e direção a região raspada *in vitro* mimetiza a inibição do

processo de migração *in vivo* e fornece dados iniciais sobre a interferência da droga no processo metastático típico de tumores malignos (LIANG *et al.*, 2007).

#### 4.7.1 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

As células foram cultivadas em placas de 12 poços, em uma densidade de  $2 \times 10^5$  células/poço e mantidas por 24 horas (AGP01) na estufa com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C para a aderência (antes do cultivo, realizou-se uma linha reta ao fundo da placa, de modo a ter um parâmetro para as fotos nos poços). Após esse período foi feito o “arranhão” com uma ponteira de 10 µL no centro de cada poço (após o arranhão, para retirar as células soltas, foi realizada a lavagem com 500µL de meio em cada poço, em que foi retirado 500 e adicionado 500µL, de modo a evitar que o poço ficasse seco) e então foi realizado o tratamento com as substâncias nas concentrações estabelecidas 1/2 do CI<sub>50</sub> e CI<sub>50</sub> (121nM e 242nM - IDA); (150nM e 300nM - MBZ) e concentrações combinadas (61,9nM IDA+ 76,8nM MBZ e 123,9nM IDA + 153,5nM MBZ), em triplicata por 24 horas (AGP01). O controle negativo não foi tratado.

O comportamento das células foi observado e fotografado no mesmo local no tempo 0 (logo após fazer o risco seguido do tratamento) e nos tempos 6h, 12h e 24h (AGP01).

#### 4.7.2 ANÁLISE DOS DADOS

As áreas dos arranhões após o tratamento nos diferentes tempos foram quantificadas no programa Image J. Os dados foram analisados a partir da média e do erro padrão de três experimentos independentes. Para verificar a ocorrência de diferença significativa entre o controle e o tratamento nos diferentes tempos, os dados foram comparados por análise de variância (2way ANOVA) seguida por Teste de Bonferroni, com nível de significância de 95% ( $p < 0,05$ ), utilizando o programa Prisma versão 5.0 (GraphPad Software).

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Citotoxicidade in vitro

Inicialmente a idarrubicina e o mebendazol foram submetidos à avaliação da citotoxicidade (ensaio MTT 72h) utilizando a linhagem celular AGP01 e observou-se que a concentração inibitória 50% (CI<sub>50</sub>) foi de 242 nM para IDA e 300 nM para MBZ. Quando realizou-se a avaliação da citotoxicidade da associação das substâncias a partir da curva de concentração anteriormente citada na metodologia, verificou-se que a concentração inibitória 50% (CI<sub>50</sub>) reduziu cerca de 48,8% a concentração usada isoladamente, apresentando assim, uma CI<sub>50</sub> de 123,8 nM para IDA e de 153,5 nM para o MBZ, desta forma atingiu-se um IC<sub>50</sub> usando as drogas combinadas com aproximadamente metade das quantidades requeridas para alcançar um IC<sub>50</sub> quando as drogas eram usadas isoladamente. Demonstrando um efeito aditivo e/ou possivelmente sinérgico com a combinação destas.

**Tabela 7** – Atividade citotóxica da IDA e MBZ isoladamente e em associação em uma linhagem de câncer gástrico.

DROGA	IDARRUBICINA	MEBENDAZOL	ASSOCIAÇÃO IDA	ASSOCIAÇÃO MBZ
LINHAGEM	AGP01	AGP01	AGP01	AGP01
CI <sub>50</sub> (nM)	242 nM	300 nM	123,8 nM	153,53 nM

A linhagem AG-01 foi selecionada para realização dos testes seguintes, por conferir origem intestinal metastática, com o valor de CI<sub>50</sub> (242 nM e 300 nM) IDA e MBZ, respectivamente. Tais resultados demonstram que tanto o MBZ quanto a IDA podem ser potenciais candidatos na composição de estratégias terapêuticas. De forma geral, percebeu-se que ambas as drogas isoladamente apresentam um grau de citotoxicidade significativo na linhagem AGP01 e quando associadas seu grau de citotoxicidade aumenta.



## 5.2 Efeito da Idarrubicina e Mebendazol isolados e em associação na migração celular

Com a finalidade de avaliar se a IDA e o MBZ possuem atividade sobre a migração celular, foi realizado o ensaio de migração celular por cicatrização na linhagem AGP01 após 24 horas de tratamento isolado e combinado com IDA e MBZ nas concentrações estudadas (Figuras 10- 14).

Quando realizou-se o tratamento com o mebendazol) isolado, na concentração de 150nM (metade do CI50), foi observada uma diminuição na capacidade de migração no tempo de 24 horas ( $p < 0,01$ ).

Quando o tratamento foi realizado com a idarrubicina isolada, na concentração de 121nM (metade da CI50), foi observada uma diminuição na capacidade de migração das células no tempo 12 ( $p < 0,05$ ).

Porém, quando foi realizada a combinação da idarrubicina com o mebendazol, nas concentrações de 61,9nM (metade da IC50 da combinação) e 76,8nM (metade da IC50 da combinação), respectivamente, não foi observada uma diminuição significativa na capacidade de migração nos tempos 6h, 12h e 24h ( $p > 0,05$ ).

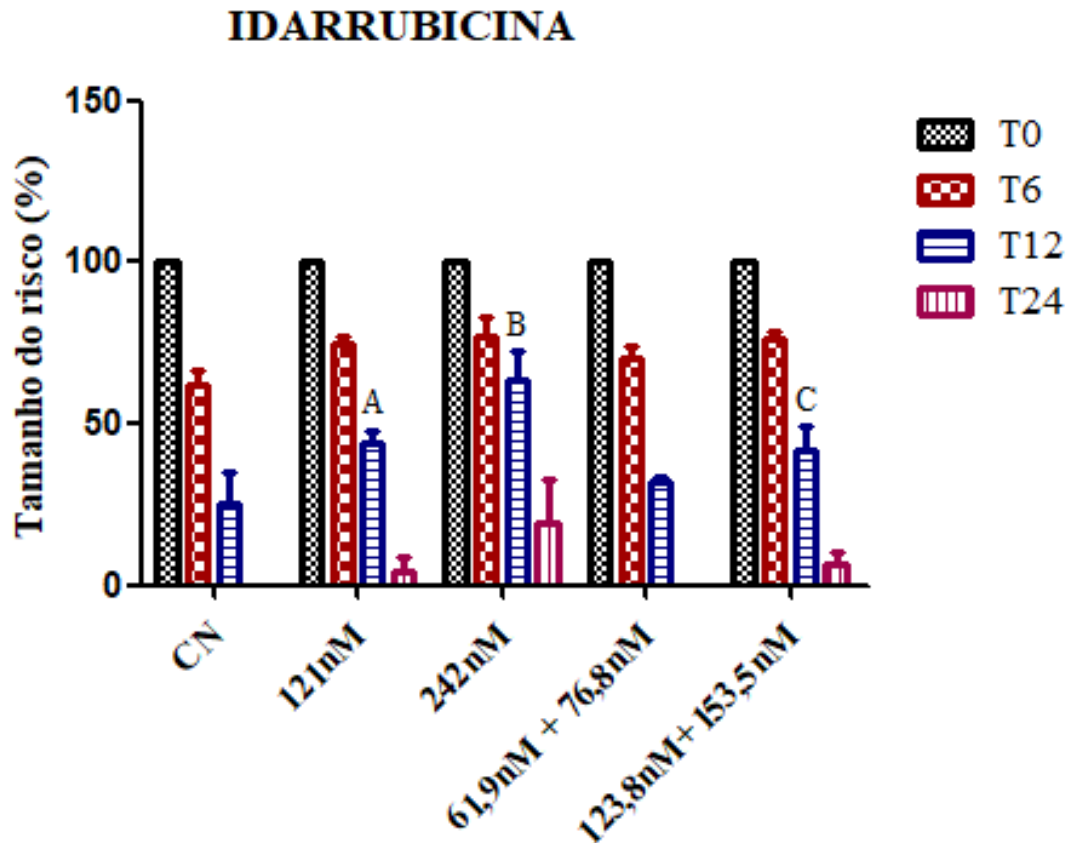
Quando realizada a análise comparativa das concentrações, isolada da idarrubicina (121nM) com a combinação das substâncias na concentração de 61,9nM de idarrubicina (IC50 da combinação IDA) e 76,8nM (IC50 da combinação MBZ) não observou-se diferença estatisticamente significativa em nenhum dos tempos testados.

Quando realizou-se o tratamento com o mebendazol isolado, na concentração de 300nM (CI50), também foi observada uma diminuição na capacidade de migração das células no tempo de 24 horas, porém de forma mais significativa ( $p < 0,001$ ), demonstrando que a inibição da migração ocorre de forma dose-dependente.

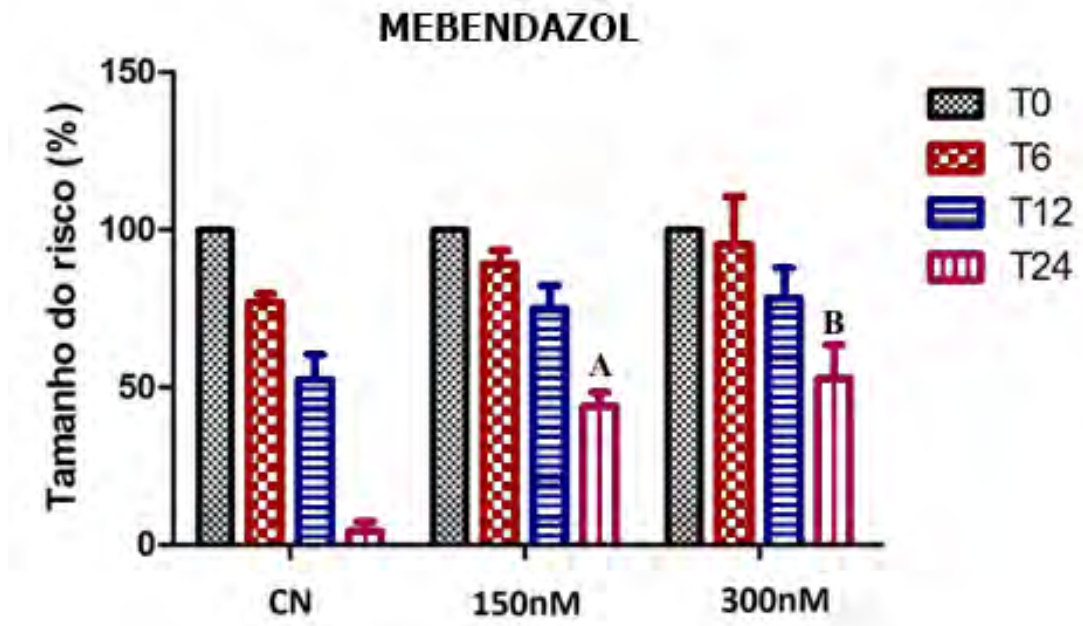
Quando o tratamento foi realizado com a idarrubicina isolada, na concentração de 242nM (CI50), também foi observada uma diminuição na capacidade de migração das células no tempo 12, porém de forma mais significativa ( $p < 0,001$ ), demonstrando que a inibição da migração ocorre de forma dose-dependente.

Quando foi realizada a combinação da idarrubicina com o mebendazol, nas concentrações de 123,8nM (IC50 da combinação) e 153,53 nM (IC50 da combinação),

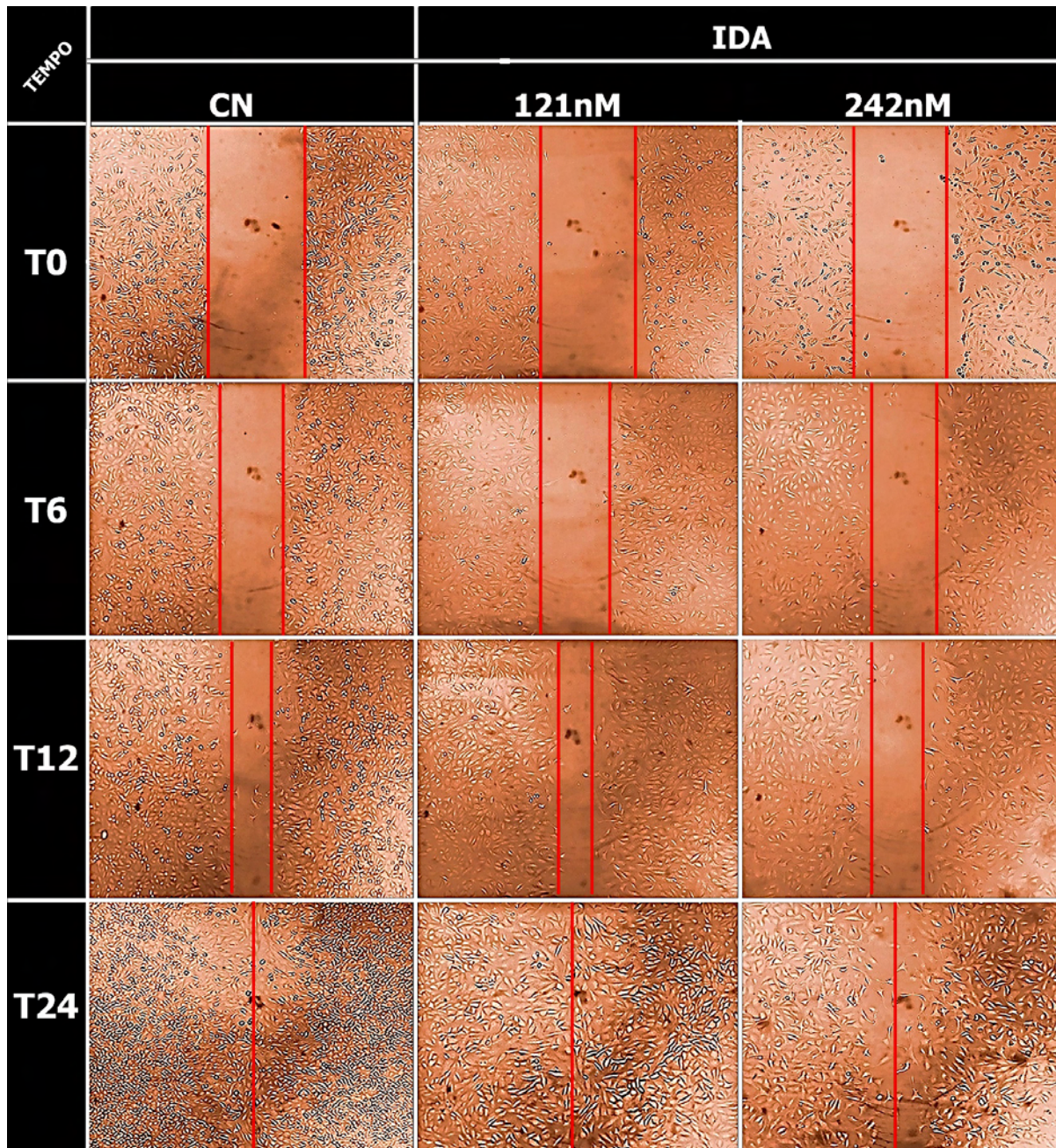
respectivamente, também foi observada uma diminuição significativa na capacidade de migração no tempo 12h ( $p < 0,05$ ), porém é importante destacar que a inibição da migração foi mais eficiente quando o tratamento foi realizado com a droga isolada ( $p < 0,001$ ), demonstrando que a utilização do MBZ não potencializou o efeito inibitório da migração observado para a droga IDA.



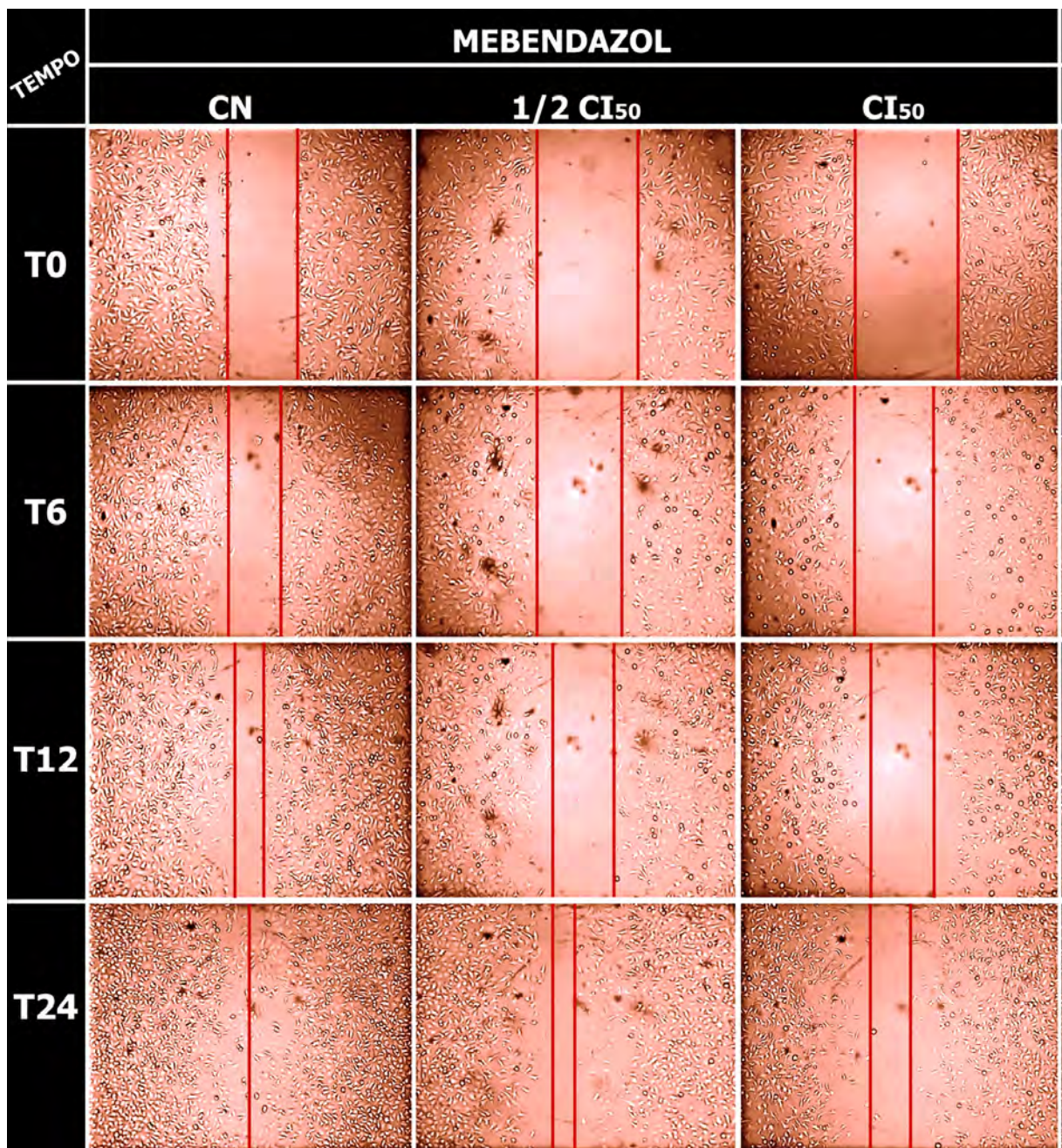
**Fig. 10** - Valores em percentual calculados a partir das áreas dos arranhões do ensaio de migração celular nos em 4 tempos após o tratamento com IDA e MBZ+IDA. A)  $p < 0,05$  12 horas após o tratamento quando comparado o controle negativo e a concentração de 121nM. B)  $p < 0,001$  12 horas após o tratamento quando comparado o controle negativo e a concentração de 242nM. C)  $P < 0,05$  quando comparado o controle negativo com a concentração 123,8nM (IC50 da combinação IDA) e 153,5nM (IC50 da combinação MBZ). Não houve diferença estatisticamente significativa entre as concentrações e os diferentes tempos. Análise de Variância (2way ANOVA).



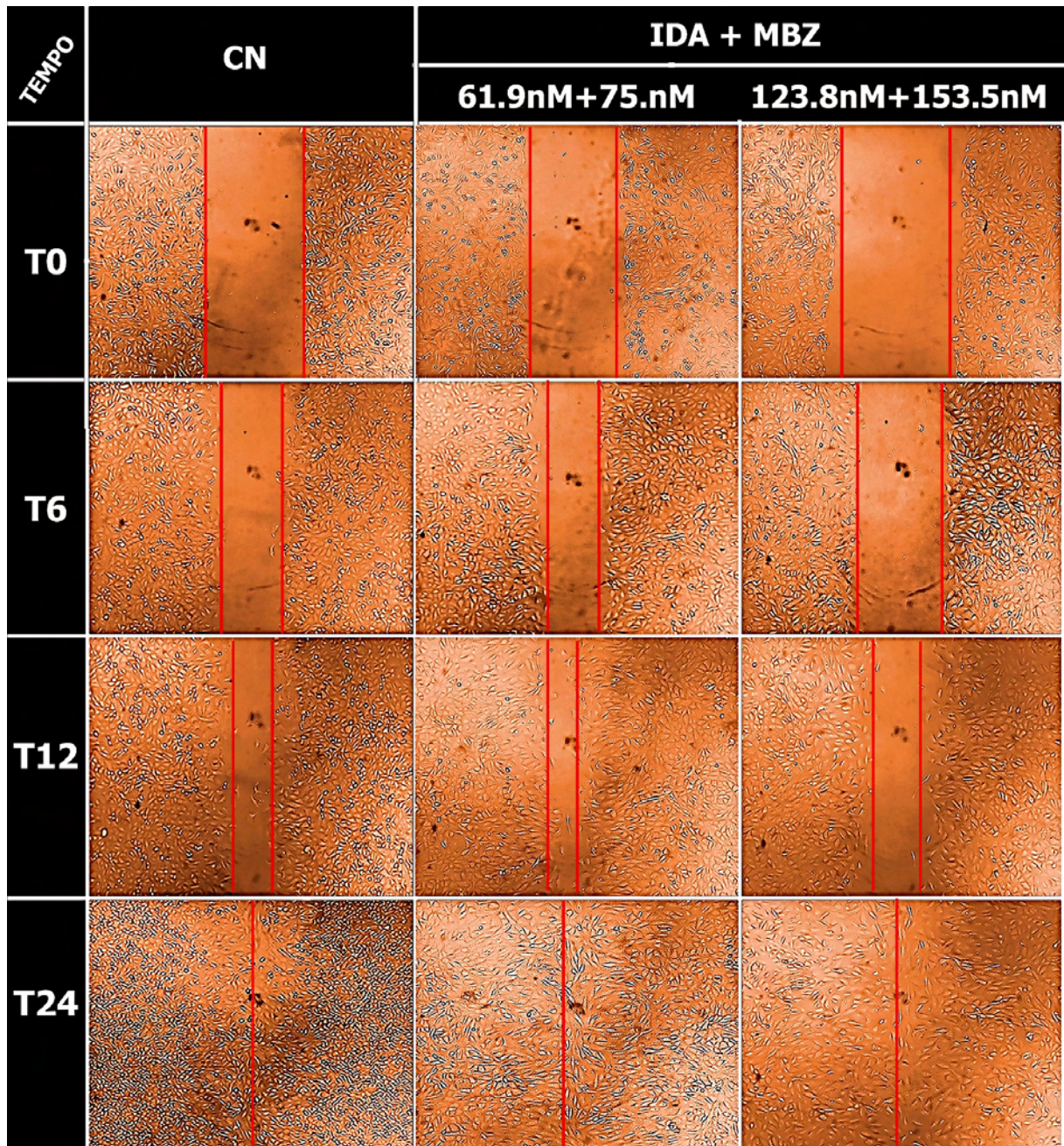
**Fig. 11** - Valores em percentual calculados a partir das áreas dos arranhões do ensaio de migração celular nos em 4 tempos após o tratamento com mebendazol. A)  $p < 0,01$  24 horas após o tratamento quando comparado o controle negativo e a concentração de 150nM. B)  $p < 0,001$  24 horas após o tratamento quando comparado o controle negativo e a concentração de 300nM (2way ANOVA).



**Fig. 12** - Fotografias do ensaio de migração celular após 24 horas de tratamento nas duas concentrações com a idarrubicina.



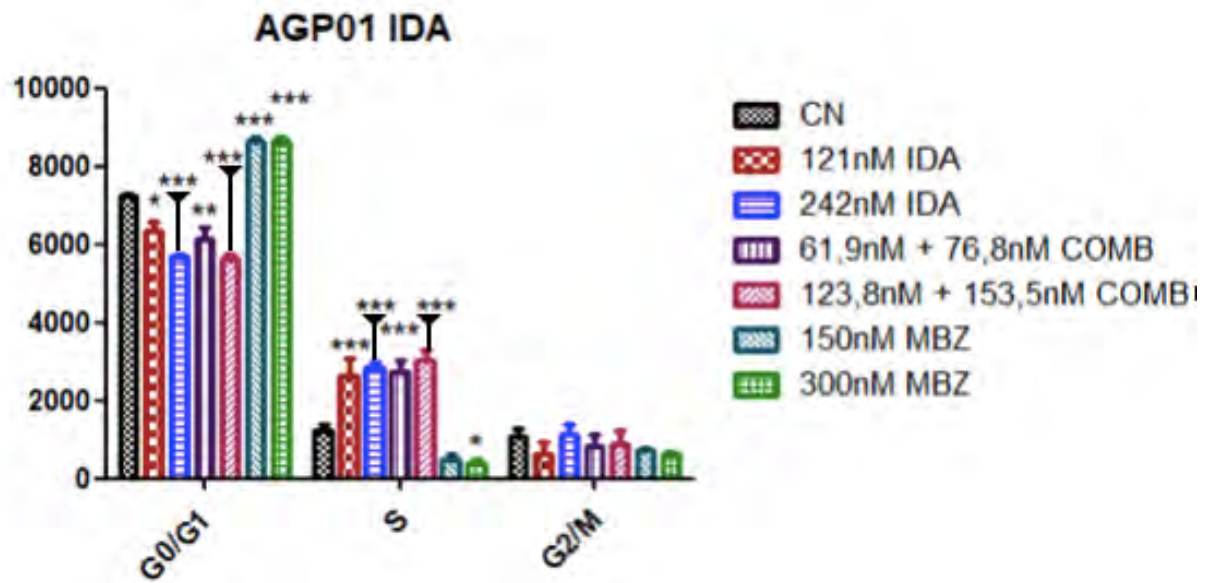
**Fig. 13** - Fotografias do ensaio de migração celular após 24 horas de tratamento nas duas concentrações para o Mebendazol.



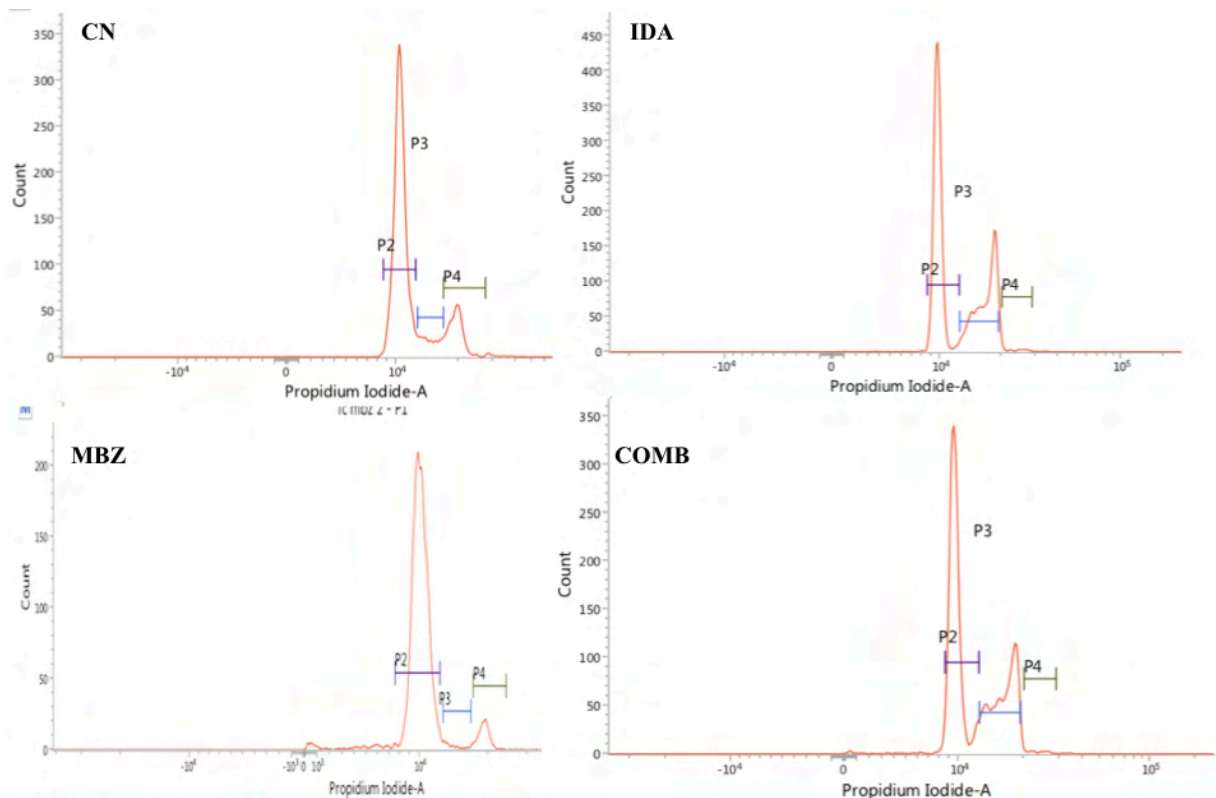
**Fig. 14** - Fotografias do ensaio de migração celular após 24 horas de tratamento nas duas concentrações para a combinação da Idarrubicina com o Mebendazol.

### **5.3 Avaliação do potencial da idarrubicina e mebendazol isolados e em combinação sobre o ciclo celular por citometria de fluxo**

Quando avaliado o efeito da idarrubicina e do mebendazol combinados e isolados sobre o ciclo celular na linhagem de ascite maligna AGP01, foi observado que ambas as substâncias foram capazes de induzir parada do ciclo celular, sendo que a idarrubicina foi capaz de induzir um bloqueio significativo ( $p < 0,001$ ) na fase S do ciclo celular nas duas concentrações testadas 121nM e 242nM (figura 15), enquanto que o mebendazol foi capaz de induzir um bloqueio significativo ( $p < 0,001$ ) na fase G0/G1 do ciclo celular nas duas concentrações testadas (150nM e 300nM) (figura 15). Vale ressaltar que quando realizou-se o tratamento com as substâncias combinadas verificou-se que a combinação também foi capaz de induzir um bloqueio significativo ( $p < 0,001$ ) na fase S do ciclo celular nas duas concentrações testadas (61,9nM IDA+ 76,8nM MBZ; 123,8nM IDA + 153,5nM MBZ) (figura 15). Portanto, não houve diferença estatística entre a utilização da IDA isolada e em combinação com o MBZ, porém vale ressaltar que a utilização das substâncias combinadas encontravam-se em uma concentração muito menor para idarrubicina (61,9nM e 123,8nM), produzindo o mesmo efeito obtido na maior concentração testada para idarrubicina (242nM).. Neste sentido verificamos que a associação da ida ao mbz, embora sem diferença estatisticamente significativa foi capaz de provocar um bloqueio do ciclo celular equivalente a a maior concentração testada da idarrubicina, demonstrando que o mbz foi capaz de potencializar o efeito da mesma, quando combinados. A Distribuição do ciclo celular da linhagem celular AGP-01, após o tratamento com as substâncias Idarrubicina e Mebendazol, nas concentrações isoladas e combinadas são mostradas na figura 16.



**Fig. 15** - Avaliação do efeito da IDA e do MBZ no ciclo celular da linhagem de câncer gástrico AGP01. Os dados estão representados pela média e o desvio padrão de três experimentos independentes. O grupo tratado foi comparado estatisticamente com o controle negativo usando o teste de ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. Significância: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ \*\*\*  $p < 0,001$ .



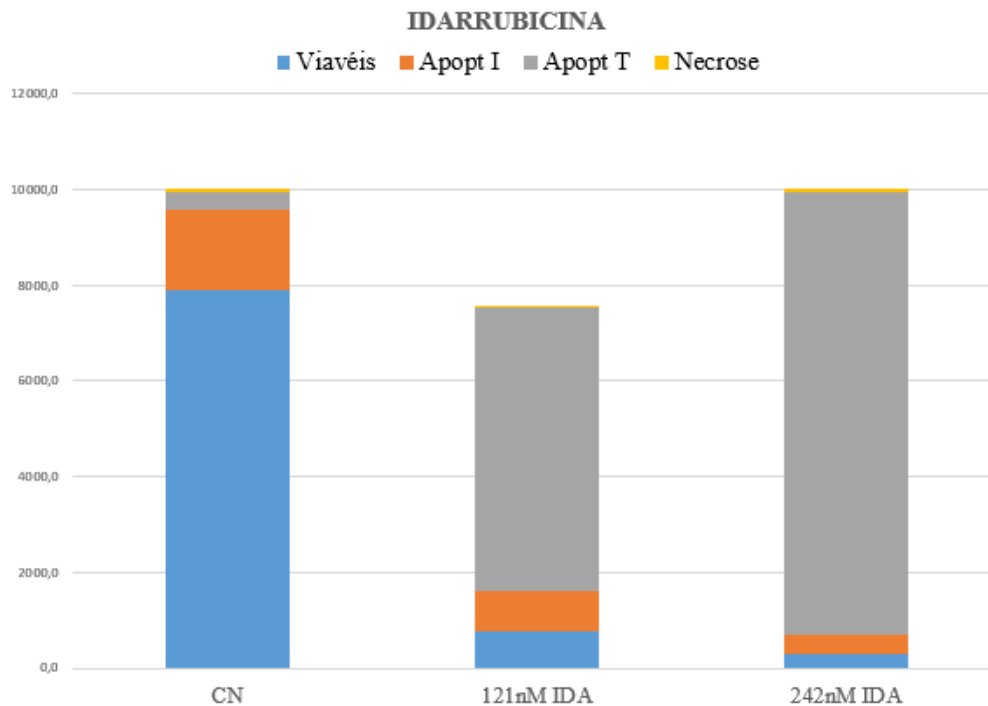
**Fig. 16** Distribuição do ciclo celular da linhagem celular AGP-01, após o tratamento com as substâncias Idarrubicina e Mebendazol, nas concentrações isoladas e combinadas.



#### **5.4 Efeitos da idarrubicina e Mebendazol sobre a apoptose e viabilidade celular analisado por citometria de fluxo**

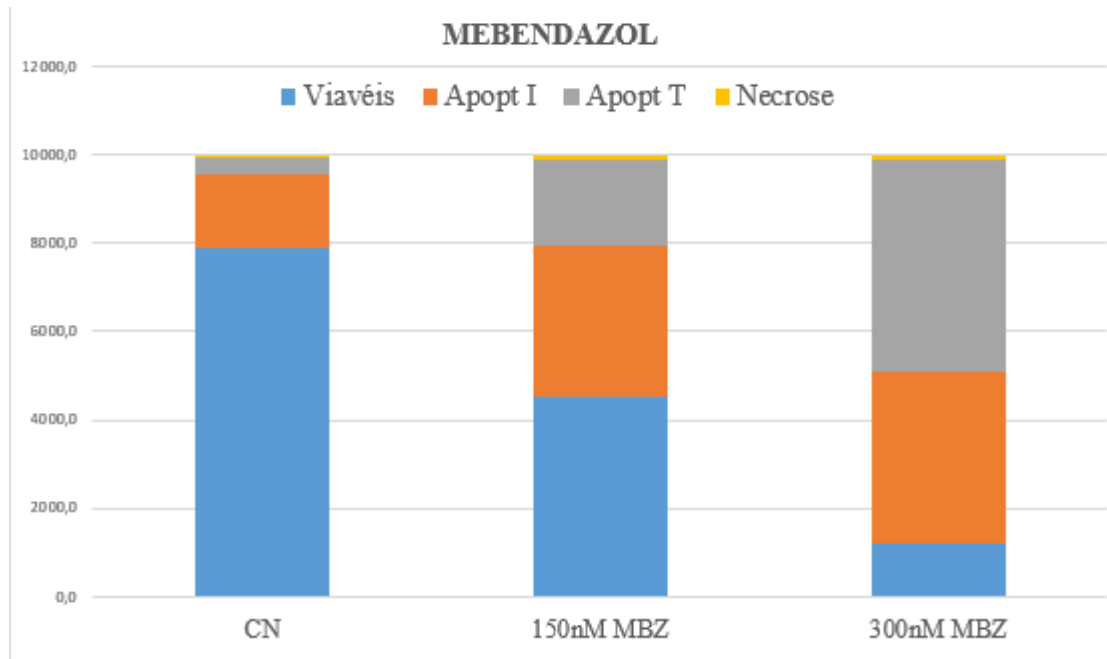
Para análise de viabilidade, apoptose e necrose em células de cancer gástrico, foi realizada a detecção da externalização de fosfatidilserina e da perda da integridade da membrana plasmática por citometria de fluxo utilizando o kit anexina V-PE e o marcador de viabilidade 7AAD. Da mesma forma utilizou-se a Anexina V conjugada com a fluoresceína (FITC) que também é um marcador da fosfatidilserina e o marcador de viabilidade celular iodeto de propídeo (IP). A análise foi realizada em triplicata sendo que em cada repetição 10.000 células foram avaliadas.

Quando analisou-se o efeito da idarrubicina isolada em comparação com o controle negativo, verificou-se que em ambas as concentrações (121nM; 242nM) a droga foi capaz de induzir morte celular em cerca 46,9% ( $p < 0.001$ ) e 75,7% ( $p < 0.001$ ), com diferença estatisticamente significativa para células viáveis ( $p < 0,001$ ), respectivamente. Não apresentando significância estatística para apoptose inicial e necrose. Vale ressaltar que a indução de apoptose foi dose dependente. As médias das porcentagens encontradas para cada concentração estão plotadas nos gráficos de barra (figura 17).



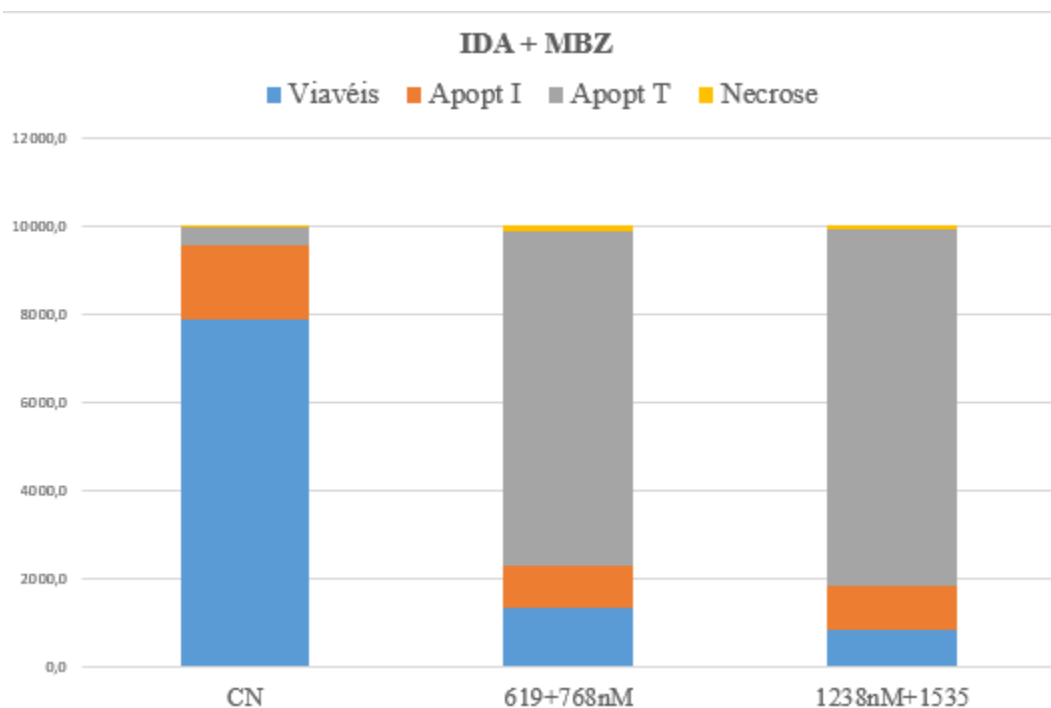
**Fig. 17:** Gráfico referente ao ensaio de apoptose e viabilidade celular, demonstrando as porcentagens de células que se encontram viáveis (Azul); em apoptose inicial (alaranjado); em apoptose tardia (cinza); e em necrose (amarelo). Demonstrando que o tratamento com o fármaco idarrubicina induziu apoptose em todas as concentrações testadas.

Quando analisou-se o efeito do mebendazol na menor concentração testada (150nM) em comparação com o controle negativo verificou-se que o mesmo não apresentou significância estatística para morte celular (apoptose inicial; apoptose tardia; necrose) apenas para quantidade de células viáveis que encontrou-se muito maior no controle ( $p < 0,001$ ). No entanto quando comparamos a maior concentração testada (300nM) com o controle negativo, verificou-se que o MBZ foi capaz de induzir morte celular celular em cerca de 66,5%, com diferença estatisticamente significativa para apoptose inicial, ( $p < 0,05$ ) e apoptose tardia ( $p < 0,001$ ). E diferenças estatisticamente significativas para quantidade de células viáveis que encontrou-se muito maior no controle ( $p < 0,001$ ). As médias das porcentagens encontradas para cada concentração estão plotadas nos gráficos de barra (figura 18).



**Fig. 18:** Gráfico referente ao ensaio de apoptose e viabilidade celular, demonstrando as porcentagens de células que se encontram viáveis (Azul); em apoptose inicial (alaranjado); em apoptose tardia (cinza); e em necrose (amarelo). Demonstrando que o tratamento com o fármaco mebendazol induziu apoptose em todas as concentrações testadas.

Quando analisou-se as substâncias combinadas em comparação com o controle negativo, verificou-se que em ambas as concentrações utilizadas (61,9nM+76,8nM e 123,9nM + 153,5nM), as substâncias foram capazes de induzir morte celular em cerca de 65% e 70,1%, respectivamente, com ( $p < 0,001$ ) para ambas as concentrações. Com diferenças estatisticamente significativas para quantidade de células viáveis que encontrou-se muito maior no controle ( $p > 0,001$ ). As médias das porcentagens encontradas para cada concentração estão plotadas nos gráficos de barra (figura 19).



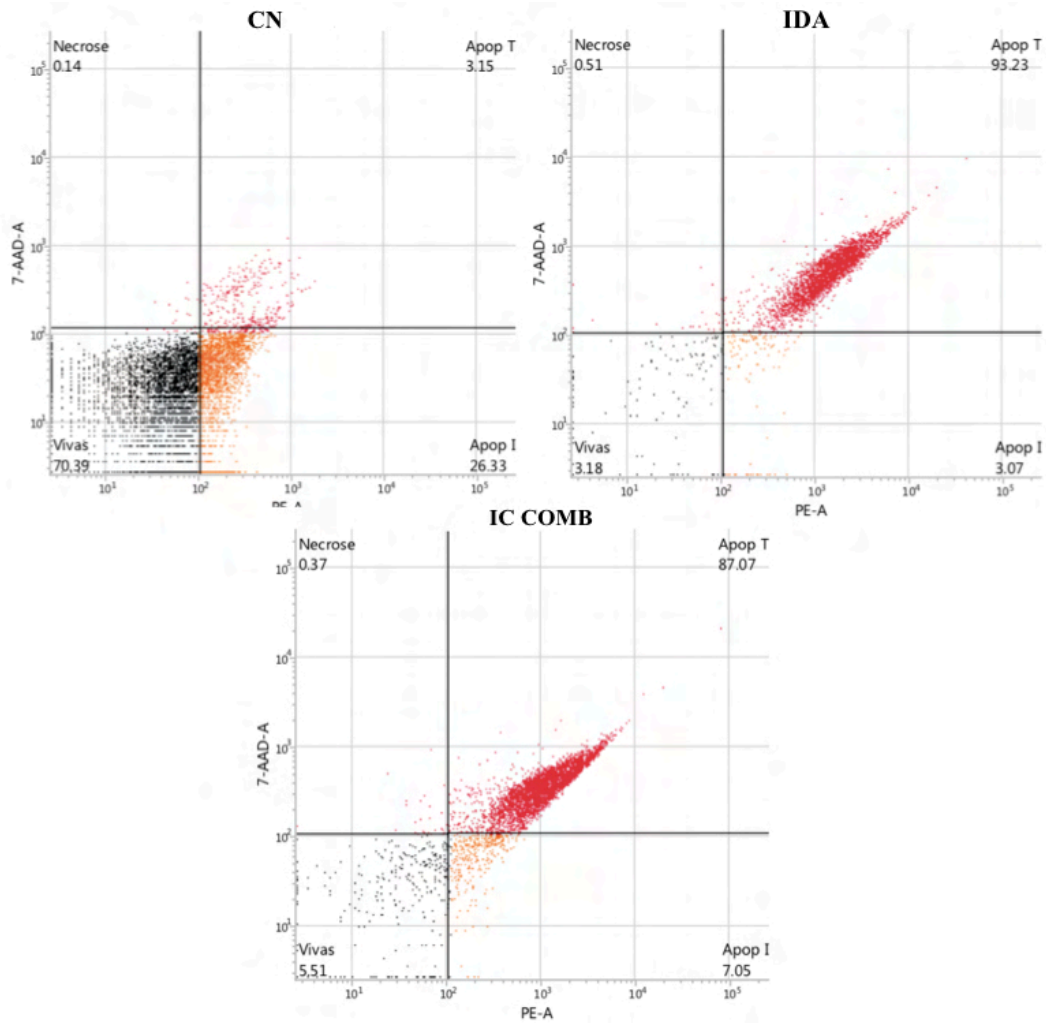
**Fig. 19:** Gráfico referente ao ensaio de apoptose e viabilidade celular, demonstrando as porcentagens de células que se encontram viáveis (Azul); em apoptose inicial (alaranjado); em apoptose tardia (cinza); e em necrose (amarelo). Demonstrando que o tratamento com os fármacos idarrubicina e mebendazol induziram apoptose em todas as concentrações testadas.

É de suma importância ressaltar que ao combinarmos a substâncias, a concentração inibitória a 50% (MTT) da idarrubicina reduziu pela metade equivalendo-se a menor concentração da idarrubicina isolada testada no presente estudo. Neste sentido, realizou-se a comparação entre a concentração de 121 nM da idarrubicina e a concentração de 123,9nM + 153,5nM do combinado e verificou-se diferença estatisticamente significativa com cerca de 21,9% de células a mais em apoptose quando tratadas com as substâncias combinadas. Quando realizou-se a comparação entre a concentração de 242nM para idarrubicina e 123,9nM + 153,5nM para combinado não houve diferença estatisticamente significativa ( $p > 0.05$ ). Com base nisso verificamos que ao combinarmos as substâncias houve uma redução da dose necessária para induzir a apoptose em células tumorais e que tal indução foi equivalente a indução de apoptose provocada pela maior concentração testada da idarrubicina isolada. Adicionalmente, verificamos isto como uma fator favorável pois o mbz, uma substância que exibe baixo grau de toxicidade e sem efeitos adversos clinicamente relevantes, foi capaz de reduzir a concentração inibitória da idarrubicina, uma droga que em elevadas concentrações pode provocar cardiotoxicidade.

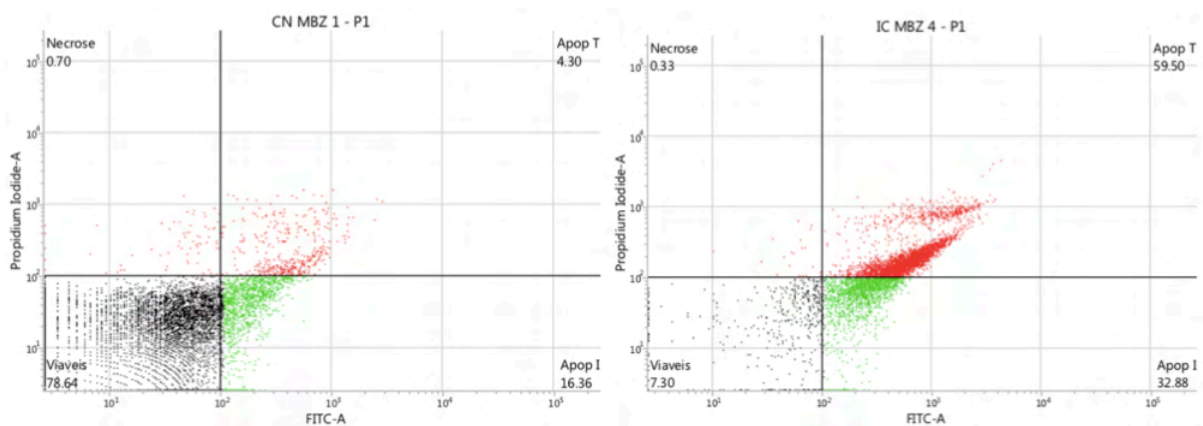
Quando realizou-se a análise entre o tratamento com mebendazol em comparação com o tratamento com as substâncias combinadas, verificou-se que a combinação na concentração de 61,9nM+76,8nM foi capaz de induzir apoptose em cerca de 31,5% a mais que o MBZ na concentração de 150nM ( $p<0.001$ ), enquanto que a concentração de 123,9nM + 153,5nM foi capaz de induzir apoptose em cerca de 36,5% a mais que o MBZ na concentração de 150nM ( $p<0.001$ ). Quando realizou-se a comparação entre as concentrações de 300nM para o MBZ e 61,9nM+76,8nM para a combinação, verificou-se que a combinação induziu mais apoptose tardia em relação ao MBZ ( $p<0.01$ ) em contrapartida o MBZ induziu mais apoptose inicial ( $p<0.01$ ). Da mesma forma, a concentração de 123,9nM + 153,5nM para combinação quando comparada com a concentração de 300nM para o MBZ, induziu mais apoptose tardia em relação ao MBZ ( $p<0,001$ ) em contrapartida o MBZ induziu mais apoptose inicial ( $p<0.01$ ).

Os dot plots apresentados têm por objetivo apenas ilustrar os dados adquiridos pelo citômetro de fluxo durante as análises, ou seja, as porcentagens de células encontradas em cada estado: células viáveis (sem marcação), em estágio inicial de apoptose (positivas para Anexina V-PE) e em estágio tardio/avançado de apoptose ou necrose (positivas para Anexina V-PE e 7AAD) (fig. 20 e 21). Desta forma, os dot plots e gráficos de barra correspondem às porcentagens de células viáveis, apoptóticas e necróticas observadas em linhagem de cancer gástrico.

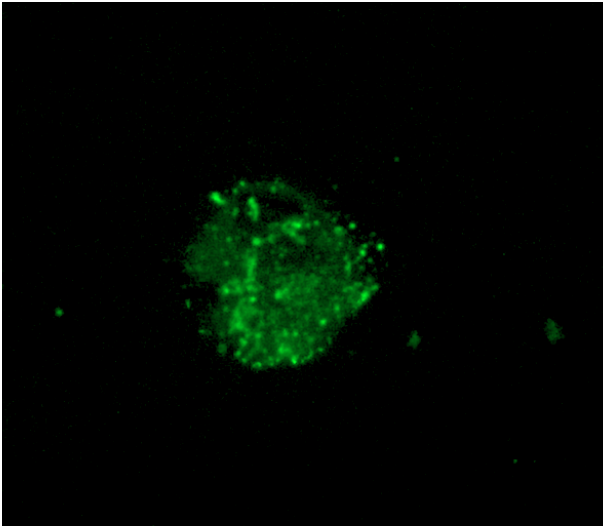
Para melhor elucidar a marcação da anexina-V e 7AAD ou Anexina V-FITC/IP, realizamos a confecção de uma lamina, de uma amostra tratada com as substâncias, que demonstra uma célula em estágio de apoptose (fig. 22 e fig. 23).



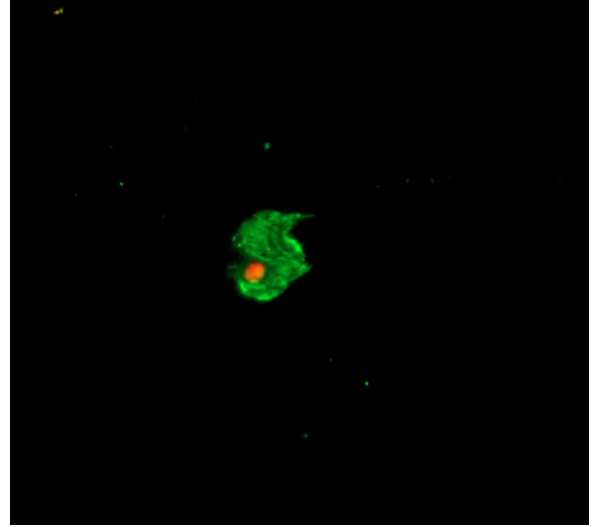
**Figura 20:** Dot plots típicos utilizados na análise dos efeitos apoptóticos da idarrubicina isolada e em associação da idarrubicina e Mebendazol. É possível observar aumento da porcentagem de células em estágio inicial de apoptose e estágio tardio de apoptose ou necrose nos tratados em comparação com o Controle Negativo. Viáveis: células 7AAD- / Anexina V-PE- ; Estágio inicial de apoptose: células 7AAD - / Anexina V-PE+; Estágio tardio de apoptose: 7AAD+ / Anexina V-PE+ ; Necrose: 7AAD+.



**Figura 21:** Dot plots típicos utilizados na análise dos efeitos apoptóticos do Mebendazol. É possível observar aumento da porcentagem de células em estágio inicial de apoptose e estágio tardio de apoptose no tratado em comparação com o Controle Negativo. Viáveis: células IP- / Anexina V-FITC- ; Estágio inicial de apoptose: células IP - / Anexina V-FITC+; Estágio tardio de apoptose: IP+ / Anexina V-FITC+ ; Necrose: IP+.



**Fig 22.** Ilustração de apoptose inicial quando marcadas com o anexinaV-FITC e IP e analisadas por microscópio de fluorescência. (marcação com FITC e IP.



**Fig 23.** Ilustração de apoptose tardia quando marcadas com o anexinaV-FITC e IP e analisadas por microscópio de fluorescência. (marcação com FITC e IP.

## 6. DISCUSSÃO

Atualmente, a quimioterapia é a principal abordagem para o tratamento de doenças sistêmicas em estágio avançado ou metastático. Os tratamentos direcionados à neoplasia gástrica apresentam taxas de sucesso ainda insatisfatórias. Dentre as possíveis estratégias está a utilização de inibidores específicos que auxiliem na interrupção da progressão tumoral.

Poruchynsky e colaboradores (2014) demonstraram que associação de drogas que tem como alvo os microtúbulos a agentes causadores de danos ao DNA é uma estratégia terapêutica promissora. Propuseram ainda a hipótese de que os agentes microtúbulos-alvo dificultam o tráfico de proteínas essenciais de reparo do DNA e provocam o sinergismo com os agentes causadores de dano, aumentando sua toxicidade.

O MBZ tem demonstrado atividade anticâncer *in vivo* e *in vitro* em vários tipos de câncer, tais como glioblastoma multiforme, melanoma, carcinoma adrenocortical e de pulmão, tendo como principal mecanismo ação a despolimerização da tubulina provocando a desestruturação da função dos microtúbulos (BAI *et al.*, 2011; DOUDICAN *et al.*, 2008; MARTARELLI *et al.*, 2008; MUKHOPADHYAY *et al.*, 2002).

A idarrubicina, por sua vez, é um agente comprovadamente eficaz contra células cancerígenas, sendo amplamente utilizada na prática clínica em casos de leucemias. Seu mecanismo de ação como citado anteriormente, consiste principalmente na intercalação ao DNA e ligação a topoisomerase II, sendo desta forma uma substância com ampla ação. Neste sentido, é de substancial importância avaliar o potencial de ambas as drogas e suas associação no câncer gástrico.

Diante deste cenário, o presente estudo demonstrou uma atividade citotóxica *in vitro* aumentada ao associar o MBZ ao quimioterápico IDA na linhagem AGP01, uma vez que diminuiu aproximadamente 50% o CI50 das substâncias quando estas foram combinadas. É importante destacar que este o primeiro estudo que associa a IDA ao MBZ em câncer gástrico.

A atividade citotóxica da idarrubicina foi testada em diversos estudos, incluindo linhagens celulares de leucemia linfoblástica aguda T<sup>(CEM)</sup> com CI50 de 350nM (LOTFI; ZACKRISSON; PETERSON, 2002). Em linhagens de células-tronco leucêmicas (LSC), a



idarrubicina provocou uma concentração inibitória 50% de  $285,20 \pm 13,7$  nM (LIU *et al.*, 2013). Em um método comparativo entre a atividade da idarrubicina isolada e a sua atividade em associação com nanopartículas capazes de superar a resistência a múltiplas drogas (MDR), MA, *et al.* (2009) verificaram que a IDA em uma linhagem celular de carcinoma colorretal HCT-15 com superexpressão de glicoprotínas P (Pgp), apresentou uma CI<sub>50</sub> de 129nM, enquanto que para IDA conjugada a CI<sub>50</sub> foi de 120nM. Tais dados corroboram com os achados no presente trabalho.

MA, *et al.* (2009), também realizaram a análise do efeito da IDA isolada e em combinação com nanopartículas, em uma linhagem celular de leucemia promielocítica HL-60, que demonstrou uma CI<sub>50</sub> de 27nM para IDA isolada e de 23nM para IDA conjugada, Os resultados da linhagem HL-60 diferem com os achados no presente estudo e um provável explicação para isso, seria que a AGP01 (utilizada no presente estudo) pode estar expressando mecanismos de resistência a múltiplas drogas.

Os achados do presente estudo confrontam os resultados encontrados em um estudo realizado em linhagem celular de adenocarcinoma de mama epitelial de tipo humano a qual apresentou CI<sub>50</sub> de 2,48  $\mu$ M (GUNDUZ *et al.*, 2014).

Os achados de Pinto *et al.* (2015) corroboram com os resultados encontrados no presente trabalho, uma vez que o MBZ provocou uma concentração inibitória 50% de 0,5891  $\mu$ M (589 nM) na linhagem AGP01.

BAI *et al.* (2011 e 2015) observaram uma importante atividade citotóxica do MBZ em linhagem de glioblastoma multiforme (CI<sub>50</sub> 0,1 $\mu$ M=100nM), da mesma forma, Doudican *et al.* (2008) e Mukhopadhyay *et al.* (2002) demonstraram a atividade citotóxica do MBZ nas linhagens SKMEL-19 (CI<sub>50</sub> 0,32 $\mu$ M= 320nM) e M-14 (CI<sub>50</sub> 0,3 $\mu$ M= 300nM) oriundas de melanoma e linhagens de câncer de pulmão (CI<sub>50</sub> 0,16  $\mu$ M=160nM), respectivamente. Da mesma forma, um estudou avaliou a atividade citotóxica do MBZ em linhagens de leucemia mielóide aguda (LMA) (THP-1, U937, NB4 e K562) e foi determinado que o valor de concentração inibitória de 50% (IC<sub>50</sub>) de MBZ em células U937 em 48 horas foi de 0,17 (0,14 a 0,21)  $\mu$ M.

Para determinar se o MBZ tinha eficácia potente em relação aos outros tipos de linhagens celulares leucêmicas, as células THP-1 (subtipo M5 de LMA), NB4 (subtipo M3 de LMA) e K562 (Leucemia Mielóide Crônica- LMC) foram tratadas com diferentes

concentrações de MBZ durante 48 horas. O resultado mostrou que o MBZ também demonstrou concentração inibitória 50% em células THP-1, NB4 e K562 nas concentrações de 0,12  $\mu\text{M}$ , 0,13  $\mu\text{M}$  e 0,34  $\mu\text{M}$ , respectivamente (HE *et al.*, 2018).

Notavelmente, ambas as substâncias possuem atividade anticâncer tanto *in vitro*, quanto *in vivo* em diversas neoplasias malignas, tais como, leucemias, linfomas, câncer de mama, carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço, melanoma e câncer gástrico (PINTO *et al.*, 2015; ZUGBI *et al.*, 2018; DOUDICAN *et al.*, 2008; ZHANG *et al.*, 2017; CRIVELLARI *et al.*, 2004; BINASCHI *et al.*, 1997; GEWIRTZ, 1999).

Diversas etapas são necessárias para a progressão de células malignas no processo de invasão e metástase, dentre elas podemos destacar: separação de algumas células do tumor primário, penetração destas através da membrana basal, migração das células ao longo da matriz extracelular, extravasamento destas para os vasos sanguíneos, adesão das células tumorais ao endotélio vascular, extravasamento das células pelos capilares do órgão/tecido alvo e, finalmente, a formação dos tumores secundário (AKIYAMA *et al.*, 1995).

As substâncias anticâncer capazes de alterar qualquer uma das etapas da cascata metastática tornam-se potenciais candidatos na terapia anticâncer. Em virtude disto, ressaltamos a importância de estudar os efeitos das drogas idarrubicina e mebendazol na migração celular.

Pinto *et al.* (2015), demonstraram que o MBZ inibiu significativamente a migração celular na linhagem AGP01, nas concentrações de 100nM e 500nM corroborando com o presente estudo que após 24h de tratamento com 150nM e 300nM também demonstrou uma inibição significativa da capacidade migratória na linhagem gástrica nos tempos de 12 e 24 horas. O mesmo foi visto em células de carcinoma adrenocortical em que o MBZ inibiu a migração e invasão *in vitro* e a formação de metástases *in vivo* (MARTARELLI *et al.*, 2008). Bai *et al.* (2011) demonstraram que a interrupção da formação de microtúbulos também poderia prejudicar a migração de células de glioblastoma. Avaliaram que a migração de células neuronais está comprometida por uma mutação  $\alpha$ -tubulina e que os inibidores dos microtúbulos pode potencialmente bloquear a mobilidade de células de glioma.

A idarrubicina isolada e as substâncias combinadas demonstraram capacidade inibitória significativa na migração celular no tempo de 12 horas de exposição, exceto na concentração de 61,9nM + 76,8nM (metade do IC da substância combinada) onde não obteve-

se significância em nenhum dos tempos estudados. Por possuir uma atividade dose-dependente sugere-se que a idarrubicina em uma maior concentração provocaria maiores efeitos tanto isoladamente quanto em associação. É importante destacar que até o presente momento não há estudos que avaliem o efeito da idarrubicina sobre a migração celular.

Em suma, foi possível observar que as substâncias combinadas não produziram efeito sinérgico na migração celular, uma vez que o efeito sobre a migração foi superior quando as substâncias foram testadas isoladamente.

As células tumorais apresentam maior frequência de alteração do ciclo celular quando correlacionada a uma célula normal, devido a isto, diversos estudos tem voltado sua atenção para identificação de etapas relacionadas a inibição da multiplicação celular e ao estudo de alvos moleculares, que contribuam para o desenvolvimento de potenciais candidatos a fármacos para terapia do câncer (FOX *et al.*, 2012).

Os microtúbulos são estruturas essenciais para a organização e distribuição de proteínas intracelulares essenciais, assim como tem fundamental importância durante a divisão celular. Os fármacos que tem como alvo os microtúbulos, tais como o paclitaxel e os alcaloides vinca, vinblastina, vincristina e o MBZ, exercem uma efeito inibitório sobre a proliferação de células cancerosas por produzir alterações no fuso mitótico, resultando na parada do ciclo celular e induzindo a apoptose (JORDAN *et al.*, 1996; YVON *et al.*, 1999). Isto por que a ruptura do equilíbrio entre os monômeros/dímeros de tubulina e polímeros de microtúbulos provocada por agentes estabilizadores dos microtúbulos (por exemplo, paclitaxel, docetaxel) ou agentes destabilizadores dos microtúbulos (por exemplo, vinblastina, vincristina, nocodazol, colchicina) ativa cascatas de sinalização de proteínas quinases ativadas por estresse, ocasionando a parada do ciclo celular (BHALLA *et al.*, 1993; HORWITZ, 1992; LONG *et al.*, 1994; ROWINSKY *et al.*, 1995).

Neste sentido, os resultados do presente estudo demonstraram que o mebendazol apresenta-se potencialmente eficaz no bloqueio do ciclo celular, uma vez que induziu o bloqueio do ciclo na fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> em ambas as concentrações testadas (150nM e 300nM), corroborando com estudo de ZHANG *et al.* (2017). Em contrapartida, ZHANG *et al.* (2018), HE *et al.* 2018 e MUKHOPADHYAY *et al.* (2002) identificaram que o MBZ induziu a parada do ciclo celular na fase G<sub>2</sub>/M em linhagens celulares de câncer de mama, leucemia linfóide aguda e câncer de pulmão, respectivamente.

Agentes com capacidade produzir danos ao DNA também são extremamente promissores na luta contra o câncer. A idarrubicina é um inibidor potencialmente eficaz sobre a proliferação celular, e sua farmacodinâmica consiste principalmente na interação com o DNA de diferentes maneiras, incluindo intercalação (entre os pares de bases) resultando na quebra da fita de DNA e interação com a enzima topoisomerase II, produzindo quebras na fita de DNA que não podem ser reparadas pela ligase, resultando em inibição do alongamento da cadeia de DNA. A idarrubicina também induz a remoção de histonas da cromatina, que desregula a resposta ao dano ao DNA (DRUGBANK, 2018; CRIVELLARI *et al.*, 2004; BINASCHI M. *et al.*, 1997; GEWIRTZ, 1999; JENSEN, *et al.*, 1993; PANG, *et al.*, 2013).

Os resultados do presente estudo demonstraram que a idarrubicina induziu a parada do ciclo celular na fase S, corroborando com diversos estudos da literatura (LI, YIN *et al.*, 2017; MINDERMAN *et al.*, 1993; MINOTTI *et al.*, 2004; BCCANCER 2017). Por outro lado, quando testada em menores concentrações, verificou-se que a idarrubicina induziu bloqueio do ciclo na fase G2/M ( HAN *et al.*, 2017).

Quando as duas substâncias foram combinadas, foi possível identificar que o mebendazol potencializou o efeito da idarrubicina sobre o ciclo celular com potente parada na fase S. Vale ressaltar que a maior concentração utilizada é equivalente a metade da concentrações das substancias isolada, reforçando assim, que mesmo em baixas concentrações a combinação das substâncias provocou um efeito promissor sobre o ciclo celular.

Simbulan-Rosenthal *et al.* (2017) demonstraram que o MBZ associado ao trametinib induz o bloqueio de células de melanoma refratário na fase S do ciclo celular. Desta forma, sugerimos a hipótese de que mesmo o MBZ possuindo bloqueio do ciclo celular nas fases G0/G1 e G2/M, dependendo da dose, o mesmo, gera um efeito potencializador quando associado a outros agentes anticâncer.

As altas taxas de apoptose exibida pela idarrubicina e a sua associação com o mbz, decorre da acumulação de dano que a mesma é capaz de provocar ao DNA, e defeitos no sistema de reparo ao DNA. Ressaltando seu potencial como agente anticâncer e sua atividade melhorada em uma dose inferior quando associada ao MBZ (LI *et al.* 2017).

Com base no exposto ate o momento, o presente estudo verificou que ambas as drogas isoladas e em associação demonstraram efeitos extremamente significativos na apoptose e viabilidade celular analisada por citometria de fluxo, como descrito anteriormente (página

62), tais resultados estão de acordo com os achados por, Strickland e colaboradores (2013), que demonstraram em seu estudo que a idarrubicina induz, similarmente, apoptose em linhagens de leucemia mielocítica aguda. Diversos estudos tem realizado a associação da idarrubicina com diferentes componentes, demonstrando que ao associar-se seu efeito é potencializado na indução de apoptose (LI, *et al.* 2014; ZHAO *et al.*, 2011), ligeiramente similar ao que identificamos quando realizamos a combinação da IDA ao MBZ. Desta forma, foi evidente que o inibidor da formação dos microtúbulos (Mebendazol), aumentou significativamente a toxicidade de um agente causador de dano ao DNA (Idarrubicina), corroborando com os achados de Poruchynsky e colaboradores (2014). Quanto ao MBZ, a indução de apoptose foi eficiente apenas na maior concentração testada (300nM) demonstrando superior indução de apoptose inicial, estando correntes com os achados de Zhang *et al.* (2018) e Zhang Fugui *et al.* (2017) os quais demonstraram em seu estudo que o MBZ induz, similarmente, apoptose em câncer de mama e em carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço (HNSCC), respectivamente. Uma possível explicação para isso, seria porque o mebendazol modulada a via de MYC, uma fosfoproteína nuclear que funciona como um fator de transcrição estimulando a progressão do ciclo celular e a apoptose. É um gene de resposta inicial, ou seja, responde diretamente a sinais mitogênicos estimulando a passagem das células da fase G1 do ciclo celular. Neste sentido, se o tratamento com mebendazol regular negativamente a via de MYC a passagem das células da fase G0/G1 é bloqueada e a a indução de apoptose ativada (ZHANG *et al.* 2017; ANAZETTI; MELO, 2007).

Vale ressaltar que de acordo com a literatura ambos os fármacos são capazes de driblar a resistencia a múltiplas drogas gerada pela expressão do gene MDR-1, que é uma das principais causas de falha na terapia do câncer. Esse gene codifica uma glicoproteína de ligação de ATP de 170 kDa (PGP) que atua como uma bomba para excluir agentes terapêuticos da célula, diminuindo assim a concentração intracelular do fármaco e a resposta celular apoptótica (PINTO *et al.*, 2015; CRIVELLARI *et al.*, 2004 BELAUD-ROTUREAU, *et al.*, 2000; FRANKFURT; SECKINGER; SUGARBAKER, 1994).

Diante deste cenário, destacamos que a combinação desta duas drogas anticâncer é uma estratégia terapêutica promissora, principalmente pela possibilidade de reduzir a dosagem necessária pra se obter efeitos benéficos ao paciente e reduzir os efeitos adversos comprovadamente provocados pela idarrubicina, como cardiotoxicidade; Toxicidade

hematológica; estomatite; e outros, destacando neste sentido a relevância terapêutica da combinação de agentes anticâncer.

## 7. CONCLUSÃO

Em virtude dos argumentos apresentados, o presente trabalho mostrou que, tanto o Mebendazol quanto a Idarrubicina, possuem excelente atividade anticâncer contra a linhagem de câncer gástrico, oriunda de ascite maligna AGP01. Visto que, ambos os fármacos isolados e em associação exerceram um considerável efeito citotóxico, induzindo parada no ciclo celular e induzindo apoptose na linhagem de câncer gástrico AGP01; tal efeito observado foi evidenciado em todas as concentrações testadas neste modelo. Isto pode representar uma nova estratégia para o tratamento deste tipo tumoral, tendo em vista a resposta ainda ineficiente a quimioterapia e quimiorresistência. No entanto, estudos clínicos e mais testes *in vitro* devem ser realizados para confirmar o potencial de ambas as drogas no tratamento desse tipo tumoral, buscando a melhoria da sobrevida dos pacientes.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKIYAMA, S.K.; AOTA, S.; YAMADA, K.M. Function and receptor specificity of a minimal 20 kilodalton cell adhesive fragment of fibronectin. *Cell-Cell and Adhesion Communication*. v. 3, n. 1, p. 13-25, 1995.

American Cancer Society. Disponível em: <<http://www.cancer.org/cancer/stomachcancer/detailedguide/stomach-cancer-risk-factors>>. Acessado em: 10 de março de 2017.

American Joint Committee on Cancer – AJCC. *Cancer Staging Manual*. In: *Digestive System*. Seventh edition. ed. Springer, p. 117-127, 2010.

ANAZETTI MC; MELO PS. Morte Celular por Apoptose: uma visão bioquímica e molecular. *Metrocamp Pesquisa*, v. 1, n. 1, p. 37-58, jan./jun. 2007.

ASHIKAWA, K.; SHISHODIA, S.; FOKT, I.; PRIEBE, W.; AGGARWAL, B.B. Evidence that activation of nuclear factor- $\kappa$ B is essential for the cytotoxic effects of doxorubicin and its analogues. *Biochemical pharmacology*, v. 67, n. 2, p. 353-364, 2004.

AZARHOUSH, Ramin et al. Relationship between p53 expression and gastric cancers in cardia and antrum. *Arch Iran Med*, v. 11, n. 5, p. 502-6, 2008.

BACHUR, N.R.; YU, F.; JOHNSON, R.; HICKEY, R.; WU, Y.; MALKAS, L. Helicase inhibition by anthracycline anticancer agents. *Molecular pharmacology*, v. 41, n. 6, p. 993-998, 1992.

BAEUERLE, P.A.; BAICHWAL, V.R. NF- $\kappa$ B as a frequent target for immunosuppressive and anti-inflammatory molecules. *Advances in immunology*, v. 65, p. 111-138, 1997.

BAI, R.Y.; STAEDTKE, V.; RUDIN, C.M.; BUNZ, F.; RIGGINS, G.J. Effective treatment of diverse medulloblastoma models with mebendazole and its impact on tumor angiogenesis. *Neuro-oncology*, v. 17, n. 4, p. 545-554, 2014.

BAI, Ren-Yuan et al. Antiparasitic mebendazole shows survival benefit in 2 preclinical models of glioblastoma multiforme. *Neuro-oncology*, p. nor077, 2011.

BALDWIN JR, A.S. The NF- $\kappa$ B and I $\kappa$ B proteins: new discoveries and insights. *Annual review of immunology*, v. 14, n. 1, p. 649-681, 1996.

BC Cancer Agency Cancer Drug Manual <[http://www.bccancer.bc.ca/drug-database-site/drug%20index/idarubicin\\_monograph\\_1feb2017.pdf](http://www.bccancer.bc.ca/drug-database-site/drug%20index/idarubicin_monograph_1feb2017.pdf)> Acessado em: 18 de Outubro de 2018.

BEG, A.A.; FINCO, T.S.; NANTERMET, P.V.; BALDWIN JR, A.S. Tumor necrosis factor and interleukin-1 lead to phosphorylation and loss of I kappa B alpha: a mechanism for NF-kappa B activation. *Molecular and cellular biology*, v. 13, n. 6, p. 3301-3310, 1993.



BEG, A.A.; RUBENS, S.M.; SCHEINMAN, R.I.; HASKILL, S.; ROSEN, C.A.; BALDWIN JR, A.S. I kappa B interacts with the nuclear localization sequences of the subunits of NF-kappa B: a mechanism for cytoplasmic retention. **Genes & development**, v. 6, n. 10, p. 1899-1913, 1992.

BELAUD-ROTUREAU, M. A. et al. Study of apoptosis-related responses of leukemic blast cells to in vitro anthracycline treatment. **Leukemia**, v. 14, n. 7, p. 1266, 2000.

BERRIDGE, MICHAEL V.; TAN, AN S. Characterization of the cellular reduction of 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 303, n. 2, p. 474-482, 1993.

BEZERRA, Daniel Pereira et al. Antiproliferative effects of two amides, piperine and pipartine, from Piper species. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 60, n. 7-8, p. 539-543, 2005.

BHALLA, K., IBRADO, A. M., TOURKINA, E., TANG, C., MAHONEY, M. E., AND HUANG, Y. Taxol induces internucleosomal DNA fragmentation associated with programmed cell death in human myeloid leukemia cells. **Leukemia (Baltimore)**, v. 7, p. 563-568, 1993.

BINASCHI, M.; CAPRANICO, G.; DAL BO, L.; ZUNINO, F. Relationship between lethal effects and topoisomerase II-mediated double-stranded DNA breaks produced by anthracyclines with different sequence specificity. **Molecular pharmacology**, v. 51, n. 6, p. 1053-1059, 1997.

BISHOP, J. Michael; WEINBERG, Robert Allan (Ed.). **Scientific American molecular oncology**. Scientific American, 1996.

BOERSMA, Hendrikus H. et al. Past, present, and future of annexin A5: from protein discovery to clinical applications. **Journal of nuclear medicine**, v. 46, n. 12, p. 2035-2050, 2005.

BOLAND, C. Richard; YURGELUN, Matthew B. Historical perspective on familial gastric cancer. **Cellular and molecular gastroenterology and hepatology**, v. 3, n. 2, p. 192-200, 2017.

BORST, P.; EVERS, R.; KOOL, M.; WIJNHOLDS, J. A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 92, n. 16, p. 1295-1302, 2000.

CÉSAR, Ana Cristina Gobbo; SILVA, Ana Elizabete; TAJARA, Eloiza Helena. Genetics and environmental factors in gastric carcinogenesis. **Arquivos de gastroenterologia**, v. 39, n. 4, p. 253-259, 2002.

CHAMBERS, A. F.; GROOM, A. C.; MACDONALD, I. C. Dissemination and Growth of Cancer Cells in Metastatic Sites, **Nat. Rev. Cancer**, v. 2, p. 563ã, 2002.

CHAMPOUX, James J. DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. **Annual review of biochemistry**, v. 70, n. 1, p. 369-413, 2001.

CHANDRA, Joya; SAMALI, Afshin; ORRENIUS, Sten. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 29, n. 3-4, p. 323-333, 2000.

CHANG, Woong Ki et al. Association between Helicobacter pylori infection and the risk of gastric cancer in the Korean population: prospective case-controlled study. **Journal of gastroenterology**, v. 36, n. 12, p. 816-822, 2001.

CHUNG, Michael; KOZUCH, Peter. Treatment of malignant ascites. **Current treatment options in oncology**, v. 9, n. 2, p. 215-233, 2008.

CLARKE, A.R.; PURDIE, C.A.; HARRISON, D.J. ; MORRIS, R.G.; BIRD, C.C.; HOOPER, M.L.; WYLLIE, A.H. Thymocyte apoptosis induced by p53-dependent and independent pathways. **Nature**, v. 362, n. 6423, p. 849, 1993.

COFFEY, Robert J. et al. Menetrier disease and gastrointestinal stromal tumors: hyperproliferative disorders of the stomach. **The Journal of clinical investigation**, v. 117, n. 1, p. 70-80, 2007.

COLLINS, Andrew R. Antioxidant intervention as a route to cancer prevention. **European Journal of Cancer**, v. 41, n. 13, p. 1923-1930, 2005.

CREW, Katherine D.; NEUGUT, Alfred I. Citation of This Article Corresponding Author of This Article Keywords for Related Literature of This Article Article-Type of This Article Open-Access Policy of This Article. **World Journal Gastroenterol**, v. 12, n. 3, p. 354-362, 2006.

CRIVELLARI, D.; LOMBARDI, D.; SPAZZAPAN, S.; VERONESI, A.; TOFFOLI, G. New oral drugs in older patients: a review of idarubicin in elderly patients. **Critical reviews in oncology/hematology**, v. 49, n. 2, p. 153-163, 2004.

CRUZ, M.; DUARTE-RODRIGUES, J.; CAMPELO, M. Cardiotoxicidade na terapêutica com antraciclinas: estratégias de prevenção. **Revista Portuguesa de Cardiologia**, v. 35, n. 6, p. 359-371, 2016.

CUNNINGHAM, D.; ALLUM, W.H.; STENNING, S.P.; THOMPSON, J.N.; CHIR., M.; VAN DE VELDE, C.J.H; NICOLSON, M.; SCARFFE, J.H.; LOFTS, F.J.; FALK, S.J.; IVESON, T.J.; SMITH, D.B.; LANGLEY, R.E.; VERMA, M.; WEEDEN, S.; CHUA, Y.J. Perioperative chemotherapy versus surgery alone for resectable gastroesophageal cancer. **N Engl J Med**, v. 355, p. 11-20, 2006.

DAGHESTANI, A.N.; ARLIN, Z.A.; LEYLAND-JONES, B.; GEE, T.S.; KEMPIN, S.J.; MERTELSMANN, R.; BUDMAN, D.; SCHULMAN, P.; BARATZ, R.; WILLIAMS, L. Phase I and II clinical and pharmacological study of 4-demethoxydaunorubicin (idarubicin) in adult patients with acute leukemia. **Cancer research**, v. 45, n. 3, p. 1408-1412, 1985.

DAKSHANAMURTHY, S.; ISSA, N.T.; ASSEFNIA, S.; SESHASAYEE, A.; PETERS, O.J.; MADHAVAN, S.; UREN, A.; BROWN, M.L.; BYERS, S.W. Predicting new indications for approved drugs using a proteochemometric method. **Journal of medicinal chemistry**, v. 55, n. 15, p. 6832-6848, 2012.

DARTSCH, D.C.; GIESELER, F. Repair of idarubicin-induced DNA damage: A cause of resistance?. **DNA repair**, v. 6, n. 11, p. 1618-1628, 2007.

DATLER C1, Pazarentzos E, Mahul-Mellier AL, Chaisaklert W, Hwang MS, Osborne F, Grimm S. **CKMT1 regulates the mitochondrial permeability transition pore in a process that provides evidence for alternative forms of the complex**. *J Cell Sci*. 2014 Apr 15;127(Pt 8):1816-28. doi: 10.1242/jcs.140467. Epub 2014 Feb 12

DE MARTEL, Catherine; FORMAN, David; PLUMMER, Martyn. Gastric cancer: epidemiology and risk factors. **Gastroenterology Clinics of North America**, v. 42, n. 2, p. 219-240, 2013.

DIACONU, S. et al. Helicobacter pylori infection: old and new. **Journal of medicine and life**, v. 10, n. 2, p. 112, 2017.

DICKEN, Bryan J. et al. Gastric adenocarcinoma: review and considerations for future directions. **Annals of surgery**, v. 241, n. 1, p. 27-39, 2005.

DICKEN, Bryan J. et al. Gastric adenocarcinoma: review and considerations for future directions. **Annals of surgery**, v. 241, n. 1, p. 27, 2005.

DIKKEN, Johan L. et al. Effect of hospital volume on postoperative mortality and survival after oesophageal and gastric cancer surgery in the Netherlands between 1989 and 2009. **European Journal of Cancer**, v. 48, n. 7, p. 1004-1013, 2012.

DIKKEN, Johan L. et al. Treatment of resectable gastric cancer. **Therapeutic advances in gastroenterology**, v. 5, n. 1, p. 49-69, 2012.

DOBROSOTSKAYA, I.Y.; HAMMER, G.D.; SCHTEINGART, D.E.; MATUREN, K.E.; WORDEN, F.P. Mebendazole monotherapy and long-term disease control in metastatic adrenocortical carcinoma. **Endocrine practice**, v. 17, n. 3, p. e59-e62, 2011.

DOUDICAN, N.; RODRIGUEZ, A.; OSMAN, I.; ORLOW, S.J. Mebendazole induces apoptosis via Bcl-2 inactivation in chemoresistant melanoma cells. **Molecular Cancer Research**, v. 6, n. 8, p. 1308-1315, 2008.

DOUDICAN, Nicole et al. Mebendazole induces apoptosis via Bcl-2 inactivation in chemoresistant melanoma cells. **Molecular Cancer Research**, v. 6, n. 8, p. 1308-1315, 2008.

EL-ON, Joseph. Benzimidazole treatment of cystic echinococcosis. **Acta tropica**, v. 85, n. 2, p. 243-252, 2003.

ESPEJO, Romero H.; NAVARRETE, Siancas J. Classification of stomach adenocarcinomas. **Revista de gastroenterologia del Peru: organo oficial de la Sociedad de Gastroenterologia del Peru**, v. 23, n. 3, p. 199-212, 2002.

FENOGLIO-PREISER, C. M. et al. TP53 and gastric carcinoma: a review. **Human mutation**, v. 21, n. 3, p. 258-270, 2003.

FOULDS, L. The experimental study of tumor progression: a review. **Cancer research**, v. 14, n. 5, p. 327-339, 1954.

FOX, J.T.; SAKAMURUB, S.; HUANGB, R.; TENEVAA, N.; SIMMONSC, S.O.; XIAB, M.; TICED, R.R.; AUSTINB, C.P.; MYUNGA, K. High-throughput genotoxicity assay identifies antioxidants as inducers of DNA damage response and cell death. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 14, p. 5423–5428, 2012.

FRANKFURT OS, SECKINGER D, SUGARBAKER EV. Pleiotropic drug resistance and survival advantage in leukemia cells with diminished apoptotic response. *Int J Cancer* 1994; **59**: 217–224.

FRIESEN, C.; HERR, I.; KRAMMER, P.H.; DEBATIN, K.M. Involvement of the CD95 (APO-1/Fas) receptor/ligand system in drug-induced apoptosis in leukemia cells. **Nature medicine**, v. 2, n. 5, p. 574, 1996.

FROMME, J. Christopher; VERDINE, Gregory L. Base excision repair. **Advances in protein chemistry**, v. 69, p. 1-41, 2004.

FUKUSHIMA, T.; UEDA, T; UCHIDA, M.; NAKAMURA, T. Action mechanism of idarubicin (4-demethoxydaunorubicin) as compared with daunorubicin in leukemic cells. **International journal of hematology**, v. 57, n. 2, p. 121-130, 1993.

FULDA, S.; SIEVERTS, H.; FRIESEN, C.; HERR, I.; DEBATIN, K.M. The CD95 (APO-1/Fas) system mediates drug-induced apoptosis in neuroblastoma cells. **Cancer research**, v. 57, n. 17, p. 3823-3829, 1997.

GALLUZZI, Lorenzo et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. **Cell Death & Differentiation**, v. 19, n. 1, p. 107-120, 2012.

GARRISON RN , KAELIN LD , GALLOWAY RH , HEUSER LS . **ascite maligna. As observações clínicas e experimentais. Annals of surgical oncology**. Ann Surg. 1986 Jun; 203 (6): 644-51.

Gene card. Disponível em: <<https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=FAS>> Acesso em: 05 de setembro de 2018.

GEWIRTZ, D.A. A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. **Biochemical pharmacology**, v. 57, n. 7, p. 727-741, 1999.

GUNDUZ, U.; KESKIN, T.; TANSIK, G.; MUTLU, P.; YALCIN, S.; UNSOY, G.; YAKAR, A.; KHODADUST, R.; GUNDUZ, G. Idarubicin-loaded folic acid conjugated magnetic nanoparticles as a targetable drug delivery system for breast cancer. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 68, n. 6, p. 729-736, 2014.

HAMILTON, Stanley R. et al. (Ed.). **Pathology and genetics of tumours of the digestive system**. Lyon: IARC press, 2000.

HAMPTON, Mark B.; FADEEL, Bengt; ORRENIUS, Sten. Redox regulation of the caspases during apoptosis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 854, n. 1, p. 328-335, 1998.

HAN Y, ZHAO J, HUANG R, XIA M, WANG D. **Omics-Based Platform for Studying Chemical Toxicity Using Stem Cells**. *J Proteome Res.* 2018 Jan 5;17(1):579-589. doi: 10.1021/acs.jproteome.7b00693. Epub 2017 Dec 20.

HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. Hallmarks of cancer: the next generation. *cell*, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.

HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. The hallmarks of cancer. *cell*, v. 100, n. 1, p. 57-70, 2000.

HANDE, K.R. Topoisomerase II inhibitors. **Update on Cancer Therapeutics**, v. 3, n. 1, p. 13-26, 2008.

HANDE, Kenneth R. Topoisomerase II inhibitors. **Update on cancer therapeutics**, v. 3, n. 1, p. 13-26, 2008.

HAROUSSEAU, J.L.; HURTELOUP, P.; REIFFERS, J. Idarubicin in the treatment of relapsed or refractory acute myeloid leukemia. **Cancer treatment reports**, v. 71, n. 10, p. 991, 1987.

HASSAN, M.; WATARI, H.; ABUALMAATY, A.; OHBA, Y.; SAKURAGI, N. Apoptosis and Molecular Targeting Therapy in Cancer. **BioMed Research International**. v. 2014, ID 150845, 23 páginas, 2014.

HAYES, N. et al. Peritoneal cytology in the surgical evaluation of gastric carcinoma. **The British Journal of Surgery**, v. 83, n. 6, p. 20-21, 1996.

HAYES, Nick et al. Peritoneal cytology in the surgical evaluation of gastric carcinoma. **British Journal of cancer**, v. 79, n. 3-4, p. 520, 1999.

HE L, SHI L, DU Z, HUANG H, GONG R, MA L, CHEN L<sup>3</sup>, GAO S<sup>5</sup>, LYU J<sup>6</sup>, GU H<sup>7</sup>. **Mebendazole exhibits potent anti-leukemia activity on acute myeloid leukemia**. *Exp Cell Res.* 2018 Aug 1;369(1):61-68. doi: 10.1016/j.yexcr.2018.05.006. Epub 2018 May 8.

HEJNA, Michael et al. Postoperative chemotherapy for gastric cancer. **The oncologist**, v. 11, n. 2, p. 136-145, 2006.

HERR, I; WILHELM, D.; BOHLER, T.; ANGEL, P.; DEBATIN, K.M. Activation of CD95 (APO-1/Fas) signaling by ceramide mediates cancer therapy-induced apoptosis. **The EMBO Journal**, v. 16, n. 20, p. 6200-6208, 1997.

HIGGINS, C.F. ABC transporters: from microorganisms to man. **Annual review of cell biology**, v. 8, n. 1, p. 67-113, 1992.

HIGUCHI, K.; TANABE, S.; AZUMA, M.; SASAKI, T.; ISHIDO, K.; KOIZUMI, W. Future perspectives for the development of chemotherapy for advanced gastric cancer: Japanese and global status. *Pathobiology: Journal of Immunopathology, Molecular, and Cellular Biology*, v. 78, n. 6, 2011.

HOLLINGSHEAD LM, FAULDS D. Idarubicin. **A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential in the chemotherapy of cancer.** *Drugs*. 1991 Oct;42(4):690-719.

HORWITZ, S. B. Mechanism of action of Taxol. **Trends in Pharmacological Science**, v. 13, p. 134-136, 1992.

Hospira Produtos Hospitalares Ltda. LLD\_Bra\_v1\_EVDPOI\_01\_VPS 10 05/Jul/2016 . MS - 1.6250.0014 [www.hospira.com.br](http://www.hospira.com.br) .

IAN, Freshney R. *Culture of animal cells: A manual of basic technique and specialized applications*. 2010.

IKEDA, K., KAJIWARA, K., TANABE, E., TOKUMARU, S., KISHIDA, E., MASUZAWA, Y., and Kojo, S. (1999) *Biochem. Pharmacol.* 57, 1361-1365.

Ikeda, K., Kajiwara, K., Tanabe, E., Tokumaru, S., Kishida, E., Masuzawa, Y.,

INCA - Instituto Nacional do Câncer. Estimativa 2015- Incidência de câncer no Brasil. Disponível em: <http://www.inca.org.br>. Acessado: 03 de março de 2017.

INCA - Instituto Nacional do Câncer. Estimativa 2016/2017- Incidência de câncer no Brasil. Disponível em: <http://www.inca.org.br>. Acessado: 21 de março de 2017.

INCA - Instituto Nacional do Câncer. Estimativa 2016/2017- Incidência de câncer no Brasil. Disponível em: <http://www.inca.org.br>. Acessado: 02 de setembro de 2018.

INCA. Instituto Nacional do Câncer. Câncer no Brasil. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/cancernobrasil/2011>. Acessado: 20 de março de 2017.

INCA. Instituto Nacional do Câncer. Câncer no Brasil. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/cancernobrasil/2013>. Acessado: 20 de março de 2017.

INCA. Instituto Nacional do Câncer. Formação do Câncer. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/2014>. Acessado: 21 de março de 2017.

ITOH, N.; YONEHARA, S.; ISHII, A.; YONEHARA, M.; MIZUSHIMA, S.; SAMESHIMA, M.; HASE, A.; SETO, Y.; NAGATA, S. The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. **Cell**, v. 66, n. 2, p. 233-243, 1991.

JACQUET, Pierre et al. Analysis of morbidity and mortality in 60 patients with peritoneal carcinomatosis treated by cytoreductive surgery and heated intraoperative intraperitoneal chemotherapy. **Cancer**, v. 77, n. 12, p. 2622-2629, 1996.

JANSSEN Inc. Product Monograph VERMOX® Mebendazole Tablets House Std., Toronto (2014), pp. 1–12 (177059)

JAPANESE CLASSIFICATION OF GASTRIC CARCINOMA: 3rd English edition. Gastric cancer: official journal of the International Gastric Cancer Association and the Japanese Gastric Cancer Association, v. 14, n. 2, p. 101-112, 2011.

JEMAL, Ahmedin et al. Global cancer statistics. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 61, n. 2, p. 69-90, 2011.

JENSEN P. B., B. S. SØRENSEN, M. SEHESTED, E. J. DEMANT, E. KJELDSSEN, E. FRICHE, H. H. HANSEN, **Biochem. Pharmacol.** 1993, 45(10), 2025–2035.

JORDAN, M.A.; WENDELL, K.; GARDINER, S.; DERRY, W.B.; COPP, H.; WILSON, L. Mitotic block induced in HeLa cells by low concentrations of paclitaxel (Taxol) results in abnormal mitotic exit and apoptotic cell death. **Cancer Research**, v. 56, n.4, p. 816-825, 1996.

KAJIWARA, K. et al. Hydrogen peroxide and hydroxyl radical involvement in the activation of caspase-3 in chemically induced apoptosis of HL-60 cells. **Cellular and Molecular Life Sciences CMLS**, v. 58, n. 3, p. 485-491, 2001.

KARCH, A.; KOCH, A.; GRÜNWALD, V. A phase II trial comparing pazopanib with doxorubicin as first-line treatment in elderly patients with metastatic or advanced soft tissue sarcoma (EPAZ): study protocol for a randomized controlled trial. **Trials**, v. 17, n. 1, p. 312, 2016.

KAUFMANN, Scott H.; EARNSHAW, William C. Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. **Experimental cell research**, v. 256, n. 1, p. 42-49, 2000

KHAN, Farhat Aziz et al. Pathogenesis and treatment of gastric carcinoma: " an up-date with brief review". **Journal of cancer research and therapeutics**, v. 2, n. 4, p. 196, 2006.

KIMSEY, Isaac J. et al. Visualizing transient Watson-Crick-like mispairs in DNA and RNA duplexes. **Nature**, v. 519, n. 7543, p. 315-320, 2015.

KÖHLER, Peter. The biochemical basis of anthelmintic action and resistance. 2001.

KONTUREK, P. C. et al. Helicobacter pylori infection in gastric cancerogenesis. **J Physiol Pharmacol**, v. 60, n. 3, p. 3-21, 2009.

KROEMER, Guido; ZAMZAMI, Naoufal; SUSIN, Santos A. Mitochondrial control of apoptosis. **Immunology today**, v. 18, n. 1, p. 44-51, 1997.

KUNKEL, Thomas A. Evolving views of DNA replication (in) fidelity. In: Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2009. p. 91-101.

LACEY, E. The role of the cytoskeletal protein, tubulin, in the mode of action and mechanism of drug resistance to benzimidazoles. **International journal for parasitology**, v. 18, n. 7, p. 885-936, 1988.

LARSEN, A.R.; BAI, R.Y.; CHUNG, J.H.; BORODOVSKY, A.; RUDIN, C.M.; RIGGINS, G.J.; BUNZ, F. Repurposing the antihelminthic mebendazole as a hedgehog inhibitor. **Molecular cancer therapeutics**, v. 14, n. 1, p. 3-13, 2015.

LAURENT, G.; JAFFRÉZOU, J.P. Signaling pathways activated by daunorubicin. **Blood**, v. 98, n. 4, p. 913-924, 2001.

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, 2009.

LI Y, WANG Y, ZHOU Y, LI J, CHEN K, ZHANG L, DENG M, DENG S, LI P, XU B. **Cooperative effect of chidamide and chemotherapeutic drugs induce apoptosis by DNA damage accumulation and repair defects in acute myeloid leukemia stem and progenitor cells**. Clin Epigenetics. 2017 Aug 14;9:83. doi: 10.1186/s13148-017-0377-8. eCollection 2017.

LI, Kongfei *et al.* Sequential combination of decitabine and idarubicin synergistically enhances anti-leukemia effect followed by demethylating Wnt pathway inhibitor promoters and downregulating Wnt pathway nuclear target. **Journal of translational medicine**, v. 12, n. 1, p. 167, 2014.

LI, YIN *et al.* Cooperative effect of chidamide and chemotherapeutic drugs induce apoptosis by DNA damage accumulation and repair defects in acute myeloid leukemia stem and progenitor cells. **Clinical epigenetics**, v. 9, n. 1, p. 83, 2017.

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

LIONETTO, R.; PRONZATO, P.; CONTE, P.F.; SERTOLI, M.R.; AMOROSO, D.; ROSSO, R. Idarubicin in advanced breast cancer: a phase II study. **Cancer treatment reports**, v. 70, n. 12, p. 1439-1440, 1986.

LIU, L.F. DNA topoisomerase poisons as antitumor drugs. **Annual review of biochemistry**, v. 58, n. 1, p. 351-375, 1989.



LIU, Y.; CHEN, F.; WANG, S.; GUO, X.; SHI, P.; WANG, W.; XU, B. Low-dose triptolide in combination with idarubicin induces apoptosis in AML leukemic stem-like KG1a cell line by modulation of the intrinsic and extrinsic factors. **Cell death & disease**, v. 4, n. 12, p. e948, 2013.

LOMBARDI, Duccio; LASAGNI, Laura. Cell-cycle Alterations in Post-mitotic Cells and Cell Death by Mitotic Catastrophe. In: **Cell Biology-New Insights**. InTech, 2016.

LONG, B. H., FAIRCHILD, C. R. Paclitaxel inhibits progression of mitotic cells to G1 phase by interference with spindle formation without affecting other microtubule functions during anaphase and telephase. **Cancer Research**, v. 54, p. 4355–4361, 1994.

LORENZO, E.; RUIZ-RUIZ, C.; QUESADA, A.J.; HERNÁNDEZ, G.; RODRÍGUEZ, A.; LÓPEZ-RIVAS, A.; & REDONDO, J.M. Doxorubicin induces apoptosis and CD95 gene expression in human primary endothelial cells through a p53-dependent mechanism. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 13, p. 10883-10892, 2002.

LOTFI, K.; ZACKRISSON, A.L.; PETERSON, C. Comparison of idarubicin and daunorubicin regarding intracellular uptake, induction of apoptosis, and resistance. **Cancer letters**, v. 178, n. 2, p. 141-149, 2002.

LOWENTHAL, R.M.; CHESTERMAN, C.N.; GRIFFITHS, J.D.; ET AL. Oral idarubicin as single-agent treatment of acute nonlymphocytic leukemia in poor-risk patients. **Cancer treatment reports**, v. 71, n. 12, p. 1279-1281, 1987.

LYNCH, Michael. Rate, molecular spectrum, and consequences of human mutation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 3, p. 961-968, 2010.

MA, P.; DONG, X.; SWADLEY, C.L.; GUPTE, A.; LEGGAS, M.; LEDEBUR, H.C.; MUMPER, R.J. Development of idarubicin and doxorubicin solid lipid nanoparticles to overcome Pgp-mediated multiple drug resistance in leukemia. **Journal of biomedical nanotechnology**, v. 5, n. 2, p. 151-161, 2009.

MACDONALD, L.M.; ARMSON, A.; THOMPSON, A.R.; REYNOLDSON, J.A. Characterisation of benzimidazole binding with recombinant tubulin from *Giardia duodenalis*, *Encephalitozoon intestinalis*, and *Cryptosporidium parvum*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 138, p.89–96, 2004.

MALIK S.T.A.; TUCKER, J.; ROHATINER, A.Z.S.; BRACE, W.; LISTER, T.A. Oral idarubicin in the treatment of acute myelogenous leukaemia and the blast phase of chronic myeloid leukaemia. **Hematological oncology**, v. 7, n. 6, p. 423-427, 1989.

MANSILLA, S.; LLOVERA, L.; PORTUGAL, J. Chemotherapeutic targeting of celldeath pathways. **Anticancer Agents Med Chem**, n. 12, v. 3, p. 226-238, 2012.

MARBEUF-GUEYE, C.; ETTORI, D.; PRIEBE, W.; KOZLOWSKI, H.; GARNIER-SUILLEROT, A. Correlation between the kinetics of anthracycline uptake and the resistance factor in cancer cells expressing the multidrug resistance protein or the P-

glycoprotein. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1450, n. 3, p. 374-384, 1999.

MARTARELLI, Daniele et al. Mebendazole inhibits growth of human adrenocortical carcinoma cell lines implanted in nude mice. **Cancer chemotherapy and pharmacology**, v. 61, n. 5, p. 809-817, 2008.

MARTIN, SeamusJ et al. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. **Journal of Experimental Medicine**, v. 182, n. 5, p. 1545-1556, 1995.

MARTONI, A.; PACCIARINI, M.A.; PANNUTI, F. Activity of 4-demethoxydaunorubicin by the oral route in advanced breast cancer. **European Journal of Cancer**, v. 21, n. 7, p. 803-806, 1985.

MCGAHON, Anne J. et al. The end of the (cell) line: methods for the study of apoptosis in vitro. **Methods in cell biology**, v. 46, p. 153-185, 1995.

Medley Indústria Farmacêutica Ltda. <[http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila\\_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=7722732014&pIdAnexo=2213915](http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=7722732014&pIdAnexo=2213915)> acessado em 11 de novembro de 2018.

MENEGUELO R. Efeitos antiproliferativos e apoptóticos da fosfoetilonamina sintética no melanoma B16F10. (Dissertação de mestrado), UFSC (Universidade Federal de São Carlos) São Carlos, 2007. [http://teses.usp.br/teses/disponiveis/82/82131/tde.../TDE\\_RenatoMeneguelo.pdf](http://teses.usp.br/teses/disponiveis/82/82131/tde.../TDE_RenatoMeneguelo.pdf). Acessado: 30 de setembro de 2016.

MESSARITAKIS, J. ; PSYCHOU, P.; NICOLAIDOU, P. ; KARPATIOS, T.; SYRIOPOULOU, B.; FRETZAYAS, A.; KRIKOS, F.; MATSANIOTIS, N. High mebendazole doses in pulmonary and hepatic hydatid disease. **Archives of disease in childhood**, v. 66, n. 4, p. 532-533, 1991.

MICHEAU, O.; SOLARY, E.; HAMMANN, A.; DIMANCHE-BOITREL, M.T. Fas ligand-independent, FADD-mediated activation of the Fas death pathway by anticancer drugs. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 12, p. 7987-7992, 1999.

MIGNOTTE, Bernard; VAYSSIERE, Jean-Luc. Mitochondria and apoptosis. **European Journal of Biochemistry**, v. 252, n. 1, p. 1-15, 1998.

MINCIS, Moyses; MINCIS, Ricardo. Álcool e o fígado. **GED gastroenterol. endosc. dig.**, v. 30, n. 4, p. 152-162, 2011.

MINDERMAN H1, LINSSEN P, WESSELS J, HAANEN C. **Cell cycle related uptake, retention and toxicity of idarubicin, daunorubicin and doxorubicin.** *Anticancer Res.* 1993 Jul-Aug;13(4):1161-5.

Ministério da Saúde. Diretrizes Diagnósticas e Terapêuticas Adenocarcinoma de Estômago. Relatório de Recomendação. Janeiro de 2018.

MINOTTI G1, MENNA P, SALVATORELLI E, CAIRO G, GIANNI L. **Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity.** *Pharmacol Rev.* 2004 Jun;56(2):185-229.

MIZUTANI, H.; TADA-OIKAWA, S.; HIRAKU, Y.; KOLJIMA, M.; KAWANISHI, S. Mechanism of apoptosis induced by doxorubicin through the generation of hydrogen peroxide. **Life sciences**, v. 76, n. 13, p. 1439-1453, 2005.

MIZUTANI, Hideki et al. Mechanism of apoptosis induced by a new topoisomerase inhibitor through the generation of hydrogen peroxide. **Journal of Biological Chemistry**, 2002.

MIZUTANI, Hideki et al. Mechanism of apoptosis induced by a new topoisomerase inhibitor through the generation of hydrogen peroxide. **Journal of Biological Chemistry**, 2002.

MOSMANN, Tim. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MUKHOPADHYAY, Tapas et al. Mebendazole elicits a potent antitumor effect on human cancer cell lines both in vitro and in vivo. **Clinical cancer research**, v. 8, n. 9, p. 2963-2969, 2002.

MÜLLER, M.; STRAND, S.; HUG, H.; HEINEMANN, E.M.; WALCZAK, H.; HOFMANN, W.J.; GALLE, P.R. Drug-induced apoptosis in hepatoma cells is mediated by the CD95 (APO-1/Fas) receptor/ligand system and involves activation of wild-type p53. **The Journal of clinical investigation**, v. 99, n. 3, p. 403-413, 1997.

MÜLLER, M.; WILDER, S.; BANNASCH, D.; ISRAELI, D.; LEHLBACH, K.; LI-WEBER, M.; FRIEDMAN, S.L.; GALLE, P.R.; STREMMEL, W.; OREN, M.; KRAMMER, P.H. p53 activates the CD95 (APO-1/Fas) gene in response to DNA damage by anticancer drugs. **Journal of Experimental Medicine**, v. 188, n. 11, p. 2033-2045, 1998.

MÜNST, G. J.; KARLAGANIS, G.; BIRCHER, J. Plasma concentrations of mebendazole during treatment of echinococcosis. **European journal of clinical pharmacology**, v. 17, n. 5, p. 375-378, 1980.

MUZIO, M.; CHINNAIYAN, A.M.; KISCHKEL, F.C.; O'ROURKE, K.; SHEVCHENKO, A.; NI, J.; SCAFFIDI, C.; BRETZ, J.D.; ZHANG, M.; GENTZ, R.; MANN, M.; KRAMMER, P.H.; PETER, M.E.; DIXIT, V.M. FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. **Cell**, v. 85, n. 6, p. 817-827, 1996.

NAGY, J.A.; BENJAMIN, L; ZENG, H.; DVORAK, A.M.; DVORAK, H.F. Vascular permeability, vascular hyperpermeability and angiogenesis. **Angiogenesis**, v. 11, n. 2, p. 109-119, 2008.

NOMURA, A.; FRAUMENI, J.F.J. Cancer epidemiology and prevention. New York: Oxford University Press; 1996. p. 707-24.

NYGREN, P.; FRYKNÄS, M.; AGERUP, B.; LARSSON, R. Repositioning of the anthelmintic drug mebendazole for the treatment for colon cancer. **Journal of cancer research and clinical oncology**, v. 139, n. 12, p. 2133-2140, 2013.

OEHM, A.; BEHRMANN, I.; FALK, W.; PAWLITA, M.; MAIER, G.; KLAS, C.; LIWEBER, M.; RICHARDS, S.; DHEIN, J.; TRAUTH, B.C. Purification and molecular cloning of the APO-1 cell surface antigen, a member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor superfamily. Sequence identity with the Fas antigen. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 15, p. 10709-10715, 1992.

OLIVEIRA, I.G. **Investigação do potencial mutagênico e recombinogênico dos combinados gemcitabina+ doxorubicina e gemcitabina+ cisplatina em células somáticas de *Drosophila melanogaster***. Dissertação de mestrado. Goiânia: Universidade Federal de Goiás, 2011.

OSHEROFF, N.; CORBETT, A.H.; ROBINSON, M.J. Mechanism of action of topoisomerase II-targeted antineoplastic drugs. In: **Advances in pharmacology**. Academic Press, 1994. p. 105-126.

PAHL, H.L. Activators and target genes of Rel/NF- $\kappa$ B transcription factors. **Oncogene**, v. 18, n. 49, p. 6853-66, 1999.

PANG B., X. QIAO, L. JANSSEN, A. VELDS, T. GROOTHUIS, R. KERKHOVEN, M. NIEUWLAND, H. OVAA, S. ROTTENBERG, O. TELLINGEN, J. JANSSEN, P. HUIJGENS, W. ZWART, J. Neefjes, **Nat. Commun.** 2013. DOI:10.1038/ ncomms2921.

PARK, Jae-Gahb et al. Establishment and characterization of human gastric carcinoma cell lines. **International journal of cancer**, v. 70, n. 4, p. 443-449, 1997.

PESSOA, C. et al. Antiproliferative effects of compounds derived from plants of Northeast Brazil. **Phytotherapy Research**, v. 14, n. 3, p. 187-191, 2000.

PIAZUELO, María Blanca; CORREA, Pelayo. Gastric cancer: overview. **Colombia Medica**, v. 44, n. 3, p. 192-201, 2013.

PINTO, L.C.; MOREIRA-NUNES, C. D. F. A.; SOARES, B. M.; BURBANO, R. M. R.; DE LEMOS, J. A. R.; MONTENEGRO, R. C. Mebendazole, an antiparasitic drug, inhibits drug transporters expression in preclinical model of gastric peritoneal carcinomatosis. **Toxicology in Vitro**, v. 43, p. 87-91, 2017.

PINTO, Laine Celestino et al. The anthelmintic drug mebendazole inhibits growth, migration and invasion in gastric cancer cell model. **Toxicology in Vitro**, v. 29, n. 8, p. 2038-2044, 2015.

PINTO-DE-SOUSA, J. et al. Clinicopathologic profiles and prognosis of gastric carcinomas from the cardia, fundus/body and antrum. **Digestive surgery**, v. 18, n. 2, p. 102-110, 2001.

PISKA, K.; KOCZURKIEWICZ, P.; BUCKI, A.; WÓJCIK-PSZCZOŁA, K.; KOŁACZKOWSKI, M.; PEKALA, E. Metabolic carbonyl reduction of anthracyclines—role

in cardiotoxicity and cancer resistance. Reducing enzymes as putative targets for novel cardioprotective and chemosensitizing agents. **Investigational new drugs**, v. 35, n. 3, p. 375-385, 2017.

PISO, Pompiliu et al. Proximal versus distal gastric carcinoma—what are the differences? **Annals of surgical oncology**, v. 7, n. 7, p. 520-525, 2000.

PORUCHYNSKY, M.S.; KOMLODI-PASZTOR, E.; TROSTEL, S.; WILKERSON, J.; REGAIRAZ, M.; POMMIER, Y.; ZHANG, X.; KUMAR, M. T.; ROBEY, R.; BUROTTO, M.; SACKETT, D.; GUHA, U.; FOJO, A.T. Microtubule-targeting agents augment the toxicity of DNA-damaging agents by disrupting intracellular trafficking of DNA repair proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 5, p. 1571-1576, 2015.

PUBCHEM <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4030>> acessado em: janeiro de 2018

RABELO, Fernanda Elias Ferreira et al. Multimodal treatment of peritoneal malignancies—results of the implantation in a tertiary hospital. **Journal of Coloproctology (Rio de Janeiro)**, v. 32, n. 2, p. 106-112, 2012.

RIBEIRO, Hercules Ferreira et al. Cytogenetic characterization and evaluation of c-MYC gene amplification in PG100, a new Brazilian gastric cancer cell line. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 43, n. 8, p. 717-721, 2010.

ROUGIER, Ph et al. Gastric Cancer: Preoperative chemotherapy of locally advanced gastric cancer. **Annals of oncology**, v. 5, n. suppl\_3, p. S59-S68, 1994.

ROUKOS, D.H. e AGNANTIS, N.J. Gastric Cancer: Diagnosis, Staging, Prognosis. **Gastric Breast Cancer**, v.1, n. 1, p. 7-10, 2002.

ROWINSKY, E. K.; DONEHOWER, R. C. Paclitaxel (Taxol). **The New England Journal of Medicine**, v. 332, p. 1004–1014, 1995.

SAJID, M. S. et al. Immunomodulatory effect of various anti-parasitics: a review. **Parasitology**, v. 132, n. 03, p. 301-313, 2006.

SANGISETTY, Suma L.; MINER, Thomas J. Malignant ascites: a review of prognostic factors, pathophysiology and therapeutic measures. **World journal of gastrointestinal surgery**, v. 4, n. 4, p. 87, 2012.

SEABRA, A.D.; ARAÚJO, T.M.; MELLO JUNIOR, F.A.; DI FELIPE ÁVILA ALCÂNTARA D, DE BARROS, A.P, DE ASSUMPCÃO, P.P, MONTENEGRO, R.C.; GUIMARÃES, A.C.; DEMACHKI, S.; BURBANO, R.M.; KHAYAT, A.S. High-density array comparative genomic hybridization detects novel copy number alterations in gastric adenocarcinoma. **Anticancer research**, v. 34, n. 11, p. 6405-6415, 2014.

SELLECKCHEM. Disponível em: <<http://www.selleckchem.com/products/Idarubicin.html>> Acesso em: 17 de setembro de 2018.

SENGER, Donald R. et al. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. **Science**, v. 219, n. 4587, p. 983-985, 1983.

SHANG, Juan et al. Multidisciplinary approach to understand the pathogenesis of gastric cancer. **World journal of gastroenterology**, v. 11, n. 27, p. 4131, 2005.

SIMBULAN-ROSENTHAL, C.M.; DAKSHANAMURTHY, S.; GAUR, A.; CHEN, Y.S.; FANG, H.B.; ABDUSSAMAD, M.; ZHOU, H.; ZAPAS, J.; CALVERT, V.; PETRICOIN, E.F.; ATKINS, M.B.; BYERS, S.W.; ROSENTHAL, D.S. The repurposed anthelmintic mebendazole in combination with trametinib suppresses refractory NRASQ61K melanoma. **Oncotarget**, v. 8, n. 8, p. 12576, 2017.

SINGH, S.; PRADHAN, V.; PATWARDHAN, M.; GHOSH, K. APO-1/Fas gene: Structural and functional characteristics in systemic lupus erythematosus and other autoimmune diseases. **Indian journal of human genetics**, v. 15, n. 3, p. 98, 2009.

SOBIN, Leslie H. et al. TNM: classificação de tumores malignos. In: **TNM: classificação de tumores malignos**. INCA, 2004.

STRICKLAND, Stephen A. *et al.* Correlation of the microculture-kinetic drug-induced apoptosis assay with patient outcomes in initial treatment of adult acute myelocytic leukemia. **Leukemia & lymphoma**, v. 54, n. 3, p. 528-534, 2013.

SUDA, T.; TAKAHASHI, T.; GOLSTEIN, P.; NAGATA, S. Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. **Cell**, v. 75, n. 6, p. 1169-1178, 1993.

TADA-OIKAWA, Saeko et al. Generation of hydrogen peroxide precedes loss of mitochondrial membrane potential during DNA alkylation-induced apoptosis. **FEBS letters**, v. 442, n. 1, p. 65-69, 1999.

TAINTON, K.M.; SMYTH, M.J.; JACKSON, J.T.; TANNER, J.E.; CERRUTI, L.; JANE, S.M.; DARCY, P.K.; JOHNSTONE, R.W. Mutational analysis of P-glycoprotein: suppression of caspase activation in the absence of ATP-dependent drug efflux. **Cell death and differentiation**, v. 11, n. 9, p. 1028, 2004.

TANIGAWARA, Y. Role of P-glycoprotein in drug disposition. **Therapeutic drug monitoring**, v. 22, n. 1, p. 137-140, 2000.

TAVEIRA, Stephânia Fleury. **Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS) como carreadores de fármacos para o tratamento tópico do câncer de pele**. Tese de Doutorado. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2009.

THE AML COLLABORATIVE GROUP. A systematic collaborative overview of randomized trials comparing idarubicin with daunorubicin (or other anthracyclines) as induction therapy for acute myeloid leukaemia. **British Journal of Haematology**, v. 103, n. 1, p. 100-109, 1998.

TIDEFELT, U.; PRENKERT, M.; PAUL, C. Comparison of idarubicin and daunorubicin and their main metabolites regarding intracellular uptake and effect on sensitive and multidrug-resistant HL60 cells. **Cancer chemotherapy and pharmacology**, v. 38, n. 5, p. 476-480, 1996.

TOFFOLI, G.; SIMONE, F.; GIGANTE, M.; BOIOCCHI, M. Comparison of mechanisms responsible for resistance to idarubicin and daunorubicin in multidrug resistant LoVo cell lines. **Biochemical pharmacology**, v. 48, n. 10, p. 1871-1881, 1994.

TOMASETTI, Cristian; LI, Lu; VOGELSTEIN, Bert. Stem cell divisions, somatic mutations, cancer etiology, and cancer prevention. **Science**, v. 355, n. 6331, p. 1330-1334, 2017.

TOMASETTI, Cristian; VOGELSTEIN, Bert; PARMIGIANI, Giovanni. Half or more of the somatic mutations in cancers of self-renewing tissues originate prior to tumor initiation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 6, p. 1999-2004, 2013.

topoisomerases. *Biochem J* 1994;303:681–95.

UL - University of Leicester. Disponível em: <<http://www.le.ac.uk>>. Acessado em: 20 de maio de 2017.

VAN DER WESTHUIZEN, B.; NEWCOMB, K.; GUERRERO, J. Anthelmintic efficacy of mebendazole suspension against induced helminth infections in South African sheep and cattle. **American journal of veterinary research**, v. 45, n. 4, p. 779-782, 1984.

VICENTE-MANZANARES, Miguel; HORWITZ, Alan Rick. Cell migration: an overview. **Cell Migration: Developmental Methods and Protocols**, p. 1-24, 2011.

VOGELSTEIN, Bert; KINZLER, Kenneth W. The path to cancer—three strikes and you're out. **N Engl J Med**, v. 373, n. 20, p. 1895-1898, 2015.

VUTOVA, K. et al. Effect of mebendazole on human cystic echinococcosis: the role of dosage and treatment duration. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 93, n. 4, p. 357-365, 1999.

WANG, J.C. Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 3, n. 6, p. 430, 2002.

WANG, James C. Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 3, n. 6, p. 430, 2002.

WASHINGTON, Kay. of the AJCC cancer staging manual: stomach. **Annals of surgical oncology**, v. 17, n. 12, p. 3077-3079, 2010.

Watt PM, Hickson ID. Structure and function of type II DNA

Weinberg, Robert A. Mecanismos de progressão maligna. **Carcinogenesis**, v. 29, n. 6, p. 1092-1095, 2008.

WIERNIK, P.H.; BANKS, P.L.; CASE, D. J.; ARLIN, Z.A.; PERIMAN, P.O.; TODD, M.B.; RITCH, P.S.; ENCK, R.E.; WEITBERG, A.B. Cytarabine plus idarubicin or daunorubicin as induction and consolidation therapy for previously untreated adult patients with acute myeloid leukemia. **Blood**, v. 79, n. 2, p. 313-319, 1992.

WU, Xiaocheng et al. Incidence of esophageal and gastric carcinomas among American Asians/Pacific Islanders, whites, and blacks. **Cancer**, v. 106, n. 3, p. 683-692, 2006.

Yonemura Y, Sawa T, Kinoshita K, Matsuki N, Fushida S, Tanaka S, Ohoyama S, Takashima T, Kimura H, Kamata T, et al. **Neoadjuvant chemotherapy for high-grade advanced gastric cancer**. *World J Surg*. 1993 Mar-Apr;17(2):256-61; discussion 261-2.

YONEMURA, Y. et al. Prophylaxis with intraoperative chemohyperthermia against peritoneal recurrence of serosal invasion-positive gastric cancer. **World journal of surgery**, v. 19, n. 3, p. 450-454, 1995.

YVON, A.M.; WADSWORTH, P.; JORDAN, M.A. Taxol suppresses dynamics of individual microtubules in living human tumor cells. **Molecular Biology of the Cell**, v. 10, p. 947 – 59, 1999.

ZEBROWSKI, B.K.; LIU, W.; RAMIREZ, K.; AKAGI, Y.; MILLS, G.B.; ELLIS, L.M. Markedly elevated levels of vascular endothelial growth factor in malignant ascites. **Annals of surgical oncology**, v. 6, n. 4, p. 373, 1999.

ZHANG L, BOCHKUR DRATVER M, YAZAL T, DONG K, NGUYEN A, YU G, DAO A, BOCHKUR DRATVER M, DUHACHEK-MUGGY S, BHAT K, ALLI C, PAJONK F, VLASHI E. Mebendazole potentiates radiation therapy in triple-negative breast cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2018 Sep 6. pii: S0360-3016(18)33688-5. doi: 10.1016/j.ijrobp.2018.08.046. [Epub ahead of print]

ZHANG, Fugui et al. Anthelmintic mebendazole enhances cisplatin's effect on suppressing cell proliferation and promotes differentiation of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). **Oncotarget**, v. 8, n. 8, p. 12968, 2017.

ZHENG, Huachuan et al. Pathobiological characteristics of intestinal and diffuse-type gastric carcinoma in Japan: an immunostaining study on the tissue microarray. **Journal of clinical pathology**, v. 60, n. 3, p. 273-277, 2007.

ZUGBI S, WINTER U, CASTAÑON A, SAMPOR C, CHANTADA G, SCHAIQUEVICH P. **Comparison of the pharmacological activity of idarubicin and doxorubicin for retinoblastoma**. *Pediatr Blood Cancer*. 2018 Sep 5:e27441. doi: 10.1002/pbc.27441. [Epub ahead of print].