



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

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINEOPLÁSICA DOS FÁRMACOS
METFORMINA E MEBENDAZOL ISOLADOS E EM ASSOCIAÇÃO EM
LINHAGEM CELULAR DE CÂNCER GÁSTRICO METASTÁTICO**

Karla de Assis Silva

Belém-PA
2018

Karla de Assis Silva

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINEOPLÁSICA DOS FÁRMACOS
METFORMINA E MEBENDAZOL ISOLADOS E EM ASSOCIAÇÃO EM
LINHAGEM CELULAR DE CÂNCER 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 para a obtenção do título de Mestre em Oncologia e Ciências Médicas.

Orientador: 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)**

S586a

Silva, Karla de Assis Silva.
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINEOPLÁSICA DOS FÁRMACOS
METFORMINA E MEBENDAZOL ISOLADOS E EM ASSOCIAÇÃO EM
LINHAGEM CELULAR DE CÂNCER
GÁSTRICO METASTÁTICO / Karla de Assis Silva. — 2018.
61 f. : il. color.

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

1. adenocarcinoma gástrico. 2. metformina. 3. mebendazol. 4. linhagem celular. 5. efeito antineoplásico. I. Título.

CDD 571.638

Karla de Assis Silva

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINEOPLÁSICA DOS FÁRMACOS
METFORMINA E MEBENDAZOL ISOLADOS E EM ASSOCIAÇÃO EM
LINHAGEM CELULAR DE CÂNCER 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 para a obtenção do título de Mestre em Oncologia e Ciências Médicas.

Aprovado em: __/__/__

Banca Examinadora:

Orientador: Prof. Dr. André Salim Khayat (UFPA)

Prof. Dr. Paulo Pimentel de Assumpção (UFPA)

Prof. Dr. Ney Pereira Carneiro dos Santos (UFPA)

Dra. Luciana Gonçalves Quintana (UFPA)

FONTES FINANCIADORAS

Núcleo de Pesquisa em Oncologia – NPO

Johns Hopkins Hospital (Baltimore, USA)

Universidade Federal do Pará – UFPA

Dedico este trabalho aos meus pais Maria Angélica, Cristiano Neto e Carlos Robson, pelo amor, apoio e incentivo nesta caminhada.

AGRADECIMENTOS

“Mas, em todas estas coisas, somos mais que vencedores por meio daquEle que nos amou”

Rom 3,37

Agradeço a Deus por sempre ter guiado minha trajetória profissional e por ter providenciado tudo que necessitei para chegar até aqui.

Aos meus pais por me encorajarem a buscar novos desafios, por compreenderem meus anseios e estarem sempre por perto (mesmo que a milhares de km de distância) com as palavras de apoio que eu precisava ouvir.

À minha família e amigos pela torcida e por compreenderem meu distanciamento em certos momentos.

Agradeço ao Dr. Paulo Assumpção por ter me proporcionado este presente que foi o tema de minha pesquisa.

Agradeço à minha família do NPO, às queridas Susy e Sol e à todos os participantes do grupo “*et al.*”, que me acolheram e compartilharam comigo seus conhecimentos.

À Taíssa e Luciana, por me ensinarem a prática da bancada e sempre estarem dispostas a me ajudar em tudo que foi preciso.

Aos meus amigos “the cellulões” (Amanda, Marcelle e em especial, Eliel) pela companhia nas madrugadas e feriados. Com vocês a jornada foi mais leve!

Ao meu orientador André Khayat, agradeço pela sua dedicação à pesquisa, por ter me proporcionado crescer profissionalmente. Agradeço a confiança depositada em mim. Foi uma honra tê-lo como orientador e espero manter a parceria no doutorado.

RESUMO

O câncer gástrico será responsável por 782.685 óbitos em todo o mundo no ano de 2018, sendo a quinta causa mais comum de câncer no mundo e a quarta no Brasil. Por não apresentar sintomas patognomônicos, o diagnóstico do câncer gástrico acontece de forma tardia na maioria dos casos. Além disso, esta doença é amplamente resistente à quimioterapia citotóxica e à radioterapia, sendo a cirurgia de ressecção o tratamento que oferece maior potencial de cura. O adenocarcinoma é o subtipo de câncer de estômago mais comum, com incidência superior a 90%. Os fatores de risco para esta patologia são múltiplos e incluem aspectos genéticos, ambientais e alimentares. Os fármacos metformina e mebendazol, hoje utilizados nos tratamentos da diabetes e infecções parasitárias, respectivamente, apresentaram efeitos antineoplásicos em estudos de vários tipos de câncer. Para a metformina, foram descritos diversos possíveis mecanismos de ação anticâncer, entre eles a ativação da via LKB1/AMPK/mTOR. Já o mebendazol impede a polimerização das tubulinas, inibindo o crescimento e o poder de invasão das células cancerígenas. Sendo assim, o presente estudo tem como objetivo a avaliação do efeito da metformina e do mebendazol conhecidos por seus potenciais efeitos antineoplásicos e baixa toxicidade, de forma isolada e em associação na linhagem AGP01 (estabelecida a partir de células neoplásicas presentes no líquido ascítico de um indivíduo com câncer gástrico do tipo intestinal). Para este fim, foram realizados os seguintes testes *in vitro*: citotoxicidade do MTT, avaliação de viabilidade/apoptose e necrose, análise de ciclo celular e ensaio de migração. A metformina apresentou CI_{50} de 6,2mM e o mebendazol CI_{50} de 300nM administrados isoladamente, ao serem combinados houve um efeito sinérgico com novos valores de CI_{50} de 1,8mM e 88nM, respectivamente. Na migração celular a metformina inibiu a migração a partir do tempo de 12h e o mebendazol a partir do tempo de 24h, a combinação dos fármacos não demonstrou alteração no tempo de inibição, porém aumentou a confiabilidade do teste. Os fármacos mebendazol e metformina induziram a morte celular por apoptose e impediram a progressão do ciclo celular, aumentando a porcentagem de células na fase G1/G0 e diminuindo a porcentagem de células na fase S e G2/M. estes dados confirmam, ao menos em parte, os efeitos antineoplásicos destes fármacos.

Palavras-chave: Adenocarcinoma gástrico; linhagem celular; metformina; mebendazol; efeito antineoplásico.

ABSTRACT

Gastric cancer will account for 782,685 deaths worldwide in 2018, being the fifth most common cause of cancer in the world and a fourth in Brazil. For example, the diagnosis of pathognomonic cases, the diagnosis of gastric cancer occurs late in most cases. In addition, this is a series of patients with chemotherapy and radiotherapy, being a resection surgery that offers the greatest healing potential. Adenocarcinoma is the most common subtype of lung cancer, with incidence greater than 90%. The risk factors for the pathology are multiple and cover the genetic, environmental and food. The drugs metformin and mebendazole, now used in the processes of diabetes and parasitic infections, are presented as antineoplastic effects in studies of various types of cancer. For metformin, it is possible that anticancer mechanisms of action, among others, may be made viable by LKB1 / AMPK / mTOR. Mebendazole prevents the polymerization of tubulins, inhibiting the growth and invasiveness of cancer cells. Thus, the present study has as a preventive effect metformin and mebendazole, known for their anti-neoplastic antibodies and low toxicity, in isolation and in combination with AGP01 (prescribed from neoplastic cells present in the patient with gastric ascites fluid of the intestinal type). This study is in vitro: MTT cytotoxicity, viability / apoptosis and necrosis assessment, cell cycle analysis and migration assay. One metformine had 6.2mM IC₅₀ and the 300mM IC₅₀ mebendazole given alone, when combined with a new level of new IC₅₀ values of 1.8mM and 88nM, respectively. The cell migration was inhibited for the metformin from the time of 12h and mebendazole from the time of 24h, a combination of the drugs showed no change in the time of inhibition, but increased the reliability of the test. Mebendazole and metformin induced cell death by apoptosis and prevented cell cycle progression, increasing the percentage of cells in the G1 / G0 phase and decreasing the percentage of cells in the S phase and G2 / M phase. These data confirm, at least in the antineoplastic effects of these drugs.

Keywords: Gastric adenocarcinoma; cell lineage; metformin; mebendazole; antineoplastic effect.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Anatomia do estômago.

Figura 2- Tipos histológicos do adenocarcinoma gástrico.

Figura 3- Mebendazol e formação de microtúbulos em células de glioblastoma.

Figura 4 - Modelos de camundongos com xenoinxerto de glioblastoma.

Figura 5 - Potenciais mecanismos antineoplásicos de ação direta da metformina.

Figura 6 - Mecanismo da metformina provoca a translocação do K-Ras ativado da membrana plasmática e promove a morte celular.

Figura 7- Gráficos migração celular.

Figura 8- Fotografia migração celular após tratamento com mebendazol.

Figura 9- Fotografia migração celular após tratamento com metformina.

Figura 10- Fotografia migração celular após tratamento com metformina e mebendazol.

Figura 11- Análise do efeito dos fármacos metformina e mebendazol no ciclo celular.

Figura 12- Ilustração de células em apoptose por microscópio de fluorescência.

Figura 13- Análise do efeito dos fármacos metformina e mebendazol na indução da apoptose.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Classificação do TNM patológico.

Tabela 2- Grupamento por grupo de prognóstico.

Tabela 3- Atividade citotóxica do mebendazol *in vitro*.

Tabela 4- Concentrações do CI_{50} e $\frac{1}{2} CI_{50}$ para metformina e mebendazol.

Tabela 5- Curva de concentrações para definição do CI_{50} .

Tabela 6- Cálculos usados para definir os valores absolutos dos CI_{50} em associação.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGP01-Ascite Gástrica Paraense 01
AIPC- Agência Internacional de Pesquisa ao Câncer
AJCC- *American Joint Committee on Cancer*
AMP- Adenosina monofostato
AMPK- Proteína quinase ativada por AMP
ATP- Adenosina trifostato
CLP- Citológico do Lavado Peritoneal
CP- Carcinomatose Peritoneal
DNA- Ácido desoxirribonucleico
EMR- Ressecção Endoscópica da Mucosa
EMT- Transição epitélio-mesenquimal
FAP- Polipose Adenomatosa Familiar
FDA- *Food and Drug Administration*
Hh- Hedgehog
HIPEC- Quimioterapia Intraperitoneal Hipertérmica
IC₅₀- Concentração Inibitória de 50% das células
IDH- Índice de Desenvolvimento Humano
IL- Interleucina
INCA- Instituto Nacional do Câncer
IR- Receptores de Insulina
LKB1- Serina/threonina kinase 1
MAP-K- Proteína quinase ativada por mitógenos
MBZ- Mebendazol
MET- Metformina
mTOR- Alvo da rapamicina em mamíferos
MTX- Metotrexato
OMS- Organização Mundial da Saúde
p53- Proteína supressora de tumor 53
STAT3-Transdutores de Sinal e Ativadores da Transcrição 3
TGF β- Fator de Crescimento Transformante β
UICC- *Union Internationale Contre Le Cancer*
5-FU- 5-Fluoracil
1/2IC₅₀- metade do IC₅₀

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS	13
1.2 ADENOCARCINOMA GÁSTRICO.....	17
1.3 CARCINOMATOSE PERITONEAL.....	22
1.4 TRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO	24
1.5 NOVAS ABORDAGENS TERAPÊUTICAS	25
1.5.1 MEBENDAZOL	26
1.5.2 METFORMINA	29
1.6 LINHAGEM CELULAR	34
2 APLICABILIDADE CLÍNICA	35
3 OBJETIVOS	36
3.1 OBJETIVO GERAL	36
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
4 METODOLOGIA	37
4.1 CULTURA DE CÉLULAS	37
4.2 MEBANDAZOL E METFORMINA.....	37
4.3 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR POR CITOTOXIDADE DO MTT 3-(5-DIMETHYLTHIAZOL-2-YL)-2,5-DIPHENYLTETRAZOLIUM BROMIDE.....	37
4.4. ANÁLISE DO ÍNDICE DE MORTE CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO	39
4.5 ANÁLISE DE CICLO CELULAR	40
4.6 ENSAIO DE MIGRAÇÃO (<i>SCRATCH ASSAY</i>).....	41
4.7 ANÁLISE DOS DADOS	42
5 RESULTADOS	43
5.1 EFEITO DA METFORMINA E MEBENDAZOL NA CITOTOXICIDADE CELULAR ATRAVÉS DO ENSAIO DO MTT.....	43

5.2 EFEITO DA METFORMINA E DO MEBENDAZOL, ISOLADOS E EM ASSOCIAÇÃO, NA MIGRAÇÃO CELULAR POR MEIO DO <i>SCRATCH ASSAY</i>	44
5.3 EFEITO DA METFORMINA E DO MEBENDAZOL, ISOLADOS E EM ASSOCIAÇÃO, NO CICLO CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO	48
5.4 EFEITO DA METFORMINA E DO MEBENDAZOL, ISOLADOS E EM ASSOCIAÇÃO, NA MORTE CELULAR, POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	49
6 DISCUSSÃO	52
7 CONCLUSÃO.....	56
REFERÊNCIAS.....	57

1. INTRODUÇÃO

1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se para outras regiões do corpo. Trata-se de uma doença multifatorial, resultante da interação entre fatores extrínsecos e intrínsecos que podem agir tanto em conjunto como em sequência para iniciar ou promover a carcinogênese (*American Cancer Society*, 2015; INCA, 2017).

O surgimento do câncer é resultado tanto de fatores genéticos, no caso de mutações no material genético, como epigenéticos, ou seja, na regulação da expressão gênica não resultante de mudança em sequências do DNA. Neste sentido, a expressão gênica associada a fatores ambientais pode ser o ponto de partida para o desenvolvimento de diferentes tipos de câncer, acreditando-se que fatores epigenéticos possam desencadear os primeiros gatilhos da tumorigênese (VERMA *et al.*, 2014). Outros fatores como a desregulação do sistema imunológico podem contribuir para o desenvolvimento da carcinogênese (VALENTE *et al.*, 2017).

A incidência deste conjunto de doenças tem se mostrado expressiva no mundo inteiro, especialmente em países em desenvolvimento, onde os números de novos casos por ano, pessoas que vivem diagnosticadas e mortes decorrentes da doença são maiores (WHO, 2018). Foi realizado um levantamento pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (AIPC) que apontou a incidência de 18,1 milhões de casos, com 9,5 milhões de mortes por todos os tipos de câncer, para o ano de 2018 e 29,5 milhões de casos com 16,3 milhões de mortes em 2040, para o câncer de estômago a previsão da incidência para o ano de 2018 é de 1.033.701 sendo o 3º tipo de câncer que mais mata (8,3%) mundialmente (GLOBAL CANCER OBSERVATORY, 2018).

Nos Estados Unidos, foi estimado um total de 1.688.780 de novos casos de câncer diagnosticados para o ano de 2017. De acordo com esta estimativa, o índice de mortalidade por câncer para o mesmo ano seria de 600.920 mortes, sendo a segunda principal causa de morte no país (*American Cancer Society*, 2017).

No Brasil, para o biênio 2018-2019, é estimada a ocorrência de 600 mil casos novos de câncer, para cada ano. Nesse sentido, os países em desenvolvimento serão responsáveis por 80% dos mais de 20 milhões de novos casos que são estimados até 2025 (INCA, 2018).

Os tipos de câncer mais comuns na população mundial são os que acometem pulmões, com números superiores a 2 milhões casos em 2018. Em seguida os tipos de neoplasias de tecido mamário, coloretal e próstata cuja estimativa para o ano de 2018 foi de 2,08; 1,8 e 1,2 milhões de casos, respectivamente (GLOBAL CANCER OBSERVATORY, 2018).

A estimativa mundial apontou a ocorrência de mais de um milhão de casos de câncer de estômago (5,7% do total) para o ano de 2018, configurando-o como o quinto tipo mais comum de câncer, sendo duas vezes mais frequente no sexo masculino do que no feminino. No que se refere à mortalidade, a estimativa também para o ano de 2018 foi de 782.685 óbitos ocasionados por câncer de estômago em todo o mundo (GLOBOCAN, 2018). A maioria dos casos ocorre em países em desenvolvimento, como citado anteriormente, com médio ou baixo IDH, e alta prevalência de infecção pela bactéria *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) (INCA, 2016).

O câncer gástrico é distribuído geograficamente em menores taxas na África Ocidental, 3,3/100 mil e 2,6/100 mil para os sexos masculino e feminino, respectivamente. Na Ásia Oriental, foram identificadas as taxas mais elevadas, variando de 13,8/100 mil para as mulheres e 35,4/100 mil para os homens (FERLAY *et al.*, 2015; FORMAN *et al.*, 2014).

Em alguns países, como o Japão e Coreia, onde as taxas de incidência são elevadas, houve uma melhora no prognóstico do câncer gástrico devido a instalação de programas nacionais de rastreio, possibilitando o diagnóstico em estágios iniciais da doença. Nos demais países a doença é frequentemente diagnosticada em fase avançada, limitando as opções terapêuticas (ROCKEN, 2017).

Este tipo de câncer apresenta taxas de incidência e mortalidade proporcionais, tendo valores de 24/100 mil para homens e 9,8/100 mil em mulheres em populações asiáticas. Em população norte-americana, as taxas em homens e mulheres foram de 2,8/100 mil e 1,5/100 mil, respectivamente (FERLAY *et al.*, 2013, 2015; STEWART, WILD, 2014). Os dados brasileiros apontaram em 2015 um total de 9.132 óbitos por câncer de estômago em homens e 5.132 em mulheres (BRASIL, 2017).

No Brasil, assim como no panorama mundial, o câncer gástrico é o quarto tipo de câncer mais incidente em homens e o sexto em mulheres, totalizando cerca de 21.290 novos casos segundo estimativas para o ano de 2018, com estimativa semelhante para 2019. Estes dados refletem um risco estimado de 13,11 a cada 100 mil habitantes/homens e 7,32 a cada 100 mil/mulheres (INCA, 2018).

Nas regiões norte e nordeste o câncer de estômago é o segundo mais frequente em homens com as respectivas taxas de acometimento, 12,35/100 mil homens e 11,17/100 mil

mulheres, seguido pelas regiões sul e centro-oeste, sendo o quarto mais frequente também para o sexo masculino com as taxas de 17,12/100 mil e 11,52/100 mil, respectivamente. Já na Região Sudeste (13,46/100 mil), ocupa a quinta posição para homens. Para as mulheres, é o quinto mais frequente nas Regiões Sul (8,95/100 mil), Centro-Oeste (6,52/100 mil) e Norte (5,34/100 mil). Ocupa a sexta posição no Nordeste (7,16/100 mil) e a sétima no Sudeste (7,41/100 mil) (INCA, 2018).

No estado do Pará, o câncer gástrico é o segundo tipo de câncer mais incidente nos homens (24,82/100 mil habitantes), perdendo apenas para o câncer de próstata. Entre as mulheres é o quinto mais incidente (11,45/100mil habitantes), segundo estimativas para o ano de 2018 (INCA, 2018). Além disso, foi o responsável por 7,31% das notificações de óbito no período de 2010 a 2014 (INCA, 2014).

Apesar de o câncer gástrico ser o quinto tipo de câncer mais incidente no mundo (PARK *et al.*, 2018), a incidência e mortalidade por adenocarcinoma gástrico apresenta-se em declínio nos países desenvolvidos, provavelmente devido à erradicação da *Helicobacter pylori* e à implantação de programas de rastreio de câncer gástrico (LIU *et al.*, 2017).

A infecção crônica do estômago com *H. pylori* está associada a mutações em genes de células epiteliais, inibição de apoptose, estimulação da angiogênese e aumento da proliferação celular. Características deste patógeno considerado indutor de modificações a níveis celular e molecular na mucosa gástrica são fundamentais para compreender alguns dos mecanismos associados ao risco aumentado do desenvolvimento de câncer no tecido colonizado (RIVAS-ORTIZ, 2017).

A *H. pylori* é um bacilo gram-negativo conhecido por participar no desenvolvimento de gastrite atrófica, úlcera péptica (úlcera gástrica e duodenal) e câncer gástrico de tipo intestinal. Sendo considerada carcinógeno tipo 1 desde de 1994 pela OMS (carcinógenos para os quais já há evidência suficiente de ligação com o câncer), esta bactéria, através de diversos mecanismos, é capaz de recrutar as células da resposta imune intensificando a inflamação local (KREJS, 2010).

Diversos estudos demonstraram que os antígenos extraídos de *H. pylori* possuem atividade quimiotática in vitro para monócitos e neutrófilos. A mucosa gástrica infectada contém uma população significativa de macrófagos que produzem óxido nítrico, interleucina 6 (IL-6), IL-1 β , TNF- α e interleucina 12 (IL-12), que ajudam a estabelecer uma resposta Th1 responsável por produzir IFN- γ e alguns interleucina 4 (IL-4) e interleucina 5 (IL-5). Células dendríticas menores também estão presentes e respondem a infecção por *H. pylori* com a produção de IL-6, IL-8, IL-10 e IL-12. Foi proposto que a gastrite crônica persistente durante

a infecção por *H. pylori* gera um microambiente onde os mediadores inflamatórios ativam caminhos de sinalização que podem levar à tumorigênese gástrica (RIVAS-ORTIZ, 2017).

O câncer de estômago é uma doença multifatorial em que principalmente o estilo de vida pode determinar o desenvolvimento da neoplasia, progressão da doença e resposta a terapias. Os principais fatores de risco que levam ao desenvolvimento do câncer de estômago são: dieta rica em alimentos defumados (contendo nitritos ou compostos de nitrosamina), tabagismo, infecção pelo vírus Epstein-Baar e pela bactéria *H. pylori*, pólipos gástricos, obesidade, radiação, anemia perniciosa, cirurgia gástrica prévia, tipo sanguíneo A, além de fatores hereditários, entre outros (STEWART, WILD, 2014).

Fatores hereditários contribuem em menor grau para o desenvolvimento deste tipo de câncer, uma vez que estão envolvidos em torno de 2% dos casos. No entanto, algumas síndromes associadas a estes fatores estão relacionadas ao desenvolvimento de neoplasias no estômago. Estas síndromes são caracterizadas como síndrome de Lynch, polipose adenomatosa familiar (FAP), mutações nos genes BRCA1 e BRCA2, síndrome de Li-Fraumeni, síndrome de Peutz-Jeghers (PJS) e história familiar de câncer de estômago câncer hereditário difuso gástrico (mutação no gene *CDHI*) (KREJS, 2010; *American Cancer Society*, 2017).

Para o câncer hereditário difuso gástrico, o *International Gastric Cancer Linkage Consortium* se baseia em critérios clínicos para definição da relação hereditária. Estes critérios são: (1) dois ou mais casos documentados de câncer gástrico difuso em parentes de primeiro ou segundo grau, com pelo menos um deles diagnosticado antes da idade de 50 anos; ou (2) três ou mais casos documentados de câncer gástrico difuso em parentes de primeiro ou segundo grau, independentemente da idade do diagnóstico. Neste último critério, se soma o risco aumentado de câncer de mama lobular apresentado pelas mulheres. O evento causal deste tipo de alteração é primariamente devido a alterações no gene *CDHI*, que codifica a E-caderina, modificações estas detectadas em 30 a 40% dos casos diagnosticados. Assim, foi proposto um modelo para detecção precoce de desenvolvimento desta neoplasia em portadores de mutação no gene *CDHI*. Esta caracterização aponta para modificações que abrangem lesões precursoras (intraepiteliais) (carcinoma in situ e disseminação de células do anel de signet), carcinoma intramucoso inicial e câncer avançado (STEWART *et al.*, 2014).

O adenocarcinoma gástrico e polipose proximal do estômago foram recentemente identificados como uma síndrome hereditária. São caracterizados pela transmissão autossômica dominante da polipose das glândulas fundibiliares, incluindo áreas de displasia ou adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal, restrito ao estômago proximal, sem evidência

de polipose colorretal ou duodenal ou outras síndromes hereditárias de câncer gastrointestinal. O defeito genético por trás dessa síndrome ainda não foi elucidado (STEWART *et al.*, 2014).

O diagnóstico do câncer gástrico, na grande maioria das vezes é feito de forma tardia devido aos pacientes não apresentarem sintomas específicos ou serem assintomáticos, e a endoscopia digestiva alta é o principal exame realizado para verificar a presença de câncer de estômago, porém em alguns casos, como na síndrome de câncer gástrico difuso hereditário, muitas vezes não pode ser visto durante a endoscopia. Outro exame eficaz para o diagnóstico do câncer gástrico é a ecografia endoscópica que permite verificar as camadas da parede do estômago, bem como os gânglios linfáticos nas proximidades e outras estruturas fora do estômago. A grande parte das neoplasias malignas do estômago é representada por adenocarcinoma, superior a 90% dos casos, sendo o linfoma, o sarcoma, o tumor do estroma gastrointestinal e o tumor carcinóide os responsáveis pelos demais casos (*American Cancer Society*, 2017).

1.2 ADENOCARCINOMA GÁSTRICO

A incidência e mortalidade do adenocarcinoma gástrico estão em declínio em países desenvolvidos, provavelmente devido a erradicação da *H. pylori* e a implantação de programas de rastreio de câncer gástrico (LIU *et al.*, 2017). O adenocarcinoma é uma neoplasia maligna em que as células cancerígenas se originam na camada mucosa, podendo atingir uma ou mais camadas do tecido do estômago, progredindo da mucosa em direção à serosa. Os principais pontos anatômicos do tumor são observados no piloro e antro, cerca de 50 a 60%, na cárdia 25% e o restante no corpo e fundo (Figura 1). Atingem ambos os sexos, porém é mais comum em homens com idade superior a 60 anos (*American Cancer Society* 2017; MARTEL, 2013).

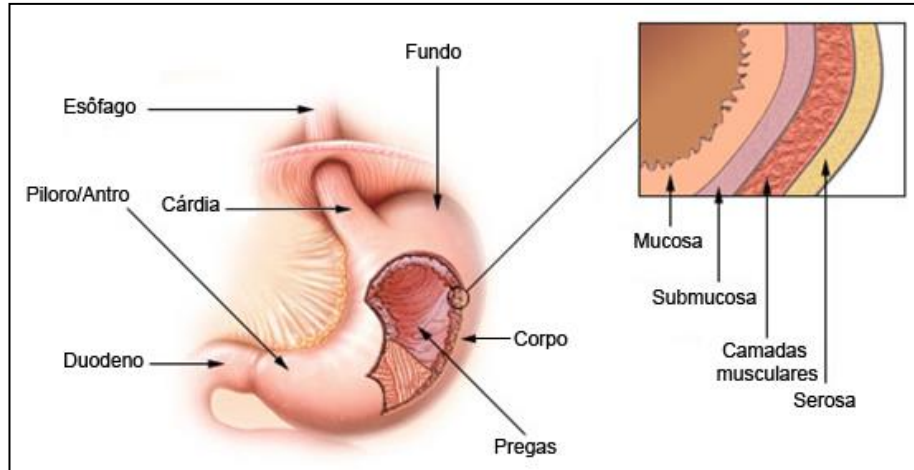


Figura 1: Anatomia do estômago (Adaptado de: *SEER Training Modules*, 2015).

As classificações de Bormman e Laurén são as mais utilizadas para classificar histologicamente o câncer gástrico. Bormman classifica os tumores de acordo com o aspecto endoscópico e macroscópico da lesão, podendo variar entre: tipo I (polipoide), tipo II (ulcerado com limites bem definidos), tipo III (ulcerados com limites imprecisos) e tipo IV (infiltrativo com linite plástica). Já a classificação por Laurén divide os tumores em intestinal e difuso, em que o tipo intestinal apresenta como características células bem diferenciadas, coesão celular com padrão de crescimento expansivo e células de núcleos grandes e irregulares. O tumor difuso, ao contrário, apresenta células pouco diferenciadas, pequenas, não coesas e dispersas de forma difusa com núcleo periférico devido a grande produção de mucina (Figura 2) (LAUREN, 1965; BORRMANN, 1926).

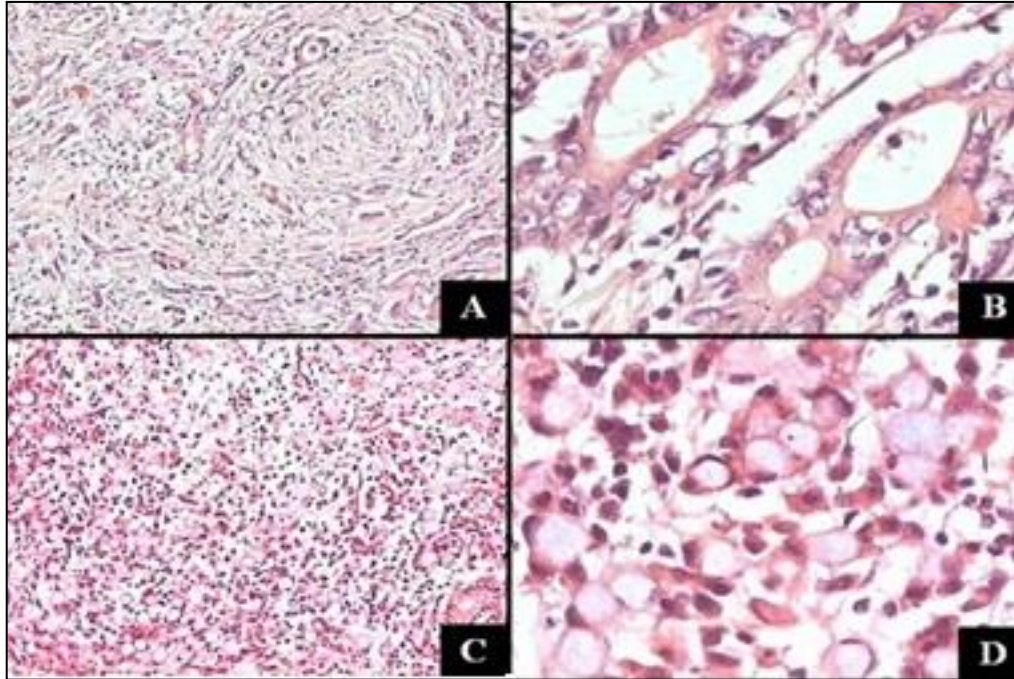


Figura 2: Tipos histológicos do adenocarcinoma gástrico. A e B: Tipo intestinal, em objetivas de 10x e 40x, respectivamente. C e D: Tipo difuso, em objetivas de 10x e 40x, respectivamente (VALENTE, 2014).

O estadiamento do câncer gástrico é realizado através da classificação TNM, em que a sigla T corresponde à extensão do tumor, N determina a ausência ou presença e a extensão das metástases em linfonodos regionais e M estabelece a presença ou ausência de metástase a distância. A caracterização numérica em TNM indica progressivamente a extensão da doença. A combinação da classificação do TNM determina o estágio da doença e relaciona-se diretamente com o prognóstico do paciente. Esta classificação foi criada pelas instituições *American Joint Committee on Cancer (AJCC)* e *Union Internationale Contra Le Cancer (UICC)* em 2010. Maiores detalhes estão contidos nas tabelas 1 e 2.

Tabela1. Classificação do TNM patológico (AJCC, 2010)

Pt	Tumor Primário
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.
pN	Linfonodos Regionais
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.
Pm	Metástase à Distância
MX	A metástase não pode ser avaliada.
M0	Ausência de metástase à distância.
M1	Metástase à distância.

Tabela 2. Grupamento por grupo de prognóstico (AJCC, 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

O adenocarcinoma gástrico é considerado precoce quando o tumor está restrito à camada mucosa ou submucosa, independentemente da presença de metástase linfonodal regional, enquanto que o câncer gástrico avançado se dá quando o tumor invade a camada muscular própria ou além (TAN, LAUWERS, 2011). A dispersão das células cancerígenas para outras partes do corpo ocorre por diversas vias de disseminação: por extensão direta, onde as células malignas invadem órgãos adjacentes ou cavidade peritoneal, pela via linfática a qual leva as células cancerígenas para os linfonodos regionais (pequena e grande curvatura), gânglio de Virchow e linfonodo axilar esquerdo (linfonodo de Irish) e a via hematogênica que transporta as células malignas através da circulação porta ou sistêmica alcançando órgãos distantes (BRUCKNER *et al.*, 1997).

Por não apresentar sintomas patognomônicos, o diagnóstico do câncer gástrico acontece de forma tardia na maioria dos casos. Além disso, esta doença é amplamente resistente à quimioterapia citotóxica e à radioterapia, sendo a cirurgia de ressecção o tratamento que oferece maior potencial de cura. A cirurgia radical com remoção completa dos nódulos linfáticos de primeira e segunda camada pode atingir taxas de sobrevivência de 5 anos em 90% dos casos e taxas de recorrência inferiores a 2% -3% (HYUNG *et al.*, 2003; AHN *et al.*, 2001, VALENTE *et al.*, 2014).

Novas abordagens têm sido avaliadas para o tratamento terapêutico dos pacientes como, por exemplo, a ressecção endoscópica da mucosa (EMR) que é proposta como alternativa à cirurgia radical para pacientes com câncer gástrico muito precoce na presença de características prognósticas favoráveis carcinoma histologicamente bem diferenciado limitado à mucosa, diâmetro inferior a 2cm, ausência de ulceração) (HIRASAWA, 2011; KANG, 2011). Além disso, os diferentes esquemas de quimioterapia adjuvante e neoadjuvante (combinados ou não com radioterapia) demonstraram proporcionar uma vantagem de sobrevivência significativa para pacientes com câncer gástrico avançado (JIANG, 2010; PAOLETTI, 2010).

1.3 CARCINOMATOSE PERITONEAL

Uma consequência do desenvolvimento do câncer gástrico é o surgimento da carcinomatose peritoneal (CP), que representa o padrão mais frequente de metástase à distância e recidiva em câncer gástrico avançado (32% a 54%), sendo também a principal

causa de morte, 60% dos casos em dois anos, com sobrevida média inferior a um ano (HAN, Tae-Su *et al.*, 2011).

O processo de surgimento da carcinomatose peritoneal acontece em dois passos, o primeiro ocorre pela descamação de células cancerígenas da superfície do tumor primário para dentro da cavidade peritoneal, e posteriormente as células cancerígenas se ligam a uma região intraperitoneal favorável (por exemplo, mesentério, omento e bolsa de Douglas) seguindo da invasão para a cavidade abdominal (HARA *et al.*, 2007). Este processo pode ser facilitado após manipulação cirúrgica em que cuidados devem ser tomados para minimizar o derramamento do lúmen gástrico e células presentes em vasos linfáticos (HAN *et al.*, 2011).

A Associação Japonesa de Câncer Gástrico recomenda realizar o exame citológico do lavado peritoneal (CLP) para detectar células malignas livres dentro da cavidade peritoneal. No entanto, apesar de alta especificidade (94% a 100%), o CLP convencional (corados pela técnica papanicolau ou outros corantes clássicos) mostra uma variação de sensibilidade de 11,1% a 80% podendo haver casos de recorrência peritoneal em pacientes com CLP negativo; já o CLP analisado por imunocitoquímica mostrou melhorar a detecção em 5 % a 15% (VIRGILIO *et al.*, 2018).

Novos métodos de diagnóstico de metástase peritoneal baseados em análises de marcadores moleculares de genes alvo presentes no lavado apresentaram sensibilidade de 38% a 100% e especificidade de 7,3% a 100% possibilitando resultados falso-positivos devido a detecção de mRNAs liberados por linfócitos e por células mesoteliais sadias ou ainda, devido a presença de célula cancerígena isolada sem potencial metastático. Atualmente, devido às limitações do CLP e das análises moleculares, recomenda-se que as duas técnicas sejam utilizadas de forma complementar (VIRGILIO *et al.*, 2018).

O tratamento da carcinomatose peritoneal geralmente é realizado com agentes quimioterápicos citotóxicos sistêmicos sem se diferenciar do tratamento padrão do câncer gástrico avançado. Um estudo de fase III que avaliou o tratamento da CP de maneira independente das outras formas de metástase observou a eficácia da quimioterapia sistêmica com o uso de 5-Fluoruracil (5-FU) ou metotrexato (MTX) mais 5-FU em 237 pacientes com CP e a sobrevida média foi de 9,4 meses e 10,6 meses, respectivamente. Apenas 5 pacientes de toda a coorte sobreviveram após 3 anos do estudo (SHIRAO *et al.*, 2013).

Nas últimas décadas houve um avanço no tratamento da CP com o aperfeiçoamento da técnica de cirurgia citorrredutora (peritonectomias), além da implantação da quimioterapia intraperitoneal e recentemente da quimioterapia intraperitoneal hipertérmica (HIPEC), que consiste na irrigação da cavidade abdominal com quimioterápico em elevada concentração

aquecido a 42°C, afim de aumentar a penetração nas células cancerígenas remanescentes. Este procedimento pode ser realizado no momento da cirurgia citorrredutora e o tempo de exposição depende do quimioterápico utilizado (DAHDALEH *et al.*, 2018; SOMMARIVA *et al.*, 2018).

1.4 TRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO

A quimioterapia e a radioterapia quando utilizadas como tratamento adjuvante ao procedimento cirúrgico têm mostrado efeitos positivos na sobrevida dos pacientes. O uso de quimioterápicos demonstrou aumento na sobrevida livre de recidiva e na recidiva global (VAN CUTSEN *et al.*, 2016). A radioterapia, quando utilizada em combinação com a quimioterapia, antes ou depois da cirurgia demonstrou impacto positivo na sobrevida, porém aumenta a toxicidade (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

Os medicamentos quimioterápicos visam atacar preferencialmente as células cancerígenas, partindo da característica que essas células apresentam de alta taxa de divisão, porém outras células sadias do corpo também se dividem rapidamente, o que gera elevada toxicidade que muitas vezes força a pausa do tratamento para a recuperação do organismo. A quimioterapia é frequentemente administrada de forma sistêmica por infusão endovenosa em intervalos de tempo chamados de ciclos (*American Cancer Society*, 2017).

Os quimioterápicos mais utilizados no tratamento do câncer de estômago são o 5-fluoracil, a capecitabina, a carboplatina, a cisplatina, o docetaxel, a epirubicina, o irinotecano, a oxaliplatina e o paclitaxel. Dependendo do estágio do câncer e do quadro clínico do paciente estes medicamentos podem ser associados entre si, com radioterapia e outros medicamentos alvos específicos (*American Cancer Society*, 2017).

A toxicidade dos medicamentos aumenta à medida que são combinados e as reações adversas mais comuns são náuseas e vômitos, perda de apetite, perda de cabelo, diarreia, feridas no trato gastrointestinal, infecções, hemorragias e fadiga. Outras reações mais graves podem ocorrer e são específicas de alguns medicamentos, tais como neuropatia (cisplatina, oxaliplatina, docetaxel e paclitaxel), fraqueza e sensibilidade ao frio e calor em alguns nervos; cardiopatia (doxorubicina e epirubicina), que pode levar a lesões permanentes no coração a depender da dose e período de exposição; síndrome mão-pé (capecitabina e 5-FU), que se inicia com vermelhidão nas extremidades das mãos e dos pés e pode evoluir com surgimento de bolhas, descamação e feridas abertas (*American Cancer Society*, 2017).

Existe uma dificuldade em se estabelecer protocolos de tratamento devido aos estudos existentes apresentarem grande variabilidade em técnicas cirúrgicas e radioterápicas e diversas combinações de quimioterápicos, além das diferenças de características populacionais. No Brasil, o protocolo de diretrizes terapêuticas recomenda que o tratamento deva ser definido levando-se em consideração os recursos humanos e tecnológicos da instituição (Ministério da Saúde, 2014). Surge a necessidade de estudos que apontem medicamentos com eficácia antineoplásica e baixa toxicidade que possam ser usados em associação com os quimioterápicos hoje utilizados que são altamente tóxicos, a fim de diminuir as doses destes quimioterápicos sem reduzir a sua eficácia, bem como para evitar a resistência das células cancerígenas aos fármacos.

1.5 NOVAS ABORDAGENS TERAPÊUTICAS

Após décadas de estudo acerca dos mecanismos moleculares na patogênese do câncer, foi possível descrever as características distintivas e complementares do câncer, que possibilitam o crescimento tumoral e a disseminação metastática. As principais características são a sustentação da sinalização proliferativa, o bloqueio de supressores de crescimento, a ativação da invasão e metástase, a permissão à imortalidade replicativa, a indução à angiogênese e a resistência à morte celular, entre outras (HANAHAN, 2011).

A utilização de drogas que atuam em alvos moleculares específicos tem sido considerada uma vantagem, uma vez que apresentam atividade inibidora contra um alvo, tendo relativamente menos toxicidade inespecífica. Porém, tem sido observado que as respostas clínicas resultantes têm sido geralmente transitórias, sendo seguidas por recaídas quase inevitáveis (HANAHAN, 2011).

Os mecanismos de sobrevivência das células cancerígenas são regulados por vias de sinalização parcialmente redundantes, conseqüentemente, um agente terapêutico direcionado que inibe uma via-chave num tumor pode não desligar completamente esta via, permitindo que algumas células cancerosas sobrevivam com função residual até que elas se adaptem eventualmente à pressão seletiva imposta pela terapia aplicada, e um tumor que antes era dependente de uma via de sinalização pode se adaptar a um novo mecanismo de sobrevivência. Essa adaptação, que pode ser realizada por mutação, reprogramação epigenética, ou remodelação do microambiente estromal, pode restabelecer a capacidade funcional, permitindo o crescimento do tumor e a recidiva clínica (HANAHAN, 2011).

O uso medicamentos que atuem em mais de um alvo ou vias metabólicas diversas apresentam maior chances de eficácia no tratamento do câncer podendo reduzir a resistência aos quimioterápicos. Uma vez que as vias de sinalização sejam bem elucidadas torna-se possível administrar fármacos que atuem em alvos diferentes ou que atuem no mesmo alvo, porém por mecanismos diferentes, resultando em terapias mais eficazes e duráveis para câncer humano (HANAHAN, 2011).

1.5.1 MEBENDAZOL

O Mebendazol, N- [6- (benzoil) -1H-benzimidazol-2-il] carbamato de metilo, é um fármaco desenvolvido e aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) para uso em humanos para tratar infecções helmínticas humanas e veterinárias causadas pelos seguintes agentes: *Ascaris lumbricoides*, *Ancylostoma duodenale*, *Necator americanus*, *Enterobius vermicularis* e *Trichuris trichiura* (Mebendazol, medley).

Administrado por via oral, menos de 10% da dose inicial é encontrada na corrente sanguínea devido à baixa absorção e ao extenso metabolismo de primeira passagem, portanto a ingestão de alimentos altamente calóricos deve ser considerada para auxiliar no aumento da absorção (Mebendazol, medley).

Nos pacientes em tratamento crônico com mebendazol, verificou-se o aumento em até três vezes da concentração sistêmica quando comparado à dose única, porém, com raros relatos de reações adversas (devido a ligação a proteínas plasmáticas e acúmulos em espaços extravasculares, volume de distribuição de 1 a 2L/kg) (Mebendazol, medley).

Este medicamento é excretado na urina e na bile com meia-vida de eliminação de 3 a 6 horas após administração oral. Os testes de toxicidade crônica em humanos revelou boa tolerabilidade e não demonstrou ser carcinogênico, porém os testes em animais evidenciaram a teratogenicidade e embriotoxicidade em ratos (Mebendazol, medley).

O mecanismo de ação consiste em ligar-se às subunidades da tubulina no epitélio intestinal do parasita, prevenindo a polimerização da tubulina e a formação dos microtubulos, causando alterações estruturais que impedem o desenvolvimento dos parasitas (PINTO *et al.*, 2015).

Os microtúbulos são compostos de α e β -tubulina e são componentes do citoesqueleto que são necessários para o transporte celular, divisão celular e manutenção da integridade estrutural. A tubulina é o alvo de alguns fármacos quimioterápicos como a vincristina, colchicina e o paclitaxel (MACDONALD *et al.*, 2015). Vários estudos já comprovaram a

atividade antineoplásica do mebendazol em diversos tipos de câncer, entre eles o câncer gástrico, câncer de pulmão e carcinoma adrenocortical (SASAKI *et al.*, 2012; MARTARELLI *et al.*, 2008; PINTO *et al.*, 2015).

Uma pesquisa com linhagens celulares de glioblastoma multiforme demonstrou que o mebendazol interrompe a formação de microtúbulos e a atividade *in vitro* está correlacionada com a redução da polimerização da tubulina (Figura 3). Além disso, o mesmo estudo relatou a eficácia do mebendazol no aumento da sobrevida em ensaio pré-clínico em modelos de camundongos com xenoenxerto de gliolastoma da linhagem GL261, em que os mesmos foram tratados com 50mg/kg da droga. A partir do 20º dia de tratamento foi possível perceber tumores menores e a sobrevida média aumentou de 30 dias para 49 dias, refletindo um aumento de 63,6% (Figura 4) (BAI *et al.*, 2011).

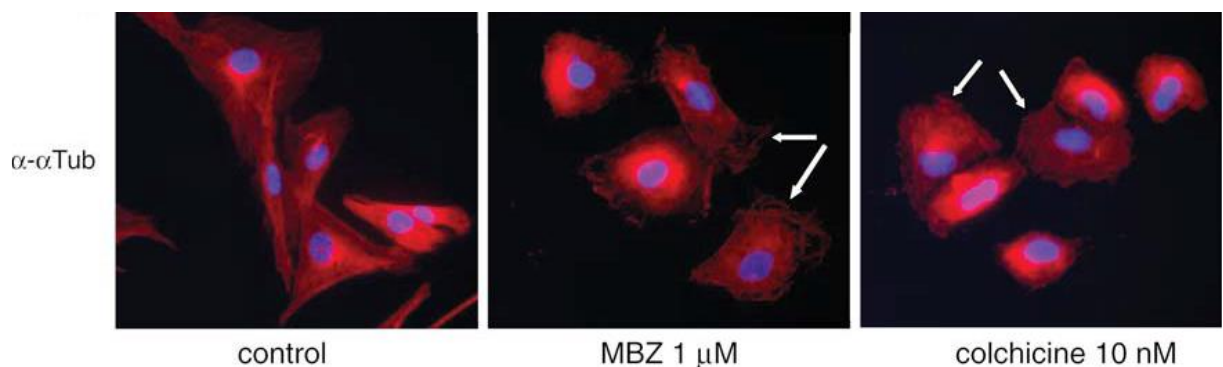


Figura 3 – Mebendazol inibindo a formação de microtúbulos em linhagem celular de glioblastoma (BAI *et al.*, 2011).

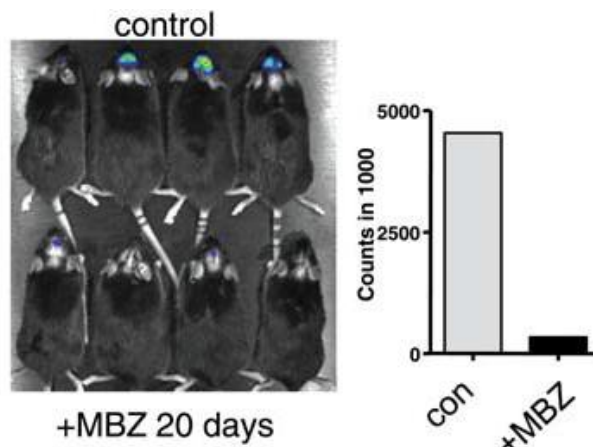


Figura 4 – Mebendazol inibindo o crescimento de tumor em xenoenxerto de gliolastoma. Modelo em camundongos (BAI *et al.*, 2011).

Foi relatado em pesquisa com linhagens de melanoma outro possível mecanismo de ação complementar para a atividade antitumoral do mebendazol, a qual sugere que a interrupção da formação de microtúbulos mediada por mebendazol resulta em fosforilação da proteína Bcl-2, tornando-a inativa e levando à indução de apoptose. A proteína Bcl-2 regula negativamente a cascata de apoptose e a sua fosforilação por agentes antimitóticos demonstrou prevenir a formação de heterodímeros Bax-Bcl-2. Em vez disso, Bax (proteína proapoptótica) não ligado fica disponível para formar homodímeros, uma situação que promove a apoptose (DOUDICAN *et al.*, 2008).

Um estudo realizado com mebendazol em linhagens de células de câncer gástrico demonstrou a supressão do crescimento celular nas linhagens AGP01, ACP02 e ACP03, mostrando resultados mais eficazes que os quimioterápicos 5-FU, oxaliplatina, gencitabina, irinotecano, plactaxel, cisplatina e doxorubicina, medicamentos já utilizados no tratamento do câncer gástrico. O mesmo estudo evidenciou ainda que o tratamento prévio com o mebendazol nas linhagens AGP01, ACP02 e ACP03 ocasionou a desordem da rede de microtúbulos, sugerindo que esta droga pode interferir na capacidade de invasão das células cancerígenas (Tabela 3) (PINTO *et al.*, 2015).

Foi proposto um mecanismo de ação diferente para o mebendazol que poderia explicar o porquê de seus efeitos anticancerígenos serem voltados preferencialmente para células cancerígenas, pouco interferindo em células saudáveis. Este mecanismo de ação envolve a inibição da via de sinalização Hedgehog (Hh) e, por conseguinte, beneficia o tratamento de tumores com expressão desta via de sinalização. O mebendazol demonstrou inibir, em células humanas, a formação de cílios primários, organela formada por microtúbulos que funciona como um centro de sinalização para a ativação da via Hh, causando a diminuição da expressão de efetores desta via, inibindo assim a proliferação e a sobrevivência de células de meduloblastoma (LARSEN *et al.*, 2014)

Tabela 3 - Atividade citotóxica do mebendazol *in vitro*. IC₅₀ (µM) e intervalo de confiança de 95% observado para o ensaio de MTT em linhagens de câncer gástrico depois de 72hs de exposição.

IC ₅₀ (µM)	ACP-02	ACP-03	AGP-01
Mebendazol	0,39 (0,26-0,59)	1,25 (1,04-1,51)	0,59 (0,44-0,79)
5-Fluoracil	19,71 (15,68-24,78)	0,38 (0,30-0,49)	0,67 (0,53-0,86)
Oxaliplatina	8,85 (6,40-1,22)	1,88 (1,58-2,23)	4,77 (4,18-5,44)
Gemcitabina	7,47 (5,05-11,04)	0,21 (0,19-0,22)	0,02 (0,003-0,16)
Irinotecano	29,83 (25,26-35,23)	32,07 (26,73-38,47)	41,10 (31,06-54,38)
Etoposídeo	0,20 (0,10-0,38)	18,47 (14,29-23,87)	10,31 (8,01-13,27)
Paclitaxel	2,43 (2,24-2,64)	0,99 (0,64-1,55)	0,62 (0,51-0,76)
Cisplatina	15,82 (12,78-19,58)	28,62 (23,43-34,99)	17,23 (12,69-23,38)
Doxorrubicina	0,82 (0,63-1,07)	0,23 (0,18-0,29)	0,25 (0,19-0,33)
MBZ+5-FU	N.D	N.D	0,38 (0,24-0,62)
MBZ: mebendazol; 5-FU: fluoracil; N.D: não determinado.			

1.5.2 METFORMINA

A metformina (N', N'-dimetilbiguanida) é um antidiabético oral que pertence à classe das biguanidas e seu mecanismo de ação ainda não está completamente elucidado. Entre os efeitos conhecidos constam um aumento da utilização da glicose, oxidação e glicogênese pelos músculos, aumento do metabolismo da glicose para lactato em nível intestinal, reduzindo a gliconeogênese hepática e, possivelmente, a taxa de absorção intestinal de glicose. Atua também na presença de insulina aumentando a utilização de glicose e reduzindo sua produção, portanto contrabalançando a resistência à insulina. Essa substância apresenta boa tolerabilidade e as reações adversas que podem acometer de 10 a 30% dos usuários são, náusea, diarreia e anorexia, que costumam surgir nos primeiros dias de tratamento e são

passageiros. Outra reação adversa relatada é a acidose láctica, porém muito rara (Metformina, Neoquímica).

O interesse inicial na metformina como agente anticancerígeno vem de pesquisas clínicas e epidemiológicas, que forneceram uma base empírica para a avaliação específica de sua atividade antineoplásica. Um estudo observacional retrospectivo relatou que o uso da metformina está associado a um risco reduzido de câncer em pessoas com diabetes tipo 2, uma vez que a incidência de câncer entre os usuários de metformina foi de 7,3% enquanto que para os não usuários a incidência foi de 11,6% e a sobrevida dos indivíduos usuários de metformina que desenvolveram câncer foi 3,6 anos em contraste com os indivíduos não usuários, que apresentaram sobrevida de 2,8 anos. Adicionalmente, a taxa de morte por câncer foi de 3% para os indivíduos tratados com metformina e de 6,1% para os indivíduos tratados com outros medicamentos (LIBBY *et al.*, 2009).

Atualmente diversas pesquisas já comprovaram a atividade antineoplásica do fármaco metformina em diversos tipos de câncer, entres eles o câncer gástrico, câncer do endométrio e o câncer de próstata (HAN *et al.*, 2015; IGLESIAS *et al.*, 2013; RAVAL *et al.*, 2016), atuando de forma direta e indireta. Suas ações indiretas se devem à capacidade da metformina diminuir a concentração de glicose circulante, substrato essencial para as células com alta taxa de divisão celular, e mais especificamente por inibir a fosforilação oxidativa nos hepatócitos que leva à depleção do fornecimento de ATP, o que pode forçar as células a desenvolverem processos de sobrevivência, tais como autofagia, paragem de ciclo celular e glicólise aumentada, levando eventualmente à morte celular (ZHA *et al.*, 2016; SAHRA *et al.*, 2010).

Ao aumentar a captação de glicose pelos músculos e reduzir a gliconeogênese hepática, a metformina reduz os níveis de insulina circulante, esta por sua vez se liga ao IR (receptores de insulina) e à IGF-1 (receptor homólogo à insulina) e ativa as vias MAPK e PI3K, que são responsáveis pela proliferação celular e inibição da apoptose. Logo, a redução dos níveis de insulina induzidos pela metformina contribui para regulação negativa de MAPK e PI3K (GUPPY *et al.*, 2011).

O stress causado pela metformina ao interferir na respiração mitocondrial através da inibição do complexo mitocondrial I é seguido pela redução das espécies endógenas de oxigênio reativo, resultando na diminuição do estresse oxidativo, diminuição dos danos no DNA e da mutagênese. Um estudo acerca do câncer gástrico demonstrou que a metformina, ao ocasionar a desordem no metabolismo respiratório, leva ao aumento da proporção de AMP/ATP intracelular, gatilho que ativa a via da Proteína Quinase ativada por Adenosina Monofosfato (AMPK) dependente da quinase hepática B1-(LKB1) (HAN, 2015). A ativação

de AMPK inibe a proliferação celular e a tradução de RNAm através da inibição do mTOR, responsável pela síntese de proteínas e progressão do ciclo celular. Estudos comprovaram que LKB1 pode ativar a proteína supressora de tumor p53 e que AMPK pode modular esta proteína, com isso a ativação da via AMPK-LKB1 induz um aumento da atividade de p53, levando a célula a adotar mecanismos de autofagia (Figura 5) (SHACKELFORD, 2009).

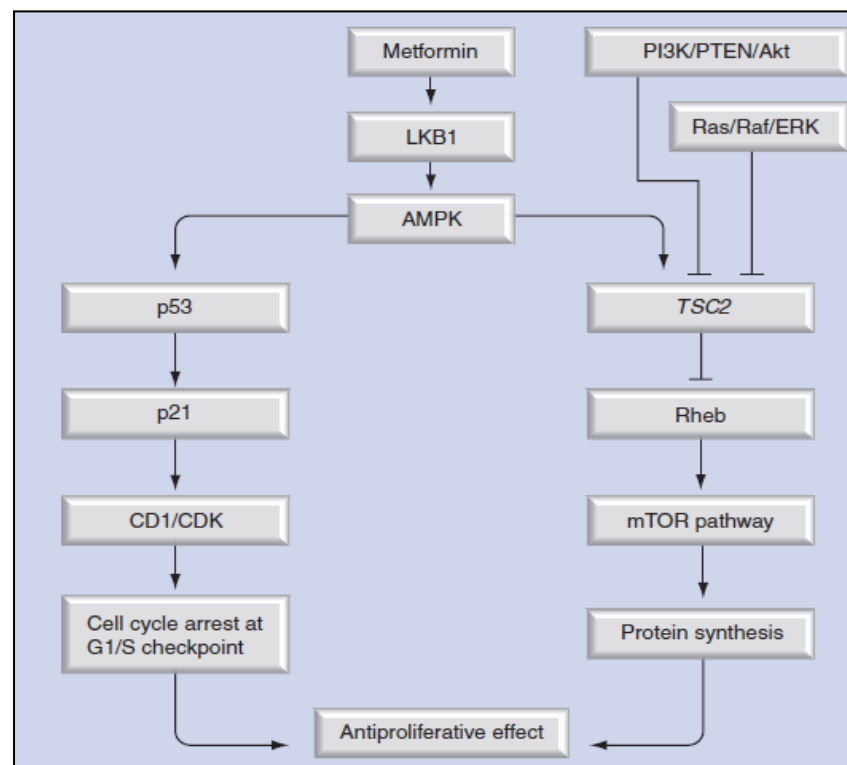


Figura 5- Mecanismo de ação da metformina. AMPK: via AMP-quinase; CDK: quinase dependente de ciclina; LKB1: quinase hepáticaB1; TSC2: gene supressor de tumor complexo de esclerose tuberosa (GUPPY *et al.*, 2011).

Pesquisas em câncer de mama e câncer de pulmão apontaram que a metformina pode reverter a transição epitélio-mesenquimal (EMT), processo pelo qual as células epiteliais adquirem a capacidade altamente invasiva e metastática das células mesenquimais, que está associada com a progressão do câncer e metástase. A metformina poderia bloquear a sinalização do fator de crescimento transformante β (TGF- β) através da ativação da via de transdução do sinal AMPK para inverter o fenótipo EMT em células de câncer de mama. No câncer de pulmão, a metformina inibiu a EMT induzida pela IL-6 através da inibição da fosforilação dos transdutores de sinal e ativadores da transcrição (STAT3) (SHACKELFORD, 2009).

Em um estudo do câncer do endométrio, foi observado que a metformina inibiu a proliferação celular e o crescimento tumoral nos modelos pré-clínicos, com a maior resposta observada em células portadoras de mutações ativadas em K-Ras. O estudo demonstrou que a metformina desloca constitutivamente K-Ras ativo (oncogênico) a partir da membrana celular para citosol e endomembranas, causando desacoplamento da via de sinalização de MAPK. Foi elucidado que o tratamento com metformina ativa o PKC atípico (PKC ζ), através de um mecanismo dependente de AMPK, ERK e PDK1. PKC ζ então fosforila a cauda rica em lisina de K-Ras ativado, atuando como um interruptor eletrostático que faz com que K-Ras seja repellido da membrana. Os achados *in vitro* mostraram que células de câncer de endométrio que expressam constitutivamente K-Ras ativos são mais sensíveis à metformina. Esta alteração na localização subcelular pode explicar completamente a anulação da ativação de MAPK dependente de K-Ras observada em células tratadas com metformina (Figura 6) (IGLESIAS, 2013).

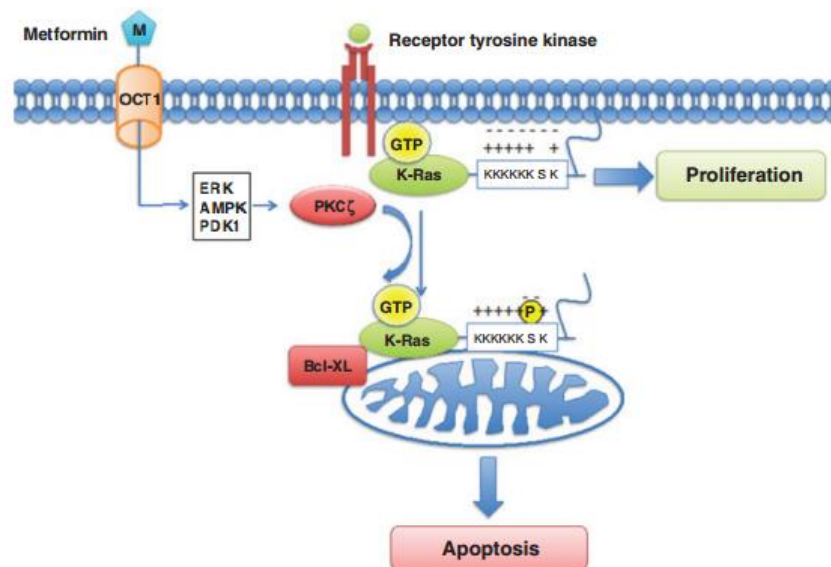


Figura 6 - Metformina provoca a translocação de K-Ras ativado da membrana plasmática e promove a morte celular (IGLESIAS, 2013).

A eficácia da metformina já foi comprovada em ensaios *in vivo*, a exemplo de um estudo em camundongos com xenoinxerto de células de câncer do esôfago usando a linhagem Eca 109. Os camundongos foram tratados com 300mg/kg de metformina por um período de 21 dias e o crescimento do tumor foi avaliado a cada três dias. Ao final do tratamento, verificou-se que a metformina reduziu o volume tumoral e a taxa de inibição foi de 48,41% em comparação com o grupo controle (Figura 7) (TANG *et al.*, 2017).

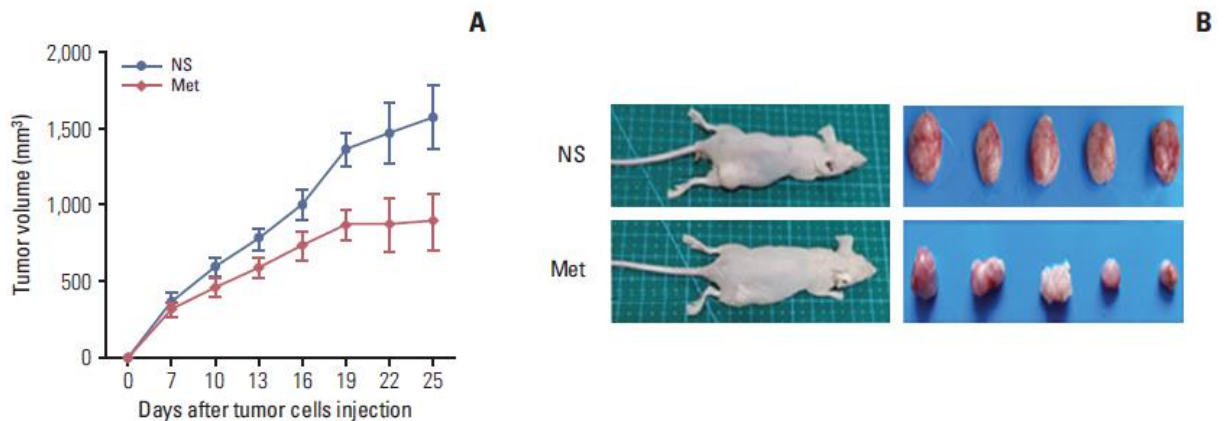


Figura 7- Metformina inibindo crescimento de massa tumoral, em xenoenxerto de câncer de esôfago (TANG *et al.*, 2017).

Diversos estudos clínicos de fase II estão em andamento demonstrando a relação da metformina com o câncer. Um ensaio clínico já finalizado demonstrou os benefícios da metformina em pacientes com câncer avançado ou metastático de células não pequenas e não escamosas de pulmão. A metformina (1000mg/2x/dia) foi administrada juntamente com carboplatina, paclitaxel e bevacizumab em 18 pacientes, enquanto que 6 pacientes receberam os mesmos medicamentos com exceção da metformina por um período de quatro a seis ciclos de 21 dias, seguida de terapia de manutenção com bevacizumabe \pm metformina a cada 21 dias até que houvesse progressão da doença ou toxicidade intolerável (MARRONE *et al.*, 2018).

Os pacientes que receberam metformina apresentaram sobrevida livre de progressão de 9,6 meses, já os que não receberam apresentaram sobrevida livre de progressão de 6,7 meses e a sobrevida global média dos pacientes tratados com metformina foi de 15,9 meses e 13,9 meses para os pacientes não tratados com metformina (MARRONE *et al.*, 2018).

1.6 LINHAGEM CELULAR

A linhagem celular tem se mostrado um importante meio de estudo do câncer *in vitro*. A partir do cultivo inicial de células originadas diretamente de um tumor primário, obtém-se uma cultura primária que, após a sua imortalização, isto é, a aquisição da capacidade de se multiplicar indefinidamente, torna-se uma linhagem celular contínua ou estabelecida. No Brasil, um grupo de pesquisa da Universidade Federal do Pará (UFPA) estabeleceu e caracterizou as linhagens de câncer gástrico ACP02, ACP03 e AGP01, a partir de amostras de tecido tumoral e de ascite de pacientes oriundos do Estado do Pará (LIMA *et al.*, 2004; LEAL *et al.*, 2009). A linhagem ACP02 foi estabelecida a partir de um tumor gástrico primário do tipo difuso e a linhagem ACP03 a partir de um tumor gástrico primário do tipo intestinal. Já a linhagem AGP01 (Ascite Gástrica Paraense 01) foi estabelecida a partir de células neoplásicas presentes no líquido ascítico de um indivíduo com adenocarcinoma gástrico do tipo intestinal que apresentava carcinomatose peritoneal, com padrão de crescimento em monocamada aderente como as demais linhagens estabelecidas de outras origens geográficas. O presente estudo fez uso da linhagem AGP01, para avaliar os efeitos antineoplásicos dos fármacos metformina e mebendazol isoladas e em associação, tendo em vista esta linhagem ser derivada da carcinomatose peritoneal representando o câncer gástrico em um estágio avançado com maior propensão a resistência à terapia implantada.

2 APLICABILIDADE CLÍNICA

É evidente a necessidade de novas abordagens terapêuticas aplicáveis ao câncer gástrico, em função da baixa eficácia de terapias atualmente disponíveis com altos níveis de resistência e toxicidade elevada, além do diagnóstico tardio que muitas vezes desencadeia a um mau prognóstico. Considerando o mecanismo de ação, a segurança clínica, o perfil farmacodinâmico bem caracterizado e o baixo custo dos medicamentos mebendazol e metformina, é imprescindível considerá-los como potenciais candidatos para o tratamento do câncer gástrico

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Analisar a atividade antineoplásica dos fármacos metformina e mebendazol de forma individualizada e suas performances em associação, na linhagem AGP01 de células de adenocarcinoma gástrico humano metastático.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar o CI_{50} dos fármacos metformina e mebendazol na linhagem AGP01, isoladamente e em combinação.
- Analisar a atividade dos fármacos metformina e mebendazol de forma individual e em associação, na linhagem AGP01, quanto à viabilidade celular, apoptose, ciclo celular e migração.
- Avaliar o efeito sinérgico da associação entre dos fármacos metformina e mebendazol na linhagem AGP01.

4 METODOLOGIA

4.1 CULTURA DE CÉLULAS

As células da linhagem AGP01 foram descongeladas e repassadas para garrafas de culturas apropriadas, cultivadas em DMEM e suplementadas com 10% de soro bovino fetal (SBF) e 1% dos antibióticos estreptomicinas e penicilina, e mantidas em estufa com atmosfera em 5% de CO₂ à 37°C. A confluência foi acompanhada sempre por observação em microscópio invertido, sendo o meio trocado sempre que os nutrientes estivessem consumidos. Para os experimentos, o meio foi desprezado, as células lavadas com PBS 1x e submetidas à tripsina para desprendê-las do fundo da garrafa.

4.2 MEBANDAZOL E METFORMINA

O fármaco mebendazol em pó foi pesada em balança analítica e diluída em DMSO para uma solução estoque à 10mM e conservada em freezer -80 °C. Para cada ensaio, a solução estoque foi descongelada e diluída em concentrações de interesse em meio DMEM com adição de SBF.

O fármaco cloridrato de metformina em pó foi pesada em balança analítica e diluída em água autoclavada para uma concentração à 50mM e posteriormente filtrada em filtro de esterilização com poro de 22 micrômetros de diâmetro. Para os ensaios, esta solução foi diluída em concentrações de interesse em meio DMEM com adição de SBF. A cada ensaio este processo foi repetido.

4.3 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR POR CITOTOXIDADE DO MTT 3-(5-DIMETHYLTHIAZOL-2-YL)-2,5-DIPHENYLTETRAZOLIUM BROMIDE

Este é um ensaio quantitativo *in vitro* que foi desenvolvido por Mosmann em 1983 para estimar a proliferação e sobrevivência celular. É definido na literatura como apropriado para estimar a citotoxicidade (PESSOA *et al.*, 2000; BEZERRA *et al.*, 2005) e baseia-se na capacidade da 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), que é hidrossolúvel e de cor amarelada, em cristais de formazan, que são de cor púrpura. Essa técnica tem a capacidade de analisar a viabilidade e o estado

metabólico da célula, sendo assim bastante útil para a avaliação da citotoxicidade (BERRIDGE *et al.*, 1996).

4.3.1 Procedimento experimental

As células foram semeadas em placas de 96 poços com 3×10^3 células/poço (100 μL /poço) e mantidas na estufa com atmosfera de 5% de CO_2 a 37°C por 24 h para aderência. Os fármacos metformina e mebendazol foram diluídas em água autoclavada e DMSO para solução estoque de 50 mM e 10 mM, respectivamente.

A partir destas soluções foi realizada uma diluição em DMEM para obter uma concentração de 32mM de metformina para o tratamento isolado, a partir da qual foram realizadas diluições seriadas para a obtenção das concentrações de 16mM, 8mM, 4mM, 2mM, 1mM, 0,5mM e 0,025mM, que foram adicionadas à placa de 96 poços (100 μL /poço), além do controle negativo não tratado.

Para o ensaio do tratamento combinado de metformina + mebendazol, foi realizada uma diluição em DMEM para a obtenção da concentração de 48mM para metformina a partir da qual foram realizadas diluições seriadas para a obtenção das seguintes concentrações 24Mm, 12mM, 6mM, 3mM, 1,5mM, 0,75mM e 0,375Mm, correspondentes a 400%, 200%, 100%, 50%, 25%, 12,5% e 6,25%, respectivamente, ao IC_{50} encontrado no tratamento isolado. Já para o mebendazol foi realizado uma diluição para a obtenção da concentração de 2,4 μm , a partir da qual, através de diluições seriadas, foram obtidas as seguintes concentrações 1,2 μM , 0,6 μM , 0,3 μM , 0,15 μM , 0,075 μM , 0,0375 μM e 0,018Mm, também correspondentes respectivamente a 400%, 200%, 100%, 50%, 25%, 12,5% e 6,25% do IC_{50} encontrado isoladamente. Foram adicionados 100 μL /poço de cada concentração dos dois fármacos na placa de 96 poços (100 μL /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, foram adicionados 100 μL de solução de MTT (0,5mg/mL em meio DMEM) e a placa foi incubada novamente na estufa a 5% de CO_2 por 3h.

Em seguida, cada placa foi mantida em temperatura ambiente protegida da luz por 24 horas. Posteriormente, foram adicionados 100 μL /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 (SpectraMax i3) a um comprimento de onda de 570nm.

O resultado gerado em porcentagem será usado nos cálculos de conversão, baseados em regra de 3, para definir os valores absolutos dos CI_{50} em associação.

4.4. 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 fosfolípido de membrana contribui para facilitar o reconhecimento por proteínas dependente de íons cálcio, como a Anexina-FITC (BOERSMA *et al.*, 2005; GALLUZZI *et al.*, 2012; MARTIN *et al.*, 1995).

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

4.4.1 Procedimento experimental

As células foram plaqueadas em placas de 12 poços a uma densidade de 10^6 células/poço e mantidas por 24 horas na estufa com atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C para aderência. Após este período, foi realizado o tratamento com metformina e mebendazol isoladamente e em combinação nas concentrações estabelecidas 1/2 do CI₅₀ e CI₅₀ (3,1mM, 6,2mM - MET); (150nM; 300nM - MBZ) e concentrações combinadas (850µM MET+44 nM MBZ; 1,7mM MET + 88nM 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, que 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 µl de PBS. Realizou-se a contagem das células de modo que houvesse uma densidade de 10^6 células por tubo. A quantidade equivalente de células foram adicionadas 1ml de buffer (solução tampão do kit BD Biosciences). Em seguida, 100ul foram retirados de cada amostra e adicionados a outro tubo onde foram adicionados 5 µL Anexina-FITC e 5 µL de IP. As células foram então incubadas em temperatura ambiente (25°C) por 15 min e foi realizada a aquisição dos dados em citômetro de fluxo (BD FACSVerser™).

Foram classificadas como células em apoptose inicial aquelas com marcação somente para Anexina-FITC, em apoptose tardia aquelas com dupla marcação de Anexina-FITC e IP, em necrose somente marcação para IP e células viáveis sem nenhuma marcação.

4.5 ANÁLISE DE CICLO CELULAR

O mecanismo de divisão celular é um evento precisamente controlado por uma maquinaria bioquímica conservada, que não apenas coordena a progressão de uma fase para outra, mas também emite sinais extracelulares de controle de crescimento e proliferação (SZXEER e FELZENSZWALB, 2003; TAJARA, 2004).

O ciclo celular pode ser dividido em cinco fases: G1, S, G2, M e G0. Na fase G0, as células encontram-se em repouso. Quando as células passam para a fase G1, ocorre a preparação para a divisão celular, além de preparar o DNA para a síntese, que irá ocorrer na fase S. Na fase G2 haverá a síntese de componentes para a mitose e após a divisão celular, com a formação de duas células filhas, as células tornam a entrar em G0. Entretanto, células tumorais, após terminarem seu processo de replicação, não retornam para G0 e assim que a fase M termina a fase G1 é recomeçada (ALMEIDA *et al.*, 2005).

A perda do controle do ciclo celular é uma das principais características do câncer. Alterações nos componentes do ciclo celular e nas vias de sinalização dos mecanismos de *checkpoint* ocorrem na maioria dos tumores humanos, sendo que essas alterações genéticas são resultantes da desregulação de oncogenes e genes supressores tumorais (STEWART *et al.*, 2003).

A citometria de fluxo aplicada no estudo de ciclo celular registra os parâmetros cinéticos da população celular, revelando o índice de DNA, a 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, 2014).

4.5.1 Procedimento experimental

As células foram cultivadas em placas de 6 poços numa densidade de 1×10^6 células/poço e mantidas por 24 horas na estufa com atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C para a aderência. Após esse período, foi realizado o tratamento com as substâncias nas concentrações estabelecidas 1/2 CI₅₀ e CI₅₀ (3,1mM e 6,2mM - MET) e (150nM e 300nM -

MBZ) e concentrações combinadas (850µM MET+ 44nM MBZ e 1,7mM MET + 88nM 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 1×10^6 células/ependorf. Em seguida, as células foram lavadas com PBS 1x e centrifugadas a 2G, o sobrenadante foi descartado e as células então foram fixadas com 400 µL de álcool 80% por 60 minutos a 4°C em tubos de 1,5 mL. Ao final deste período, foram centrifugadas a 200g por 5 minutos e o sobrenadante foi retirado. Posteriormente, foram lavadas com PBS 1x e incubadas em solução de RNase livre de DNA (100 µg/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 µg/mL deixados por 60min. Dez mil eventos foram analisados por citometria de fluxo (BD FACSverse™).

4.6 ENSAIO DE MIGRAÇÃO (*SCRATCH ASSAY*)

A migração celular é um processo essencial para o desenvolvimento e que também pode contribuir para patologias importantes. A migração de uma célula ou grupo de células, de uma área para outra, geralmente em resposta a um sinal químico, é fundamental para algumas funções tais como: reparação de feridas, diferenciação celular, desenvolvimento embrionário e metástase tumoral (VICENTE-MANZANARES E HORWITZ, 2011).

A capacidade de uma célula cancerosa se submeter a migração permite uma autonomia na mudança de posição dentro dos tecidos. Estes processos permitem que as células neoplásicas cheguem aos vasos sanguíneos e linfáticos, propiciando a disseminação na circulação, em seguida o crescimento metastático em órgãos distantes (CHAMBERS *et al.*, 2002).

O ensaio cicatrização celular *in vitro* (scratch assay), descrito por Liang *et al.* (2007), é um ensaio simples, bem desenvolvido e de baixo custo, capaz de fornecer dados a respeito da migração celular *in vitro* de células aderentes. Os passos básicos desse ensaio envolvem: a 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). A inibição da migração das células em 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).

4.6.1 Procedimento experimental

As células da linhagem AGP01 foram cultivadas em placas de 12 poços numa densidade de 2×10^5 células/poço e mantidas por 24 horas na estufa com atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C para a aderência. Após esse período foi feito um “arranhão” com uma ponteira de 10µL por toda a extensão no centro de cada poço (após o arranhão, o meio foi retirado para eliminar as células soltas, e cada poço foi lavado com PBS 1x em seguida foi acrescentado DMEM com Soro Bovino Fetal) e então foi realizado o tratamento com o metformina e/ou mebendazol nas concentrações estabelecidas 1/2 CI₅₀ e CI₅₀ (3,1mM e 6,2mM - MET) e (150nM e 300nM - MBZ) e concentrações combinadas (850µm MET+ 44nM MBZ e 1,7mM MET + 88nM MBZ) por 24 horas.

O comportamento das células foi observado e fotografado no mesmo local no tempo 0 (logo após fazer o risco seguido do tratamento) e logo após nos tempos 6h, 12h e 24h. Todos os experimentos foram realizados em quadruplicatas.

4.7 ANÁLISE DOS DADOS

A média das replicatas independentes obtidas será comparada estatisticamente usando two-way ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni, com nível de significância de 95% ($p < 0,05$) para determinar diferenças entre os grupos tratados e o controle negativo não tratado.

5 RESULTADOS

5.1 EFEITO DA METFORMINA E MEBENDAZOL NA CITOTOXICIDADE CELULAR ATRAVÉS DO ENSAIO DO MTT

Para verificar a eficácia da metformina e mebendazol na redução da atividade metabólica e inibição da proliferação celular, foi realizado o ensaio de viabilidade celular por citotoxicidade do MTT. Verificou-se que a metformina reduziu a atividade metabólica e a proliferação celular de maneira dose-dependente com o valor de CI_{50} (concentração necessária para inibir para a viabilidade celular em 50% das células) de 6,2mM para a linhagem AGP01 após exposição de 72 horas. Nas mesmas condições, o mebendazol também demonstrou reduzir a proliferação de modo dose-dependente com o valor de CI_{50} de 300nM. Quando as células foram tratadas com metformina e mebendazol de forma conjunta, a inibição da proliferação celular foi significativamente aumentada com valores de CI_{50} correspondentes a 29% dos CI_{50} encontrados nos fármacos isolados. Ao se realizar o cálculo de conversão o valores de CI_{50} dos fármacos associados foram de 1,7mM e 88nM, respectivamente, demonstrando que o efeito antiproliferativo das drogas em combinação foi superior em comparação com uso da metformina ou mebendazol isolados (Tabelas 4, 5 e 6).

Tabela 4: Concentração inibitória (CI_{50}) e metade da concentração inibitória ($1/2 CI_{50}$) das drogas Metformina e Mebendazol, isoladas e em associação, na linhagem de câncer gástrico AGP01, obtida a partir do ensaio de MTT.

Droga	Metformina	Mebendazol	Metformina combinado	Mebendazol combinado
CI_{50}	6,2 mM	300 nM	1,7 mM	88 nM
$1/2 CI_{50}$	3,1 mM	150 nM	850 μ M	44 nM

Tabela 5: curva de concentrações utilizada para definir o CI_{50} dos fármacos em associação.

CONCENTRAÇÕES (%)	MET	MBZ
400%	24mM	1,2 μ M
200%	8mM	0,6 μ M
100%	~6mM	~0,3 μM
50%	3mM	0,15 μ M
25%	1,5mM	0,075 μ M
12,5%	0,75mM	0,037 μ M
6,25%	0,375mM	0,018 μ M

Tabela 6: cálculos usados para definir os valores absolutos dos CI_{50}

MET	MBZ
100% _____ 6mM	100% _____ 0,3 μ M
29% _____ X	29% _____ X
X= ~ 1,7mM	X= ~ 88nM

5.2 EFEITO DA METFORMINA E DO MEBENDAZOL, ISOLADOS E EM ASSOCIAÇÃO, NA MIGRAÇÃO CELULAR POR MEIO DO *SCRATCH ASSAY*

A metformina demonstrou inibir a capacidade de migração das células a partir do tempo de 12h com a dose de 3,1mM, correspondente a metade da concentração do CI_{50} , apresentando ($p < 0,01$). No mesmo tempo de 12h, com a concentração de 6,2mM (CI_{50}), houve uma melhora da confiabilidade do teste apresentando $p < 0,001$. O tratamento somente com mebendazol demonstrou inibir a migração a partir do tempo de 24h com a concentração da metade do CI_{50} (150nM, $p < 0,01$) e com a concentração do CI_{50} (300nM, $p < 0,001$), também demonstrando um efeito dose-dependente. Ao se combinar as drogas metformina e mebendazol, a inibição permaneceu a partir do tempo de 12h, porém com melhor confiabilidade e em menores concentrações, 850 μ M e 44nM (referentes a metade do CI_{50} , $P < 0,001$), respectivamente, o que sugere um efeito sinérgico proveniente da combinação das drogas (Figura 7, 8, 9 e 10).

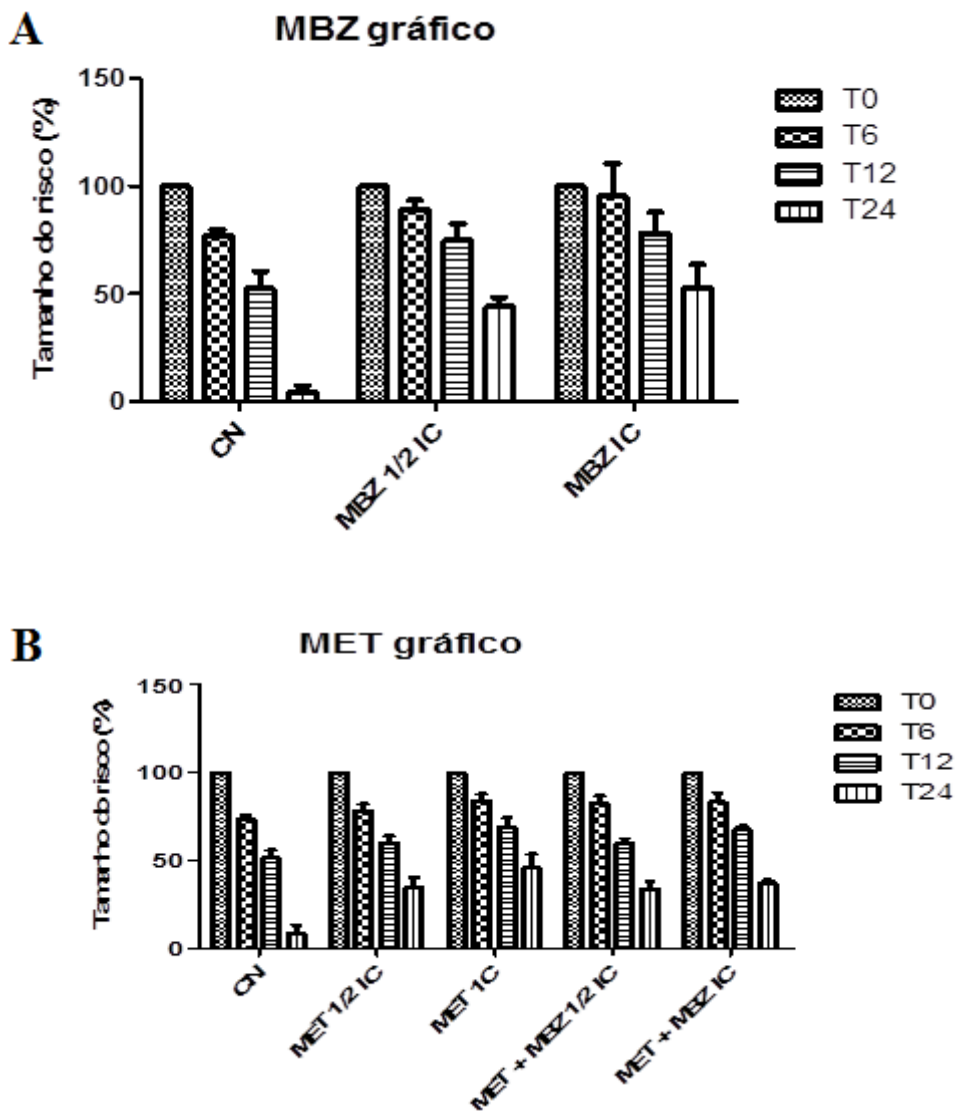


Figura 7. Avaliação do efeito de metformina e mebendazol na migração celular. A) mebendazol (MBZ) inibiu a migração celular no tempo de 24hs após tratamento. B) metformina (MET) inibiu a migração celular a partir de 12hs após tratamento. Metformina+mebendazol inibiu a migração celular a partir de 12hs. $p < 0,01$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente.

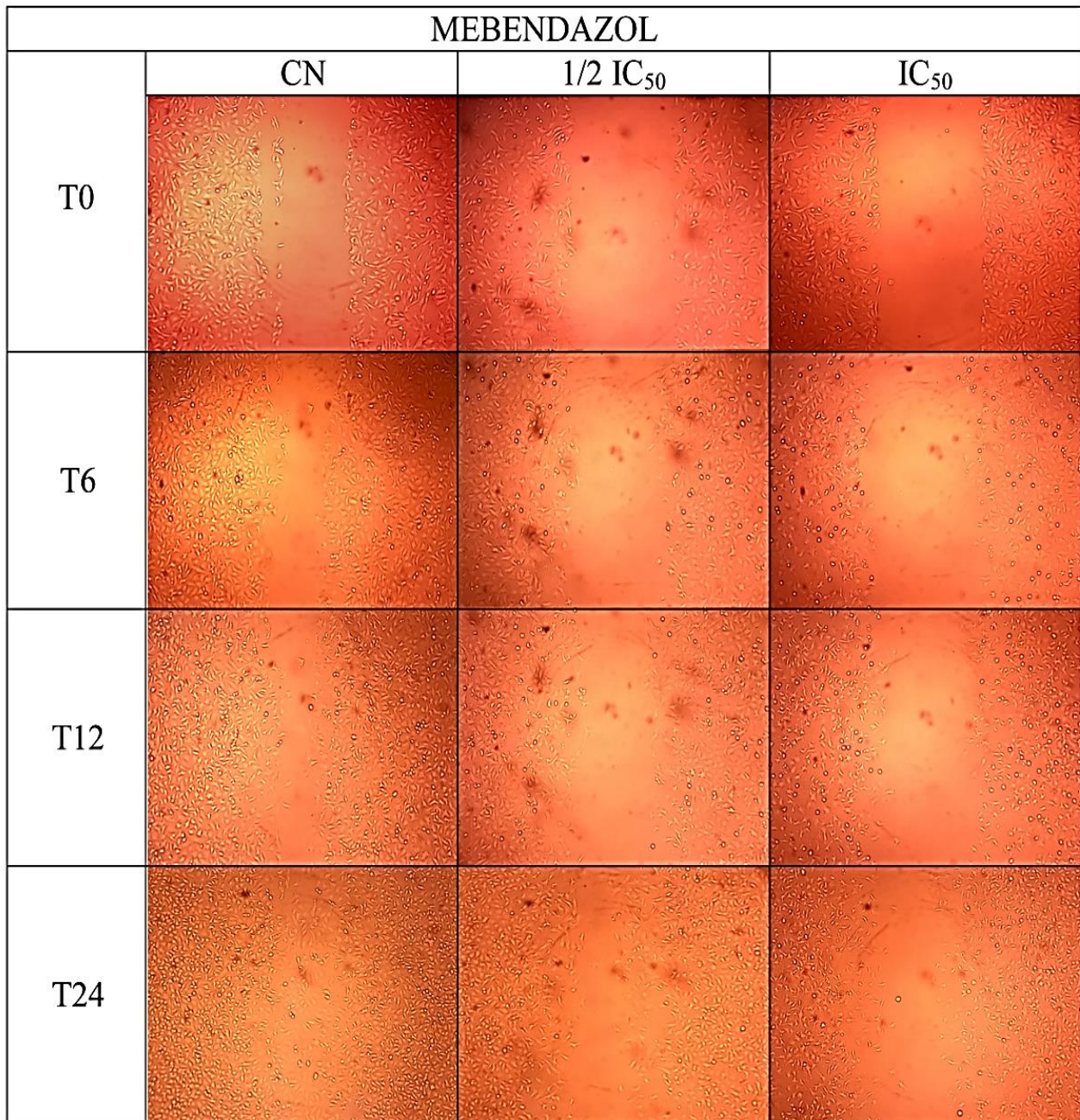


Figura 8. Fotografias do ensaio de migração após tratamento com mebendazol. Tempos: 0hora; 6 horas; 12horas e 24 horas. CN= controle negativo. $1/2IC_{50}= 150nM$; $IC_{50}=300nM$.

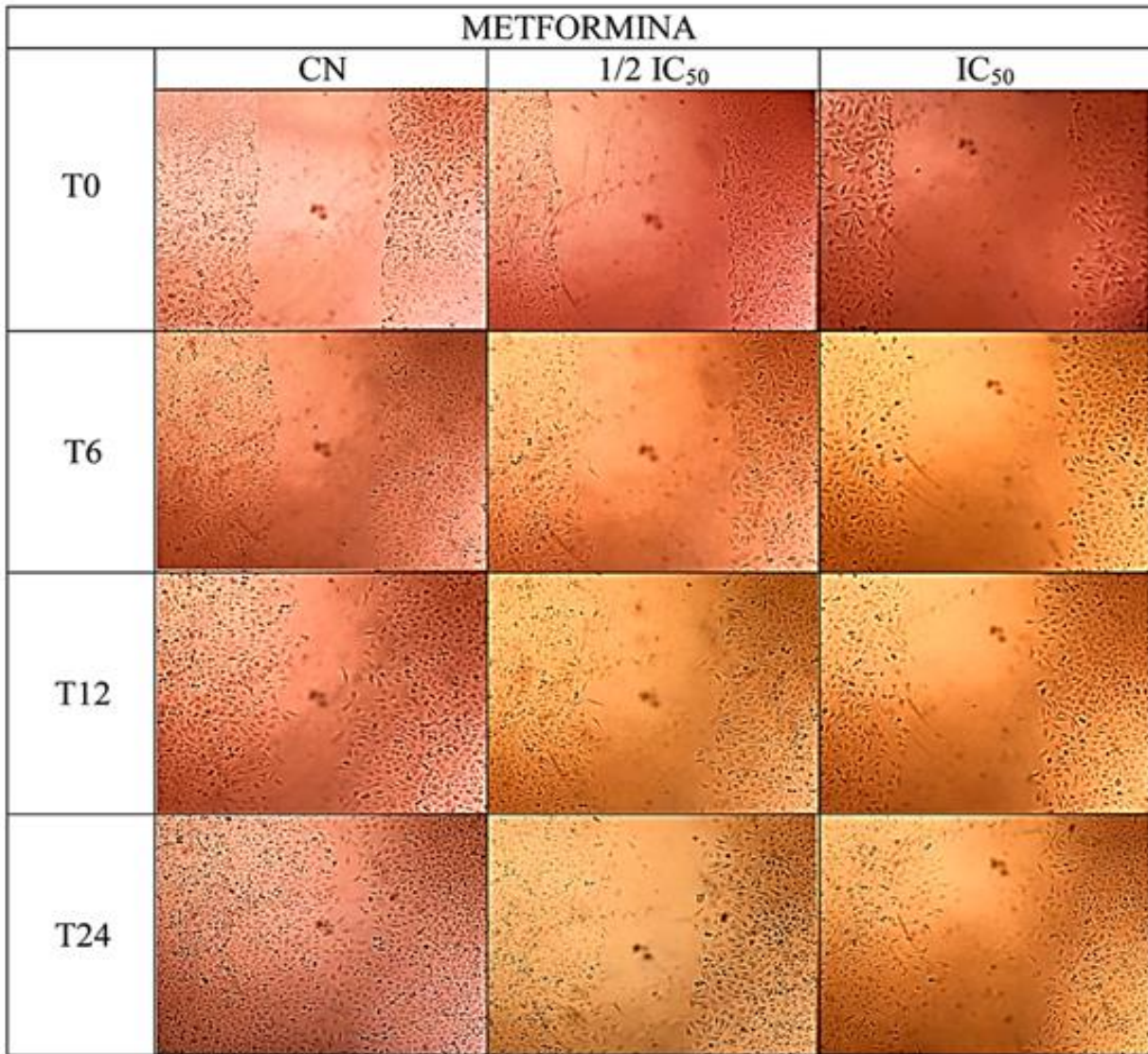


Figura 9. Fotografias do ensaio de migração após tratamento com metformina. Tempos: 0 hora; 6 horas; 12 horas e 24 horas. CN= controle negativo. 1/2IC₅₀= 3,1mM; IC₅₀=6,2mM.

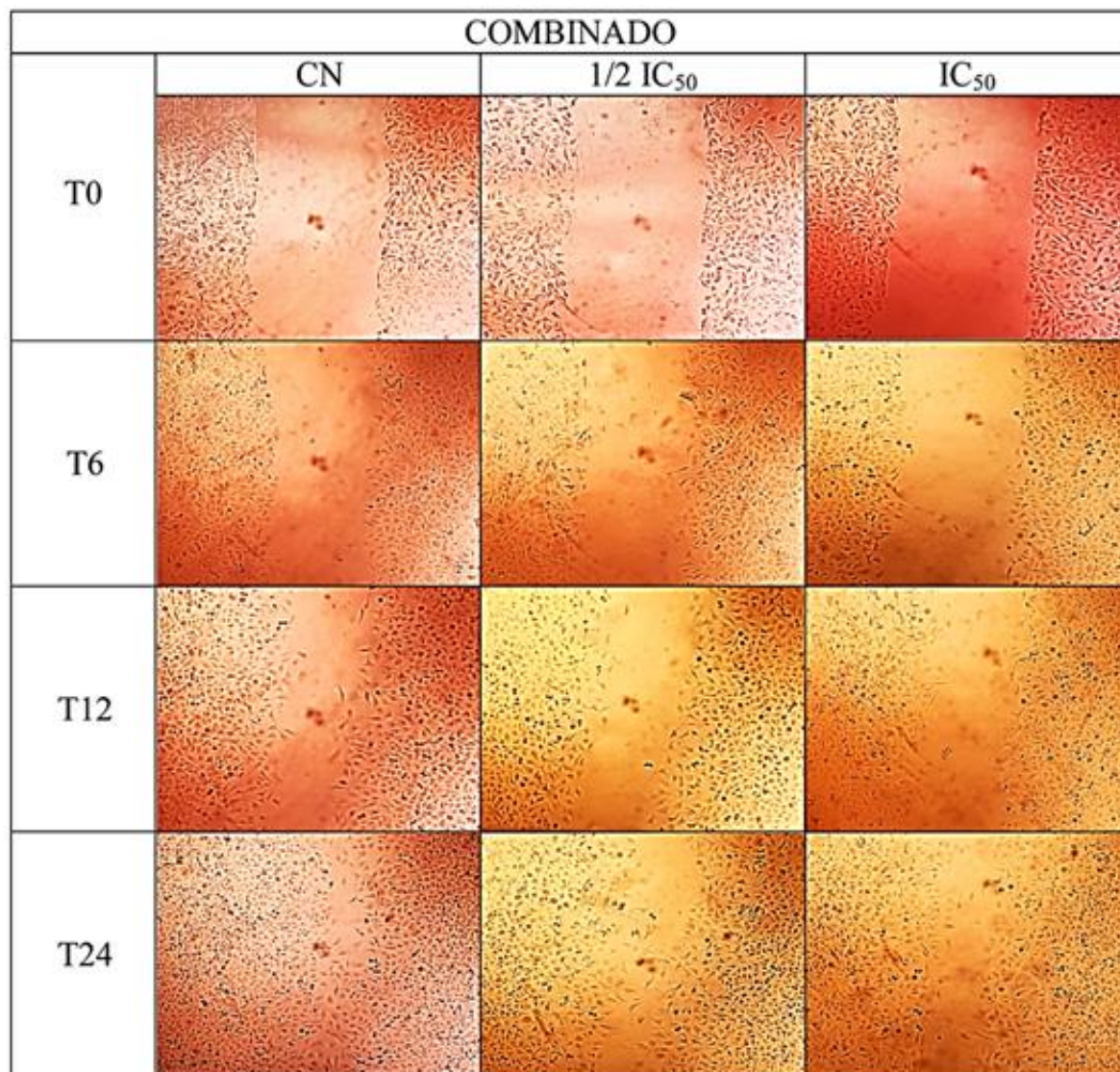


Figura 10. Fotografias do ensaio de migração após tratamento com metformina e mebendazol. Tempos: 0hora; 6 horas; 12horas e 24 horas. CN= controle negativo. 1/2IC₅₀= 850μM+44nM; IC₅₀=1,7mM+88nM.

5.3 EFEITO DA METFORMINA E DO MEBENDAZOL, ISOLADOS E EM ASSOCIAÇÃO, NO CICLO CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO

A metformina aumentou em 10% a população de células na fase G1/G0 ($p < 0,001$), e diminuiu em 30% a população de células na fase S ($p < 0,05$) e em 32% a população na fase G2/M com a concentração do CI₅₀. O tratamento com mebendazol aumentou em 13% o número de células na fase G1/G0 ($p = 0,001$) e diminuiu as populações de células nas fases S e G2/M (49% e 43%, respectivamente, $p = 0,001$), desde a concentração da metade do CI₅₀. A combinação de metformina com mebendazol na concentração do CI₅₀ também demonstrou aumentar a população de células na fase G1/G0 (13% $p < 0,001$) e diminuir o número de

células na fase G2/M (50% $p < 0,01$) além de diminuir em 56% a população de células na fase S, embora o resultado para este tenha sido estatisticamente inconclusivo (Figura 11).

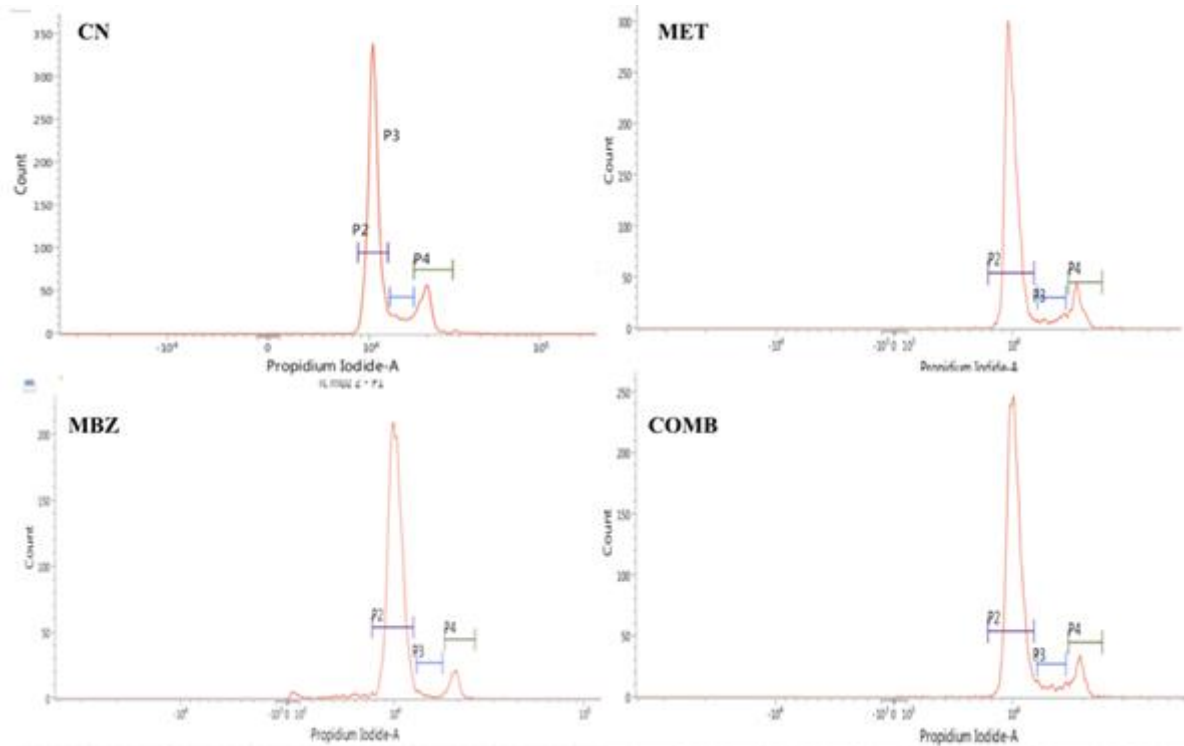


Figura 11. Progressão do ciclo celular após tratamento com os fármacos metformina e mebendazol. P2= fase G1/G0. P3= fase S. P4= fase G2/M

5.4 EFEITO DA METFORMINA E DO MEBENDAZOL, ISOLADOS E EM ASSOCIAÇÃO, NA MORTE CELULAR, POR CITOMETRIA DE FLUXO

Foi observado que a metformina induziu a apoptose de forma estatisticamente significativa a partir da concentração da metade do CI_{50} , com 74% das células em apoptose ($p < 0,05$), o aumento da concentração da metformina não aumentou significativamente a indução de apoptose. O mesmo foi observado para o tratamento com os fármacos combinadas, que permitiu a indução da apoptose em concentrações baixas, da metade do CI_{50} combinado, quando comparado ao grupo não tratado com 78% das células em apoptose ($p < 0,01$). Não houve diferença estatística quando comparados os tratamentos isolados e combinados. A análise do tratamento com mebendazol possibilitou identificar estatisticamente a indução diferencial de apoptose inicial (34,64%) e apoptose tardio (19,49%), desde a concentração da

metade do CI_{50} ($p < 0,001$ e $p < 0,01$, respectivamente). O tratamento com a maior concentração de mebendazol, referente ao CI_{50} , demonstrou diferença estatisticamente significativa na porcentagem de apoptose tardia ($p < 0,001$) (Figura 12 e Figura 13).

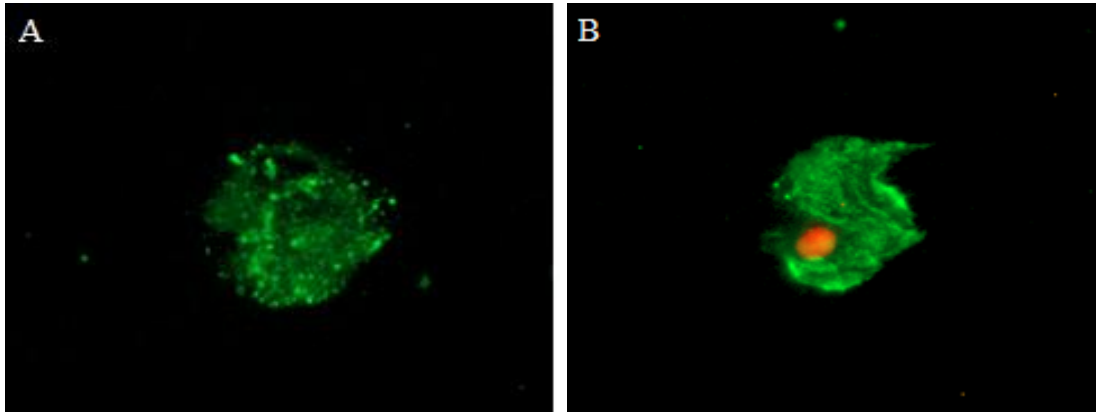


Figura 12. Ilustração de células em apoptose por imagem de microscópio de fluorescência. A) célula marcada por anexina-FITC. Apoptose inicial. B) célula marcada por anexina-FITC e por núcleo marcado por iodeto de propídio. Apoptose tardia.

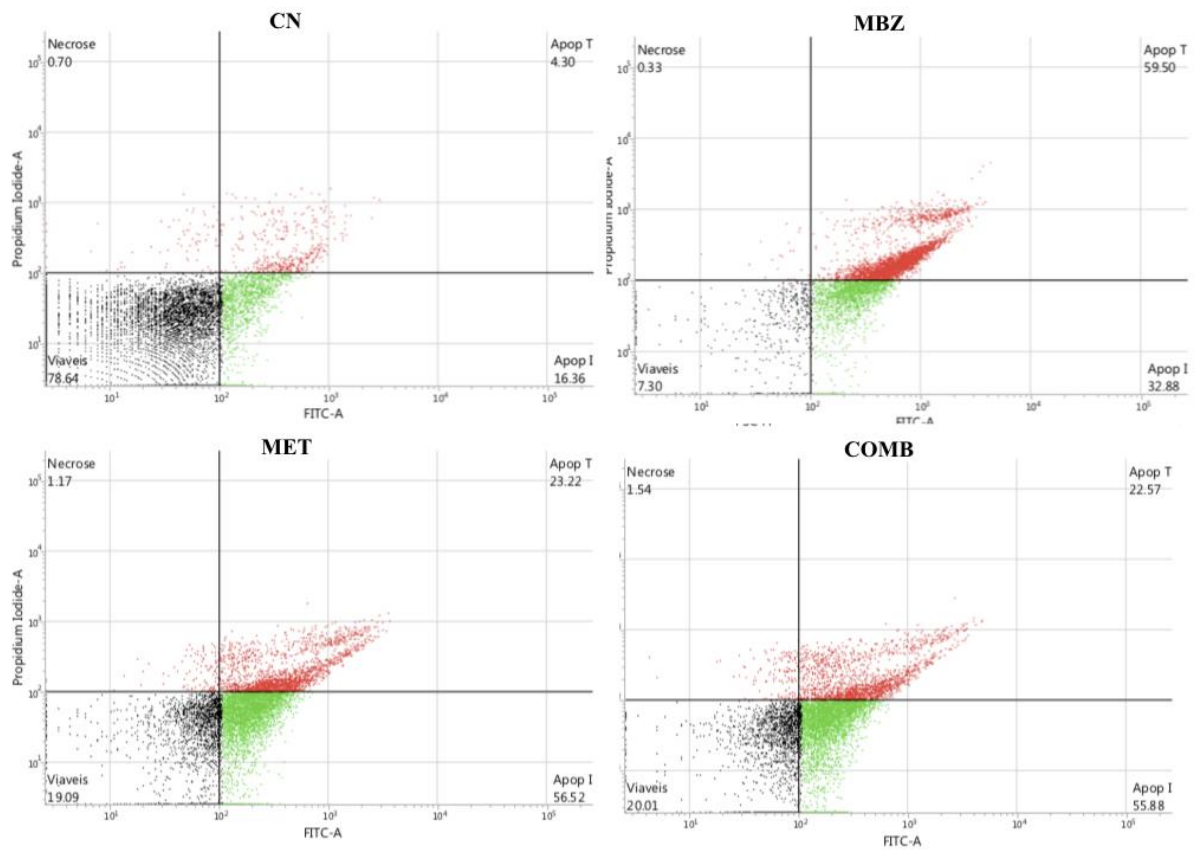


Figura 13. Dot plots utilizados na análise dos efeitos dos fármacos na indução da apoptose. CN= controle negativo. MBZ= mebendazol. MET= metformina. COMB= combinado.

6 DISCUSSÃO

Os dados apresentados referentes à atividade antiproliferativa da metformina e mebendazol assemelham-se aos achados de outros estudos em linhagens celulares cancerígenas. Em um estudo de câncer gástrico com linhagens celulares do tipo difuso e intestinal, a metformina apresentou, de forma semelhante a este, um IC_{50} de 5mM e em linhagens do tipo difuso e IC_{50} de 10mM em linhagens do tipo intestinal (COURTOIS *et al.*, 2017).

A metformina também demonstrou atividade antiproliferativa em outros tipos de câncer, incluindo o mieloma múltiplo - IC_{50} 17mM (WANG *et al.*, 2018), o câncer de esôfago - 10mM (TANG *et al.*, 2017) e o câncer de pulmão - IC_{50} 5mM (ZHANG *et al.*, 2017), demonstrando que a resposta da metformina depende, além da dose e tempo de exposição, da sua sensibilidade a cada linhagem celular.

A atividade antiproliferativa do mebendazol já foi testado na mesma linhagem de câncer gástrico utilizada no presente estudo no ano de 2015, em que foi demonstrado o IC_{50} de 590nM (PINTO, *et al.*, 2015), confrontando o novo achado de 300nM, que pode ser explicado pelas possíveis mutações geradas nesta linhagem no decorrer dos anos após manipulações necessárias para a sua manutenção tornando-as mais sensíveis a este fármaco. Estudos em diferentes tipos câncer também comprovaram a sua eficácia antiproliferativa, incluindo o glioblastoma - 240nM (BAI *et al.*, 2011), o melanoma - 300nM (DOUDICAN *et al.*, 2008) e carcinoma adrenocortical - 230nM (MARTARELLI *et al.*, 2008).

Os fármacos metformina e mebendazol demonstraram pela primeira vez, de acordo com a literatura atual, um efeito sinérgico quando administradas de forma associadas na atividade antiproliferativa. Este efeito provavelmente se deve ao fato de agirem em vias diversas com mecanismos de ação diferentes que impedem o desenvolvimento das células cancerígenas, deixando-as mais propensas à morte celular.

Outras pesquisas já demonstraram o efeito sinérgico da metformina com outros fármacos em estudos *in vitro*. A metformina associada ao pemetrexato fez com que o valor de IC_{50} do pemetrexato diminuísse de 3,37 μ M isolado para 640nM ao ser combinado com a metformina em linhagem de câncer de pulmão (ZHANG, Y. *et al.*, 2017). O mesmo já foi relatado para o mebendazol, tendo em vista que em um estudo de câncer de mama o mebendazol aumentou o potencial antineoplásico do quimioterápico gentamicina, inclusive em linhagens resistentes a quimioterápicos (COYNE *et al.*, 2013). Em câncer de cabeça e

pescoço, o mebendazol produziu um efeito sinérgico com o quimioterápico cisplatina no efeito antiproliferativo (ZHANG *et al.*, 2017_b).

Os resultados encontrados na inibição da migração celular confirmam os achados de diversos estudos. Em um estudo com a linhagem AGP01 tratada com mebendazol na concentração de 100nM, a inibição significativa ocorreu a partir do tempo 24h ($p < 0,05$) (PINTO *et al.*, 2015). Em linhagens de câncer de cabeça e pescoço, o mebendazol demonstrou inibir a migração mesmo após 36h de tratamento na concentração de 300nM (ZHANG *et al.*, 2017). A metformina demonstrou inibir a capacidade de migração em linhagens de câncer de pulmão após 48h de tratamento na concentração de 4,72mM ($p < 0,05$) (ZHANG, Y. *et al.*, 2017). A associação da metformina com mebendazol não interferiu no tempo de cicatrização, houve somente a melhora da confiabilidade do ensaio.

O bloqueio na progressão do ciclo celular causado pela metformina já foi relatado em estudo de câncer gástrico, Courtois *et al.* (2017), identificou que a metformina interferiu de maneira dose-dependente na progressão do ciclo celular, na concentração máxima de 50 mM, aumentou a porcentagem de células na fase G1/G0 em 33%, diminuiu em 15% a população da fase S e em 13% a população da fase G2/M. Corroborar também o estudo de Tang *et al.* (2017), que demonstrou o bloqueio na fase G1/G0, nas concentrações de 10mM e 20mM em linhagens de câncer de esôfago. O efeito do mebendazol no ciclo celular assemelham-se ao relatado por Zhang *et al.* (2017), que observou o aumento da porcentagem de células na fase G1/G0, na concentração de 200nM em linhagem de carcinoma epidermóide de língua.

Os resultados do ensaio de apoptose demonstraram que a metformina provocou um efeito indutor estatisticamente significativo na linhagem AGP01, nas duas concentrações testadas, relativas ao CI_{50} e metade do CI_{50} . Os resultados estão de acordo com os apresentados por Li *et al.* (2017), em que a metformina induziu a apoptose em linhagens de carcinoma espinocelular esofágico e também com Zhang *et al.* (2017) em linhagens de câncer de pulmão de células não pequenas. O tratamento com mebendazol mostrou-se eficaz para inibição da proliferação celular por indução da apoptose, resultados similares foram encontrados por Zhang *et al.* (2017_b). A combinação de metformina com mebendazol não demonstrou diferenças estatísticas quando comparado ao tratamento isolado da metformina. Porém, é importante destacar que o tratamento combinado dos fármacos, por estarem em menor concentração, possivelmente apresentariam menor toxicidade.

As concentrações de metformina usada no presente estudo, IC_{50} 6,2mM, $\frac{1}{2} IC_{50}$ 3,2mM e IC_{50} 1,7mM, $\frac{1}{2} IC_{50}$ 850 μ M para o efeito anticancerígeno ultrapassam o pico da concentração sérica utilizado no tratamento da diabetes tipo 2. No entanto, foi demonstrado

que a carga positiva da metformina poderia promover a sua acumulação dentro da matriz mitocondrial em concentrações superiores a 20mM (WILCOCK *et al.*, 1994). Visto que a metformina se acumula nos tecidos em concentrações muito maiores que as do sangue, pode-se esperar que as concentrações utilizadas em modelos pré-clínicos sejam alcançadas com o acúmulo de doses menores. O efeito cumulativo da metformina foi observado em um estudo com linhagens de câncer de tireoide que sugere que mesmo em doses baixas, com exposição prolongada, seja possível atingir respostas antiproliferativas, o que poderia explicar o porquê de pacientes diabéticos em uso crônico de metformina em dose terapêutica, apresentarem menor incidência de câncer (KHEDER *et al.*, 2017). Outro ponto a se considerar é o fato de que as células usadas neste estudo são mantidas em cultura e estão expostas ao meio DMEM “high glucose” e suplementadas com 10% de SBF o que resulta em forte estímulo do crescimento celular, provavelmente por este motivo seja necessário uma dose tão elevada de metformina.

Os diversos efeitos do mebendazol sobre a inibição dos microtúbulos podem explicar suas atividades sobre a proliferação, migração, apoptose e ciclo celular. Os microtubulos são reconhecidos como componentes principais do citoesqueleto, sendo essenciais para estrutura celular, transporte intracelular, mitose e divisão celular (Nogales, 2000). Vários estudos demonstraram que componentes do citoesqueleto estão envolvidos em interações adesivas durante o processo da metástase (KORB *et al.*, 2004). Quimioterápicos amplamente empregados na terapia de diversos tipos de câncer, como vincristina, vimblastina, docetaxel e paclitaxel, exercem seus efeitos anticancerígenos interagindo com os microtúbulos, causando parada do ciclo celular e induzindo a apoptose. Além disso, algumas drogas que agem sobre os microtúbulos podem atuar como agentes de direcionamento vascular, despolimerizando os microtúbulos da vasculatura recém-formada para interromper o fornecimento de sangue aos tumores (JORDAN *et al.*, 2004). A ruptura da estrutura dos microtubulos causada pelo mebendazol já foi comprovada na linhagem AGP01 no estudo de PINTO *et al.* (2015).

O mecanismo de ação da metformina que está sendo amplamente explorado e permite explicar os efeitos biológicos anticâncer da metformina incluem sua capacidade de ativar a via AMPK, um mecanismo que está bem descrito em estudo com linhagens de câncer gástrico (HAN *et al.*, 2015). Em células epiteliais, a via AMPK conduz a efeitos antiproliferativos através de p53 e mTOR, duas vias à jusante que estão envolvidas no controle da proliferação celular mediada pela regulação do ciclo celular e síntese proteica. A ativação de AMPK leva à regulação positiva da via p53 com subsequente inibição de quinases dependentes de ciclina

(CDKs), como CDK1 e, portanto, eventualmente a parada do ciclo celular no ponto de regulação G1/S (GUPPY *et al.*, 2011).

Assim, a ativação de AMPK também leva à diminuição da fosforilação e inibição da via mTOR pelo complexo supressor de tumor da esclerose tuberosa (TSC2). O TSC2 atua como um regulador de vários insumos envolvidos no crescimento celular, incluindo as vias PI3K/PTEN/Akt e Ras/Raf/ERK. A via mTOR fosforila a p70S6 quinase (S6K1) e a proteína de ligação 4E 1 (4E-BP1), ambas envolvidas na ativação dos ribossomos para participar da síntese de proteínas. Assim, no geral, a ativação da AMPK leva à inibição da mTOR e à regulação positiva da p53, levando à diminuição da proliferação e da síntese proteica, bem como à redução da tradução do mRNA de genes envolvidos na proliferação celular (GUPPY *et al.*, 2011).

7 CONCLUSÃO

A metformina e o mebendazol provocaram a citotoxicidade nas células da linhagem AGP01 e demonstraram ter efeito citotóxico e antiproliferativo sinérgico ao serem administradas em combinação. A metformina inibiu a migração celular a partir do tempo de 12 horas e o mebendazol a partir do tempo de 24hs, e a combinação dos dois fármacos permitiu a inibição da migração em concentrações muito mais baixas. Os fármacos também demonstraram impedir a progressão do ciclo celular e induzir a morte celular por apoptose, a partir da concentração de metade do CI_{50} inclusive no tratamento combinado, estes dados confirmam o efeito antiproliferativo dos fármacos na linhagem metastática de câncer gástrico. Ambos os fármacos apresentaram bons efeitos antineoplásicos e a combinação deles permitiu reduzir consideravelmente as concentrações mantendo efeitos semelhantes.

REFERÊNCIAS

ACS American Câncer Society. What Are the Risk Factors for Stomach Cancer? Disponível em: <<https://www.cancer.org/cancer/stomach-cancer/causes-risks-prevention/risk-factors.html>>. Acessado em: 19 de março de 2017

ACS American Câncer Society. Disponível em: <https://www.cancer.org/cancer/stomach-cancer/treating/chemotherapy.html>. Acessado em: 03 de janeiro de 2018

ACS American Cancer Society. Stomach Cancer. Disponível em: <<http://www.cancer.org/cancer/stomachcancer/detailedguide/stomach-cancer-risk-factors>>. Acessado em: 19 de março de 2017

AHN JS, Bang HY, Lee JI, Noh WC, Hwang DY, Choi DW, Paik NS, Moon NM, Choi TI. Recurrence of early gastric cancer. **J Korean Gastric Cancer Assoc.** v.1, p.180–186, 2001.

ALMEIDA, V. L.; ANDREI L.; LUISA, C. B. R.; CARLOS, A. M.; CLAUDIO, L. D.; TERESA, P. M. L. Câncer e Agentes Antineoplásicos Ciclo-Celular Específicos e Ciclo-Celular não Específicos que Interagem com o DNA: Uma Introdução. **Quim. Nova.**, **28**(1): 118-129. 2005.

BAI, Ren-Yuan et al. Antiparasitic mebendazole shows survival benefit in 2 preclinical models of glioblastoma multiforme. **Neuro-oncology**, v. 13, n. 9, p. 974-982, 2011.

BASKIĆ, D.; POPOVIĆ, S.; RISTIĆ, P.; ARSENIJEVIĆ, N. N. Analysis of cycloheximide-induced apoptosis in human leukocytes: fluorescence microscopy using annexin V/propidium iodide versus acridin orange/ethidium bromide. **Cell Biol Int.**, **30**(11): 924-32. 2006.

BERRIDGE, M. V.; TAN, A. 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. **Arch Biochem Biophys.**, **303**(2):474-82.1993.

BEZERRA, D. P.; PESSOA C. DE MORAES, M. O.; SILVEIRA, E. R.; LIMA, M. A.; ELMIRO, F. J.; COSTA-LOTUFO, L. V. Antiproliferative effects of two amides, piperine and pipartine, from Piper species. **Z. Naturforsch C.**, **60**(7): 539 - 43. 2005.

BORRMANN, R. Geschwulste des margens. In: Henke F, Lubarsch O. editors. Handbuch spez pathol anat und histo. Berlin: Springer: Verlag; 1926. p.864-71.

BRUCKNER, H.W.; KONDO, T.; KONDO, K. Neoplasms of the stomach. *In*: Holland JF, Bast RC, Morton DL, Frei E III, Kufe DW, Weichselbaum RR, eds. Cancer medicine. Baltimore: Williams & Wilkins, v. 1879, p. 22, 1997.

CHAMBERS, A. F.; GROOM, A. C.; MACDONALD, I. C. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. **Nature Rev. Cancer.**, **2**: 563–572. 2002.

COYNE, C. P.; JONES, Toni; BEAR, Ryan. Gemcitabine-(C4-amide)-[anti-HER2/neu] anti-neoplastic cytotoxicity in dual combination with mebendazole against chemotherapeutic-

resistant mammary adenocarcinoma. **Journal of clinical & experimental oncology**, v. 2, n. 2, 2013.

COURTOIS, Sarah et al. Metformin targets gastric cancer stem cells. **European Journal of Cancer**, v. 84, p. 193-201, 2017.

DE Martel C, Forman D, Plummer M. Gastric cancer: epidemiology and risk factors. *Gastroenterol Clin North Am.* 2013; 42(2):219-40. doi: 10.1016/j.gtc.2013.01.003.

DAHDALEH, Fadi S.; TURAGA, Kiran K. Evolving Treatment Strategies and Outcomes in Advanced Gastric Cancer with Peritoneal Metastasis. **Surgical Oncology Clinics of North America**, v. 27, n. 3, p. 519-537, 2018.

DOUDICAN N, Rodriguez A, Osman I, Orlow SJ. Mebendazole induces apoptosis via Bcl-2 inactivation in chemoresistant melanoma cells. **Mol Cancer Res.** V.6, p.1308–1315, 2008.

GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality. Worldwide: IARC CancerBase No. 11. International Agency for Research on Cancer. Disponível em: <http://globocan.iarc.fr>. Acesso em: 30/05/2018.

GUPPY, Amy; JAMAL-HANJANI, Mariam; PICKERING, Lisa. Anticancer effects of metformin and its potential use as a therapeutic agent for breast cancer. **Future Oncology**, v. 7, n. 6, p. 727-736, 2011.

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

HAN, Gang et al. AMPK/mTOR-mediated inhibition of survivin partly contributes to metformin-induced apoptosis in human gastric cancer cell. **Cancer biology & therapy**, v. 16, n. 1, p. 77-87, 2015.

HARA, Masayasu et al. Comparative analysis of intraperitoneal minimal free cancer cells between colorectal and gastric cancer patients using quantitative RT-PCR: possible reason for rare peritoneal recurrence in colorectal cancer. **Clinical & experimental metastasis**, v. 24, n. 3, p. 179-189, 2007.

HAN, Tae-Su et al. Dissemination of free cancer cells from the gastric lumen and from perigastric lymphovascular pedicles during radical gastric cancer surgery. **Annals of surgical oncology**, v. 18, n. 10, p. 2818-2825, 2011.

HIRASAWA K, Kokawa A, Oka H, Yahara S, Sasaki T, Nozawa A, et al. Risk assessment chart for curability of early gastric cancer with endoscopic submucosal dissection. *Gastrointestinal Endoscopy*;74(6):1268–75, 2011.

HYUNG, Woo Jin et al. Analyses of prognostic factors and gastric cancer specific survival rate in early gastric cancer patients and its clinical implication. **Journal of the Korean Surgical Society**, v. 65, n. 4, p. 309-315, 2003.

IGLESIAS, David A. et al. Another surprise from Metformin: novel mechanism of action via K-Ras influences endometrial cancer response to therapy. **Molecular cancer therapeutics**, v. 12, n. 12, p. 2847-2856, 2013.

INCA - Instituto Nacional do Câncer. Estimativa 2016/2017- Incidência de câncer no Brasil. Disponível em: <<http://www.inca.org.br>>. Acessado em: 15 de março de 2017.

INCA – Instituto Nacional do Câncer. Período 2010/2014 – Distribuição proporcional de mortes por câncer. Disponível em: <https://mortalidade.inca.gov.br/MortalidadeWeb> – Acessado em fevereiro de 2017.

JIANG Y, Ajani JA. Multidisciplinary management of gastric cancer. **Current Opinion in Gastroenterology**, v.26, p.640–6, 2010.

JORDAN, Mary Ann; WILSON, Leslie. Microtubules as a target for anticancer drugs. **Nature Reviews Cancer**, v. 4, n. 4, p. 253, 2004.

KANG KJ, Kim KM, Min BH, Lee JH, Kim JJ. Endoscopic submucosal dissection of early gastric cancer. **Gut and Liver**, v.5(4):418–26, 2011.

KHEDER, Safar et al. Effects of prolonged exposure to low dose metformin in thyroid cancer cell lines. **Journal of Cancer**, v. 8, n. 6, p. 1053, 2017.

KORB, Timo et al. Integrity of actin fibers and microtubules influences metastatic tumor cell adhesion. **Experimental cell research**, v. 299, n. 1, p. 236-247, 2004.

KREJS, Guenter J. Gastric cancer: epidemiology and risk factors. **Digestive Diseases**, v. 28, n. 4-5, p. 600-603, 2010.

LARSEN, Andrew R. et al. Repurposing the antihelminthic mebendazole as a hedgehog inhibitor. **Molecular cancer therapeutics**, p. molcanther. 0755.2014, 2014.

LAUREN, Pekka. The two histological main types of gastric carcinoma, an attempt at a histoclinical classification. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, v. 64, p. 31-49, 1965.

LIANG, C. C.; PARK, A. Y.; GUAN, J. L. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. **Nat Protoc.**, 2(2):329-33. 2007.

LIBBY, Gillian et al. New users of metformin are at low risk of incident cancer: a cohort study among people with type 2 diabetes. **Diabetes care**, 2009.

LI, Pin Dong et al. Redox-dependent modulation of metformin contributes to enhanced sensitivity of esophageal squamous cell carcinoma to cisplatin. **Oncotarget**, v. 8, n. 37, p. 62057, 2017.

LIU, Xi; MELTZER, Stephen J. Gastric Cancer in the Era of Precision Medicine. **Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology**, v. 3, n. 3, p. 348, 2017.

MACDONALD, Louisa M. et al. Characterisation of benzimidazole binding with recombinant tubulin from *Giardia duodenalis*, *Encephalitozoon intestinalis*, and *Cryptosporidium parvum*. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 138, n. 1, p. 89-96, 2004.

MARRONE, Kristen A. et al. A Randomized Phase II Study of Metformin plus Paclitaxel/Carboplatin/Bevacizumab in Patients with Chemotherapy-Naïve Advanced or Metastatic Nonsquamous Non-Small Cell Lung Cancer. **The oncologist**, p. theoncologist. 2017-0465, 2018.

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.

MCGAHON, A. J.; MARTIN S. J.; BISSONNETTE R. P.; MAHBOUBI A.; SHI Y.; MOGIL R. J.; NISHIOKA W. K.; GREEN D. R. The end of the (cell) line: methods for the study of apoptosis in vitro. **Methods Cell Biol.**, 46:153-85. 1995.

MEBENDAZOL, MEDLEY. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=7722732014&pIdAnexo=2213915. Acessado em: 01 de maio de 2017

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. Acessado: 13 de agosto de 2017.

METFORMINA, NEOQUIMÍCA. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=24789022016&pIdAnexo=4012094. Acessado em: 01 de maio de 2017

MINISTÉRIO DA SAÚDE - Diretrizes Terapêuticas. Protocolos Clínicos e Diretrizes Terapêuticas em Oncologia 2014. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/protocolos_clinicos_diretrizes_terapeuticas_oncologia.pdf. Acesso em: 19/03/2017.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods.**; 65(1-2):55-63 1983.

NOGALES, Eva. Structural insights into microtubule function. **Annual review of biochemistry**, v. 69, n. 1, p. 277-302, 2000.

PAOLETTI, X. Oba K, Burzykowski T, Michiels S, Ohashi Y, Pignon JP, et al. Benefit of adjuvant chemotherapy for resectable gastric cancer: a meta-analysis. **JAMA.**;303(17):1729–37, 2010.

PESSOA, C.; SILVEIRA, E.R, LEMOS, TL, WETMORE, LA, MORAES, MO, LEYVA, A. Antiproliferative effects of compounds derived from plants of Northeast Brazil. **Phytother Res.**, 14(3):187-91. 2000.

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.

RAVAL, Amit D. et al. Association between Metformin Use and Cancer Stage at Diagnosis among Elderly Medicare Beneficiaries with Preexisting Type 2 Diabetes Mellitus and Incident Prostate Cancer. **Journal of Diabetes Research**, v. 2016, 2016.

RIVAS-ORTIZ, Claudia I. et al. Genetic Alterations in Gastric Cancer Associated with Helicobacter pylori Infection. **Frontiers in medicine**, v. 4, p. 47, 2017.

ROBBINS E COTRAN. Patologia - **Bases Patológicas das Doenças**. 7 ed., Elsevier - Campus, 2005.

RÖCKEN, Christoph. Molecular classification of gastric cancer. **Expert review of molecular diagnostics**, v. 17, n. 3, p. 293-301, 2017.

SAHRA, Issam Ben et al. Metformin in cancer therapy: a new perspective for an old antidiabetic drug?. **Molecular cancer therapeutics**, v. 9, n. 5, p. 1092-1099, 2010.

SASAKI, Ji-ichiro et al. The Anthelmintic Drug Mebendazole Induces Mitotic Arrest and Apoptosis by Depolymerizing Tubulin in Non-Small Cell Lung Cancer Cells 1 Supported in part by grants from the National Cancer Institute and the NIH Specialized Program of Research Excellence in Lung Cancer P-50-CA70907 and P01 CA78778-01A1 (both to JAR), by gifts to the Division of Surgery and Anesthesiology from Tenneco and Exxon for the Core Laboratory Facility, by The University of Texas MD Anderson Cancer Center Support Core Grant CA16672 ... **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 1, n. 13, p. 1201-1209, 2002.

SHACKELFORD, David B.; SHAW, Reuben J. The LKB1–AMPK pathway: metabolism and growth control in tumour suppression. **Nature Reviews Cancer**, v. 9, n. 8, p. 563-575, 2009.

SHIRAO, Kuniaki et al. Randomized Phase III study of 5-fluorouracil continuous infusion vs. sequential methotrexate and 5-fluorouracil therapy in far advanced gastric cancer with peritoneal metastasis (JCOG0106). **Japanese journal of clinical oncology**, v. 43, n. 10, p. 972-980, 2013.

SOMMARIVA, ANTONIO et al. Iterative Cytoreductive Surgery and Hyperthermic Intraperitoneal Chemotherapy for Recurrent Peritoneal Metastases. **Anticancer research**, v. 38, n. 9, p. 5521-5524, 2018.

STEWART, B. W.; WILD, C. P. (Ed.). World Cancer Report: 2014. Lyon: IARC, 2014.

STEWART, Z.A.; WESTFALL, M.D., PIETENPOL, J.A. Cell-cycle dysregulation and anticancer therapy. **Trends in Pharmacological Sciences.**, 16(1):48-63. 2003.

SZXEER - **Training Modules, Cancer Registration & Surveillance**. U. S. National Institutes of National Cancer Institute. Disponível em:

< training.seer.cancer.gov/anatomy/digestive/regions/stomach.html > acessado: 26 de outubro de 2017.

TAJARA, E. H. Ciclo Celular. In: FERREIRA, C.G.; ROCHA, J.C. Oncologia Molecular. 1 ed. São Paulo: **Atheneu.**, 65-76. 2004.

TAN D, Lauwers GY. Advances in surgical pathology. Gastric cancer. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2011. p. 73

TANG, Jian-Cai et al. Effects and mechanisms of metformin on the proliferation of esophageal cancer cells in vitro and in vivo. **Cancer research and treatment: official journal of Korean Cancer Association**, v. 49, n. 3, p. 778, 2017.

VALENTE, Tárík Olívar de Nunes et al. Análise das proteínas relacionadas a formação de metástase em linhagens de adenocarcinoma gástrico. 2014. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Pará.

VAN CUTSEM, Eric et al. Gastric cancer. **The Lancet**, v. 388, n. 10060, p. 2654-2664, 2016.

VICENTE-MANZANARES, M.; HORWITZ A. R. Cell migration: an overview. **Methods Mol Biol.**, **769**:1-24. 2011.

VIRGILIO, Edoardo et al. Gastric cancer cells in peritoneal lavage fluid: a systematic review comparing cytological with molecular detection for diagnosis of peritoneal metastases and prediction of peritoneal recurrences. **Anticancer research**, v. 38, n. 3, p. 1255-1262, 2018.

ZHA NG, Hui-Hui; GUO, Xiu-Li. Combinational strategies of metformin and chemotherapy in cancers. **Cancer chemotherapy and pharmacology**, v. 78, n. 1, p. 13-26, 2016

ZHANG, Yan et al. Metformin synergistic pemetrexed suppresses non-small-cell lung cancer cell proliferation and invasion in vitro. **Cancer medicine**, v. 6, n. 8, p. 1965-1975, 2017.

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, 2017b.

WANG, Yan et al. Metformin induces autophagy and G0/G1 phase cell cycle arrest in myeloma by targeting the AMPK/mTORC1 and mTORC2 pathways. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 37, n. 1, p. 63, 2018.

WILCOCK, C.; BAILEY, C. J. Accumulation of metformin by tissues of the normal and diabetic mouse. **Xenobiotica**, v. 24, n. 1, p. 49-57, 1994.