

Luiza Sheyla Evenni Porfírio Will Castro

**ESTUDO DE REPOSICIONAMENTO DO ANTI-HELMÍNTICO
ALBENDAZOL: EFEITOS ANTITUMORAIS E GENOTÓXICOS**

Tese de doutorado submetida ao
Programa de Pós-Graduação em
Bioquímica da Universidade Federal
de Santa Catarina para a obtenção do
Grau de Doutor em Bioquímica.
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Rozangela
Curi Pedrosa.

Florianópolis
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Castro, Luiza Sheyla Evenni Porfírio Will Castro
ESTUDO DE REPOSICIONAMENTO DO ANTI-HELMÍNTICO
ALBENDAZOL : EFEITOS ANTITUMORAIS E GENOTÓXICOS /
Luiza Sheyla Evenni Porfírio Will Castro Castro ;
orientadora, Rozangela Curi Pedrosa Pedrosa, 2017.
203 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de
Pós-Graduação em Bioquímica, Florianópolis, 2017.

Inclui referências.

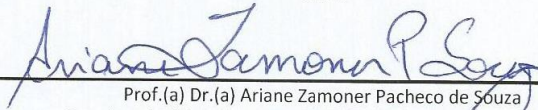
1. Bioquímica. 2. Estresse oxidativo. 3.
Intercalação e danos ao DNA. 4. Perda de
heterozigossidade. 5. Inibidor mitótico. I. Pedrosa,
Rozangela Curi Pedrosa. II. Universidade Federal de
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em
Bioquímica. III. Título.

“Estudo de reposicionamento do anti-helmíntico albendazol: efeitos antitumorais e genotóxicos”

Por

Luiza Sheyla Evenni Porfirio Will Castro

Tese julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (22/PPGBQA/2017) do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica - UFSC.

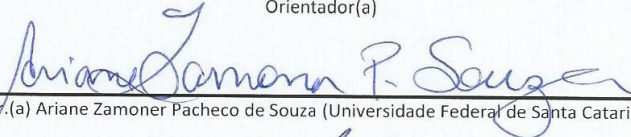


Prof.(a) Dr.(a) Ariane Zamoner Pacheco de Souza
Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica

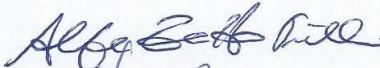
Banca examinadora:



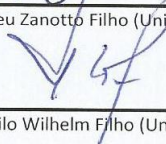
Dr.(a) Rozangela Curi Pedrosa (Universidade Federal de Santa Catarina)
Orientador(a)



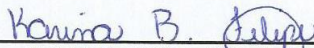
Dr.(a) Ariane Zamoner Pacheco de Souza (Universidade Federal de Santa Catarina)



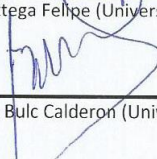
Dr.(a) Alfeu Zanotto Filho (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr.(a) Danilo Wilhelm Filho (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr.(a) Karina Bettega Felipe (Universidade Federal do Paraná)



Dr(a) Pedro Bulc Calderon (Universidad Arturo Prat)

Florianópolis, 14 de agosto de 2017.

Este trabalho é dedicado aos meus preciosos alicerces para o alcance de todos os meus sonhos e realizações: meus queridos pais, João e Raimunda Will, esposo e filha, Allisson e Sophia Castro, e irmã Karhen Will.

AGRADECIMENTOS

O agradecimento é algo inerente à jornada da vida, e todos os momentos, não só os de conquista, mas também os obstáculos, servem para o indivíduo crescer não só profissionalmente, mas também pessoalmente. Por isso e com muito orgulho gostaria de agradecer:

- A Deus, força espiritual sempre presente na minha vida, que me guiou para alcançar todos os meus propósitos;

- À minha orientadora Profa. Dr^a. Rozangela Curi Pedrosa, por confiar no meu trabalho durante esse período de construção, pela ética e saberes profissionais, sua enorme generosidade, ensinamentos e dedicação;

- Ao meu co-orientador do exterior Dr. Heinz Jacobs, que me auxiliou numa nova jornada, contribuindo com a construção de saberes e conhecimentos, e com sua enorme generosidade e confiança, proporcionou um local ideal para a minha inserção no seu grupo de pesquisa. Ao seu grupo de pesquisa: Farshid, Alessandra, Paul, Bass, Olga e Muhammad, por compartilharem momentos únicos nessa experiência profissional. Aos laboratórios colaboradores, coordenados por Hein te Riele e René Medema, a doutoranda Hellen e a pós-doutoranda Joanne;

- À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo auxílio financeiro no Brasil (CAPES-DS) e Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE 99999.000252/2015-08);

- Aos meus pais João Manuel de Sousa Will e Raimunda Porfirio Ribeiro Will, e sogros Luiz Carlos Garcez Castro e Maria de Deus Gomes Castro, que me apoiaram durante essa jornada;

•Ao meu querido esposo Allisson Jhonatan Gomes Castro, meu companheiro, motivador dos meus sonhos e alicerce da nossa família, e à nossa querida filha Sophia Will Castro, motivação especial em nossas vidas;

•À minha irmã Karhen Lola Porfírio Will, pelo companheirismo e solidariedade;

•Aos meus avós Maria Alves Porfírio *in memorian*, Aristides Duarte e Maria das Dores Duarte, Gina; aos meus tios Lilia, João Maria, Aurora, Jurema, Jair, Jailson, Georggia; aos meus cunhados Alex e Allan Castro, pelo apoio familiar e orações;

•Aos membros e amigos do Laboratório de Bioquímica experimental: prof^º. Dr^a Tânia, químico João Correia, Fabiana, Valdelúcia, Pedro, Nádia, Guilherme, Tânila, Gabriela, Jean, Cynthia, Rodrigo e Raquel; Aos professores Maicon Roberto Kwiecinski e Karina Bettega Felipe; à prof^º. Dr^a Fátima Regina Mena Barreto Silva e os membros do Laboratório de Hormônios & Transdução de Sinais; à prof^º. Dr^a Ariane Zamoner Pacheco de Souza e aos membros do Laboratório de Bioquímica Experimental e Sinalização Celular, em especial ao Eduardo Parisotto; ao Prof. Dr. Marcelo Farina e os membros do Laboratório de Neurotoxicidade de Metais;

•Aos Professores componentes da banca examinadora, pela cordialidade e disponibilidade na avaliação deste trabalho;

•Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, que contribuíram para minha formação;

•Aos funcionários do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica; Aos técnicos e biólogos dos laboratórios multiusuários LAMEBs, em especial ao Demétrio G. Alves e Vanessa Silva da Silva;

•Aos meus queridos amigos de Natal/RN que torceram por mim, em especial, Dra. Edda Lisboa Leite, Marília, Thuane, Rosana, Maria Luiza, Rosangela. E aos amigos feitos em Amsterdam, em especial à Elma Scott que, em sua generosidade, me tornou membro de sua família.

“O homem é do tamanho do seu sonho.”

(Fernando Pessoa)

“A persistência é o caminho do êxito.”

(Charles Chaplin)

RESUMO

O albendazol (ABZ) é um fármaco derivado do benzimidazol, com forte atividade anti-helmíntica associada à inibição da formação de microtúbulos. Estudos prévios revelaram que o ABZ é um importante gerador de espécies reativas de oxigênio (EROs) em roedores. Como as EROs induzem danos ao DNA e morte via apoptose, esse mecanismo de ação poderia ser utilizado para morte seletiva de células tumorais. Assim, o presente trabalho avaliou os efeitos do ABZ na indução do estresse oxidativo como uma ferramenta estratégica no desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas para quimioterapia do câncer. Os efeitos antitumorais do ABZ, o seu potencial de indução do estresse oxidativo, de danos ao DNA e os efeitos genotóxicos, foram investigados. Os resultados obtidos mostraram que ABZ interage com o DNA por intercalação e causa clivagem oxidativa do mesmo. O tratamento com ABZ, por um período de 24h, foi citotóxico para as células MCF-7 ($EC_{50} = 44,9 \mu\text{M}$). Baixas concentrações de ABZ ($0,4 \mu\text{M}$) foram capazes de reduzir a viabilidade de células transformadas e normais. A proliferação celular foi inibida (67,5% a $5 \mu\text{M}$) enquanto os níveis intracelulares de EROs aumentaram (123,0%) após o tratamento com ABZ. Por outro lado, o antioxidante N-acetil-L-cisteína foi capaz de reverter os efeitos citotóxicos, de indução de EROs e de perda do potencial de membrana mitocondrial de células MCF-7 tratadas com ABZ. Experimentos *in vivo* demonstraram que o crescimento do carcinoma de Ehrlich foi inibido (32,0%) e o tempo de sobrevivência foi alongado em animais tratados com ABZ (20 mg/kg). Os biomarcadores de estresse oxidativo (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico-TBARS e níveis de proteína carbonilada-PC) e de defesa antioxidante como a atividade das enzimas catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutatona redutase (GR) aumentaram, enquanto que a glutatona reduzida (GSH) foi depletada em animais tratados com ABZ, indicando uma condição de estresse oxidativo, possivelmente responsável pelos danos ao DNA, causando conseqüentemente, a fosforilação da histona H2AX e desencadeando a sinalização da apoptose (confirmada pelo aumento da correlação Bax/Bcl-xL e expressão das proteínas pro-apoptóticas p53 e Bax). Apesar do ABZ promover intercalação, este fármaco não afetou a replicação nem a transcrição. A análise do transcriptoma, de células DDT expostas ao ABZ, revelou uma modificação acentuada na assinatura de genes de tubulinas e genes envolvidos na divisão celular. Isso está em

concordância com acúmulo no estágio G2/M do ciclo celular da linhagem DDT exposta ao ABZ. Este fármaco demonstrou ser um potente indutor de perda de heterozigiosidade (LOH) *in vitro* e acelerador de missegregação cromossômica. Além disso, o ABZ mostrou ser um poderoso inibidor mitótico com forte potencial tumorigênico. Assim, o tratamento com ABZ pode ser um risco para pacientes que não tem câncer. Portanto, pode-se inferir que este fármaco induziu estresse oxidativo, promovendo a fragmentação do DNA, seguida da parada do ciclo celular na transição G2/M, desencadeando a apoptose e sugerindo que este fármaco possa ser uma molécula promissora para o reposicionamento como agente antitumoral. Adicionalmente, os resultados obtidos indicam que a segurança medicamentosa do ABZ precisa ser reavaliada devido ao seu potencial genotóxico.

Palavras-chave: Albendazol. Danos ao DNA. Inibidor mitótico. Intercalação no DNA. Perda de heterozigiosidade. Estresse oxidativo.

ABSTRACT

Albendazole (ABZ) is a benzimidazole-derived with strong anthelmintic activity *via* inhibition of microtubule formation. Prior studies revealed that the ABZ is an important generator of reactive oxygen species (ROS) in rodents. As ROS induce DNA damage and cell death *via* apoptosis, this mechanism could be used in selective death of tumors. This work evaluated the effects of ABZ on induction of oxidative stress as a strategic tool for development of new therapeutic alternatives for cancer chemotherapy. The ABZ antitumor effects, its potential for induction of oxidative stress, DNA damage and the genotoxic effects were evaluated. The results showed that ABZ interacts with DNA by intercalation and promotes oxidative cleavage on DNA. The ABZ treatment after 24h was cytotoxic for MCF-7 ($EC_{50} = 44.9 \mu\text{M}$). Low ABZ concentrations ($0.4 \mu\text{M}$) were able to reduce the survival of normal and malignant cell lines. Cellular proliferation was inhibited (67.5% at $5 \mu\text{M}$), while intracellular ROS levels increased after ABZ treatment (123.0%). The antioxidant N-acetyl-L-cysteine was able to revert the cytotoxic effects, ROS generation and loss of mitochondrial membrane potential of MCF-7 cells treated with ABZ. *In vivo* experiments showed that Ehrlich carcinoma growth was inhibited (32.0%) and survival time was elongated in animals treated with ABZ (20 mg/Kg). Oxidative stress biomarkers (thiobarbituric acid reactive substances - TBARS and protein carbonyl levels - PC) and antioxidant defenses as the enzymatic activity of catalase (CAT), superoxide desmutase (SOD) and glutathione reductase (GR) which were all increased, while reduced glutathione (GSH) was depleted in animals treated with ABZ, indicating an oxidative stress condition, possibly leading to DNA damage causing phosphorylation of histone H2AX, and triggering apoptosis signaling (confirmed by increasing Bax/Bcl-xL rate and pro-apoptotic proteins expression of p53 and Bax). Despite ABZ promoted DNA intercalation, this drug did not affect neither replication nor transcription. Transcriptome analysis of DDT cell line exposed to ABZ revealed a marked modification in the signature of tubulin genes and genes responsible for cell division. This is accordingly with the arrested in G2/M cell cycle stages of DDT cells line exposed to ABZ. This drug indicates be a potent inducer of loss of heterozygosity (LOH) *in vitro* and accelerator of chromosomal missegregation. In addition, ABZ showed to be a potent mitotic inhibitor with a strong tumorigenic potential. Therefore, ABZ treatment could be a particular risk for

patients without cancer. So, it is possible to infer that this drug induced oxidative stress promoting DNA fragmentation, followed by G2/M arrest, which triggers apoptosis, making this drug a promising molecule for repositioning as antitumor agent. Additionally, the results also indicated that ABZ drug-safety needs to be reassessed regarding its genotoxic potential.

Keywords: Albendazole. DNA damage. DNA intercalation. Loss of heterozygosity. Mitotic inhibitor. Oxidative stress.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Microevolução de uma célula tumoral.	32
Figura 2 - Caracterização da estrutura morfológica de células normais e células tumorais.	33
Figura 3 - Colonização metastática.	37
Figura 4 – Epidemiologia dos principais tipos de câncer no Brasil.	39
Figura 5 - Representação esquemática das principais vias de reparo do DNA.	44
Figura 6 - Representação esquemática do Ciclo Celular.	46
Figura 7 – Regulação da progressão do ciclo celular pela ação de ciclinas e cinases dependentes de ciclinas (CDKs).	49
Figura 8 - Inativação de Genes Supressores Tumorais.	51
Figura 9 - Representação esquemática das vias intrínseca e extrínseca da apoptose.	55
Figura 10 - Representação esquemática dos efeitos da modulação do estresse oxidativo em células tumorais e normais tratadas com quimioterápico.	60
Figura 11 - Estrutura química do ABZ e dos seus produtos de oxidação.	61
Figura 12 - Interação do ABZ com o DNA.	89
Figura 13 - Efeito do ABZ na intercalação com o DNA.	90
Figura 14 - Efeito do ABZ na clivagem oxidativa.	92
Figura 15 - Citotoxicidade do tratamento com ABZ e MTX através da determinação da viabilidade celular em células MCF-7.	93
Figura 16 - Detecção da citotoxicidade do ABZ através da integridade de membrana das linhagens celulares murinas e humanas.	95
Figura 17 - Inibição da proliferação celular após o tratamento com ABZ e MTX (5 e 10 μ M).	97
Figura 18 - Avaliação do conteúdo intracelular de EROs em células MCF-7 após tratamento com ABZ e MTX (5 e 25 μ M, por 1h).	98
Figura 19 - Citotoxicidade do ABZ (1-100 μ M), NAC (5 mM) e associação ABZ + NAC após 24h de tratamento em células MCF-7.	100
Figura 20 - Conteúdo intracelular de EROs na linhagem celular MCF-7 tratada com ABZ (5, 10 e 15 μ M), NAC (5 mM) e associação ABZ + NAC, por 4h.	101
Figura 21 - Potencial de membrana mitocondrial da linhagem celular MCF-7 tratada com ABZ (5, 10 e 15 μ M), NAC (5 mM) e associação ABZ + NAC, por 6h.	102

Figura 22 - Análise da inibição do crescimento tumoral frente aos tratamentos i.p. com ABZ (20 mg/kg) e MTX (2,5 mg/kg, controle positivo) no modelo do TAE em camundongos <i>balb-c</i>	103
Figura 23 - Aumento do tempo de sobrevida dos camundongos implantados com TAE e tratados com ABZ (20 mg/kg) ou MTX (2,5 mg/kg, controle positivo).	105
Figura 24 - Conteúdo de lipoperoxidação em células do TAE.	106
Figura 25 - Níveis de carbonilação de proteínas em células do TAE.....	108
Figura 26 - Conteúdo de tióis não proteicos (NP-SH) nas células do TAE.....	110
Figura 27 - Atividade da Glutathione Redutase (GR) em células do TAE.....	111
Figura 28 - Atividade da Superóxido Dismutase (SOD) em células do TAE.....	113
Figura 29 - Atividade da Catalase (CAT) nas células do TAE.	114
Figura 30 - Fragmentação do DNA de células do líquido ascítico de animais implantados com o TAE.	116
Figura 31 - Níveis da proteína γ H2AX.	117
Figura 32 - Indução da morte celular via apoptose e necrose pelos tratamentos com ABZ (20 mg/kg) ou MTX (2,5 mg/kg, controle positivo).	118
Figura 33 - Níveis das proteínas pro- e anti-apoptóticas p53, Bax e Bcl-xL por <i>western blot</i>	120
Figura 34 - Perfil do ciclo celular de células do TAE submetidas ao tratamento tratamentos com ABZ (20 mg/kg) ou MTX (2,5 mg/kg, controle positivo).	121
Figura 35 - O ABZ afeta a progressão do ciclo celular e causa aneuploidia cromossômica.	124
Figura 36 - Efeito do ABZ no transcriptoma das células de linfoma.	126
Figura 37 - Inibição do complexo do fuso mitótico após exposição ao tratamento com ABZ.....	130
Figura 38 - Efeito do ABZ no estímulo da perda de LOH.....	133

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Expressão e relevância clínica de genes associados à transição epitelial-mesenquimal (EMT) em tumores primários em humanos.	34
Quadro 2 - Reposicionamento farmacêutico: indicação original e antitumoral	41
Quadro 3 - Principais ciclinas e CDKs de vertebrados.	49
Quadro 4 - Genes supressores tumorais haplossuficientes e o respectivo câncer associado com mutações nesses genes.	52
Quadro 5 - Principais características morfológicas da morte celular por apoptose e pelas formas necróticas.	53
Quadro 6 - Local de desenvolvimento das metodologias usadas nesta tese.	69
Quadro 7 - Anticorpos primários e secundários usados no <i>western blot</i>	70
Quadro 8 - Anticorpos primários e secundários usados na análise da dinâmica dos microtúbulos.	71
Quadro 9 – Informações gerais das linhagens celulares	74
Quadro 10 – Avaliação de alguns parâmetros de sobrevivência de animais que foram tratados com ABZ (20 mg/kg) e MTX (2,5 mg/kg).	104
Quadro 11 – Lista de genes relacionados com a divisão celular que foram diferencialmente expressos após o tratamento com ABZ.	127

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abreviatura/Sigla	Significado
ABZ	Albendazol
AML1	Proteína 1 da leucemia mielóide aguda
AO	Laranja de acridina
APAF 1	Fator ativador de proteases pró-apoptóticas 1
APC/FAP	Polipose adenomatosa familiar
APC/C	Complexo promotor da anáfase ou cicloclismo
ARF	Fator de ribosilação do ADP
ASON	Albendazol sulfonado
ASOX	Albendazol sulfóxido
ATM	Ataxia telangiectasia mutada
ATP	Adenosina trifosfato
ATR	Síndrome de Seckel
Bad	Promotor de morte associado ao Bcl-2
Bak	Bcl-2 homólogo antagonista/assassino
Bax	Proteína X associada a Bcl-2
Bcl-2	Linfoma de células B 2
Bcl-10	Linfoma/leucemia de células B 10
Bcl-w	Bcl-2 <i>like</i> proteína 2
Bcl-x	Bcl-2 <i>like</i> proteína 1
Bcl-xL	Linfoma de células B extra grande
BER	Reparo por excisão de base
BH3	Domínio com homologia Bcl-2
BLM	Síndrome de Blooms
BRCA 1/BRCA 2	Câncer de mama 1/ 2
CAD	DNase ativada por caspase
CAT	Catalase
CBFA2	Fator de ligação central alfa 2
CDH1 (E-cad)	Caderina-1 (E-caderina)
CDKs	Cinase dependente de ciclina
CDKN1A	Inibidor de cinase dependente de ciclina 1 ^a
CO ₂	Dióxido de carbono
CPC	Complexo passageiro de cromossomo
CT-DNA	DNA tímico de vitelo
CYP1A	Citocromo P450 família 1 subfamília A
CYP3A	Citocromo P450 família 3 subfamília A
CYP450	Citocromo P450
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol

DCFH	2',7'- diclorofluorescina
DCFH-DA	2',7'- diclorofluorescina-diacetato
$\Delta\Psi_m$	Potencial de membrana mitocondrial
DDinT	Intolerante a dano ao DNA
DDR	Resposta a danos ao DNA
DDT	Tolerante a dano ao DNA
DMEM	Meio <i>Eagle</i> modificado por <i>Dulbecco</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAse	Endonucleases que clivam o DNA
DNPB	2,4-dinitrofenilhidrazina
DPC4/ SMAD4	Fator de transcrição nuclear
DPTA	Ácido dietilenotriaminopenta acético
DR	Receptores de morte
DTNB	Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico
EC ₅₀	Concentração efetiva de 50%
ECL	Quimioluminescência melhorada
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EMT	Transições epitelial-mesenquimais
E.P.M	Erro padrão da média
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
EtBr	Brometo de etídio
FA	Anemia Fanconi
FACS	Seleção de células ativadas por fluorescência
FADD	Domínio de morte associado a Fas
Fas/ CD95	Receptor de morte de superfície celular Fas
FASL	Ligante de Fas
Fase G1	Intervalo/gap 1
Fase G2	Intervalo/gap 2
Fase M	Mitose
Fase S	Síntese de DNA
FMO	Monooxigenases contendo flavina
FOXC2	Proteína C2 <i>forkhead</i> box
G-MEM BHK 21	Meio <i>Glasgow MEM</i> (G-MEM) (BHK-21)
GPx	Glutaciona peroxidase
GR	Glutaciona redutase
GSH	Glutaciona reduzida
GSSG	Glutaciona oxidada
H2AX; γ H2AX	Histona H2A variante; H2AX fosforilada
H ₂ O	Água

H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HBSS	Solução salina tamponada de Hank
HCl	Ácido clorídrico
HeLa	<i>Henrietta Lacks</i> ; linhagem celular de adenocarcinoma de cérvix
HR	Recombinação homóloga
HRP	Peroxidase de rábano
IgG	Imunoglobulina G
INCA	Instituto Nacional de Câncer
IVM	Ivermectina
KH ₂ PO ₄	Fosfato de potássio monobásico
Lig4	DNA ligase 4
Lkb1	Cinase hepática B1
LIF	Fator inibitório de leucemia
LOH	Perda de heterozigosidade
MCF-7	<i>Michigan Cancer Foundation-7</i> ; linhagem celular de adenocarcinoma de mama
MDA	Malondialdeído
mES	Células tronco embrionárias murinas
MET	Transições mesenquimais-epiteliais
MGMT	O ⁶ -metil-guanina DNA metil-transferase
MLH1	MutL homólogo 1
MLH1 ^{wt/-}	MLH1 com apenas 1 alelo funcional
MMR	Reparo de pareamentos errados
MNZ	Metronidazol
MPS1	Fuso monopolar 1
MSH2	MutS homólogo 2
MTT	3-(4,5-dimetil -2-tiazol)2,5-difenil-brometo de tetrazolium
MTX	Metotrexato
NA	Abertura numérica
NAC	N-acetil-L-cisteína
NaCl	Cloreto de sódio
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato na forma reduzida
NaOH	Hidróxido de sódio
NER	Reparo por excisão de nucleotídeo
NHEJ	Junção de extremidades não homólogas
Nf1/NF1	Neurofibromatose tipo 1
O ₂	Oxigênio molecular

•O ₂	Oxigênio singlete
•O ₂ ⁻	Ânion superóxido
•OH	Radical hidroxila
p21 ^{Cip1} /p21 ^{Waf1}	Inibidor de cinase dependente de ciclina 1
p53	Proteína supressor tumoral p53
PA	Grau de pureza analítico
PBS	Tampão fosfato salino
PC	Proteína carbonilada
PCNA; PCNA ^{K164R}	Antígeno nuclear de células proliferativas; PCNA com mutação pontual por substituição da lisina por arginina na posição 164
pH	Potencial hidrogeniônico
PI	Iodeto de propídio
PLK1	Cinase polo like-1
PIGF	Fator de crescimento placentário
PRKAR1A	Proteína cinase AMPc- dependente da subunidade regulatória alfa tipo1
PTCH	Proteína homóloga de arranjo 1
PTEN	Proteína homóloga de fosfatase e tensina
PZQ	Praziquantel
RB1	Retinoblastoma
RIP	Receptor da proteína de interação
RIP1	Receptor da proteína de interação -1
RNA	Ácido ribonucleico
RNAse	Endonucleases que clivam o RNA
RNA-Seq	Sequenciamento de RNA
RPE-1	<i>Retinal Pigment Epithelium 1</i> ; células epiteliais imortalizadas (não transformadas)
RPMI	Meio <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RUNX1	Fator de transcrição 1 relacionado com runt
SH	Sulfidril/ grupo tiol
SNAI1	Repressor transcricional 1 da família Snail
SNAI2	Repressor transcricional 2 da família Snail
SOD	Superóxido dismutase
SVCT	Transportadores de sódio e vitamina C
TAE	Tumor ascítico de Ehrlich
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TBid	Bid truncado
TCA	ácido tricloroacético
TG (6-TG)	Tioguanina (6-tioguanina)

TGF- β	Fator de crescimento transformador beta
TLS	Síntese de translesão
TMRE	Tetrametilrodamina etil éster
TNB	Ânion tiolato
TNF	Fator de necrose tumoral
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TNFR	Receptor do fator de necrose tumoral
TNFR1	Receptor-1 ativado pelo ligante TNF
TP53	Proteína tumoral P53 (síndrome de Li-Fraumeni)
TRADD	TNFR tipo 1 associado ao domínio de morte
TRAIL	Ligante indutor de apoptose relacionado com TNF
TRAIL-R1	Membro 10A da superfamília de receptor TNF
TRAIL-R2	Membro 10B da superfamília de receptor TNF
TSC2	Complexo de esclerose tuberosa 2
TWIST1	Proteína 1 relaciona a Twist
U-2 OS	Osteosarcoma humano
USOD	Unidades de SOD
VEGFA	Fator de crescimento vascular endotelial A
VEGFB	Fator de crescimento vascular endotelial B
VEGFC	Fator de crescimento vascular endotelial C
VEGFD	Fator de crescimento vascular endotelial D
ZEB1	Dedos de zinco E-box ligados ao <i>homeobox</i> 1
ZEB2	Dedos de zinco E-box ligados ao <i>homeobox</i> 2

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	31
1.1	CÂNCER.....	31
1.1.1	Diferença entre as células normais e tumorais	32
1.1.2	Metástase	36
1.1.3	Epidemiologia do câncer no Brasil	38
1.1.4	Terapia do Câncer	40
1.2	SISTEMAS DE REPARO DO DANO AO DNA	43
1.3	CICLO CELULAR.....	45
1.3.1	Definição e fases do ciclo celular	45
1.3.2	Pontos de checagem e reguladores do ciclo celular	47
1.4	PERDA DE HETEROZIGOSIDADE.....	50
1.5	MORTE CELULAR.....	53
1.6	ESTRESSE OXIDATIVO	57
1.7	ALBENDAZOL	61
2	JUSTIFICATIVA.....	65
3	OBJETIVOS.....	67
3.1	OBJETIVO GERAL.....	67
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	67
4	METODOLOGIAS.....	69
4.2	PREPARO DAS SOLUÇÕES DE ABZ E CT-DNA.....	71
4.2.1	ABZ.....	71
4.2.2	CT-DNA	72
4.3	ANÁLISE DA INTERAÇÃO DO ABZ COM O CT-DNA	72
4.4	AVALIAÇÃO DO TIPO DE INTERAÇÃO COM O DNA POR FLUORESCÊNCIA	72
4.5	ANÁLISE DO DANO OXIDATIVO AO CT-DNA	73
4.6	CULTIVO CELULAR.....	73
4.7	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA E DO ESTRESSE REPLICATIVO.....	75

4.7.1 Avaliação da integridade mitocondrial	75
4.7.2 Avaliação da integridade de membrana.....	75
4.7.3 Avaliação do estresse replicativo	76
4.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA E CITOTÓXICA.....	77
4.9 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO INTRACELULAR DE EROs.....	77
4.10 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL.....	78
4.11 ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTITUMORAL <i>in vivo</i>.....	78
4.11.1 Animais	78
4.11.2 Inibição do crescimento tumoral do Tumor Ascítico de Ehrlich.....	79
4.11.3 Sobrevida dos animais inoculados com TAE.....	79
4.12 AVALIAÇÃO DOS INDICADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO E DEFESAS ANTIOXIDANTES EM CÉLULAS DO TAE.....	80
4.12.1 Medida da lipoperoxidação pelo TBARS.....	81
4.12.2 Determinação do conteúdo de Proteína Carbonilada	81
4.12.3 Determinação do conteúdo de tióis não-proteicos	82
4.12.4 Avaliação da atividade da Glutathiona Redutase.....	82
4.12.5 Avaliação da atividade da Superóxido Dismutase.....	82
4.12.6 Avaliação da atividade da Catalase	83
4.13 AVALIAÇÃO DA FRAGMENTAÇÃO DO DNA DE CÉLULAS DO TAE.....	83
4.14 ANÁLISE DO TIPO DE MORTE DAS CÉLULAS DO TAE	84
4.15 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS γ-H2AX, P53, BAX E BCL-xL.....	84
4.16 ANÁLISE DO CICLO CELULAR	85
4.16.1 Avaliação do ciclo celular das células do TAE.....	85
4.16.2 Avaliação do ciclo celular das células do linfoma DDT	86

4.17 INVESTIGAÇÃO DO RNA DE CÉLULAS DO LINFOMA DDT POR SEQUENCIAMENTO	86
4.18 ANÁLISE DA DINÂMICA DOS MICROTÚBULOS	87
4.19 INVESTIGAÇÃO DA PERDA DE HETEROZIGOSIDADE	87
4.20 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	88
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	89
5.1 Interação do ABZ com o CT-DNA	89
5.2 Clivagem oxidativa do CT-DNA.....	91
5.3 Citotoxicidade do ABZ	93
5.4 Inibição da proliferação celular	96
5.5 Geração intracelular de EROs	98
5.6 Efeito da NAC na citotoxicidade do ABZ.....	99
5.7 Efeito da NAC na indução de EROs em células tratadas com ABZ.....	101
5.9 Inibição do crescimento tumoral em animais implantados com TAE tratados com ABZ e MTX.....	103
5.10 Efeito do ABZ na sobrevida de animais implantados com TAE.....	104
5.11 Indução <i>in vivo</i> de estresse oxidativo pelo ABZ	106
5.11.1 MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO	106
5.12 Indução do dano ao DNA pelo ABZ	115
5.13 Indução da morte celular via apoptose pelo ABZ	118
5.14 Efeito do ABZ sobre o ciclo celular	121
5.15 Efeito do tratamento com ABZ no transcriptoma de células de linfoma DDT	125
5.16 Análise do tratamento com ABZ na dinâmica dos microtúbulos de células de mamíferos	130
5.17 Análise do tratamento com ABZ na perda de LOH	133
6 CONCLUSÃO	135
REFERÊNCIAS	138
APÊNDICES.....	171

APÊNDICE A – Nomes comerciais do fármaco ABZ e laboratórios responsáveis pela sua fabricação.....	171
APÊNDICE B – Lista de genes diferencialmente expressos após o tratamento com ABZ e comparados com o grupo controle.....	191
APÊNDICE C – Lista de genes diferencialmente expressos após o tratamento com EtBr e comparados com o grupo controle.	197
ANEXOS.....	201
ANEXO A – Artigo publicado como primeiro autor	201
ANEXO B – Artigo submetido como primeiro autor	203

1 INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER

O câncer é uma doença muito antiga e um dos primeiros relatos descrevendo esta patologia foi datado aproximadamente 3000 A.C., com a descoberta de um papiro escrito por Edwin Smith (HAJDU, 2011). A palavra câncer é originada do grego *karkinos*, que significa caranguejo. Foi definida apenas quando Hipócrates (460-370 A.C) atribuiu essa nomenclatura devido ao crescimento tumoral ser semelhante ao caranguejo em movimento (HAJDU, 2011; INCA, 2011).

O conceito de câncer pode ser entendido como um conjunto de várias doenças caracterizado pelo acúmulo de mutações, que promovem alterações celulares. Como consequência dessas modificações, ocorre o envio e recebimento de sinais inter e intracelulares de maneira aberrante, resultando numa proliferação celular descontrolada e ausência da indução da morte celular (MILELLA; CIUFFREDA; BRIA, 2010).

A proliferação celular descontrolada ocorre pela transformação dos proto-oncogenes em oncogenes, pela inativação dos supressores tumorais e por mutações nos genes de reparo ao DNA. Os proto-oncogenes são genes que controlam o crescimento celular, a proliferação e a diferenciação de células normais e uma mutação pode convertê-los em um oncogene, que está associado com o processo de carcinogênese por promover um crescimento celular aberrante (LAHTZ; PFEIFER, 2011). Dentre os proto-oncogenes, o *c-MYC* e *RAS* são frequentemente encontradas em diversos tipos de tumores (MILLER et al., 2012; YOUNG; LOU; McCORMICK, 2013). Além desses oncogênes, todos os membros da família anti-apoptótica *BCL-2* (como o *BCL-2*, *BCL-XL* e *BCL-W*) apresentam potencial oncogênico (CORY; HUANG; ADAMS, 2003).

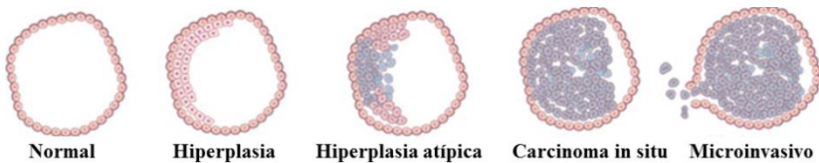
Diferentemente dos proto-oncogenes, os genes supressores tumorais, como a *TP53* e retinoblastoma (*RBI*), controlam a divisão celular e estabilidade genética, ou seja, têm como função o controle do crescimento celular e dos sistemas de reparo de DNA (LAHTZ; PFEIFER, 2011). Além desses genes, o gene *BAX* está associado com a promoção da apoptose (RAMPINO et al., 1997).

No entanto, os genes que codificam proteínas de reparo ao DNA evitam o acúmulo de danos nesse ácido nucleico, estando, dessa forma, associados com a prevenção do câncer e deficiências genéticas. O silenciamento desses genes pode promover a tumorigênese, devido à

inativação dos mecanismos envolvidos com o reparo do DNA (LAHTZ; PFEIFER, 2011).

A figura 1 esquematiza o processo de microevolução, no qual uma célula normal, após alterações celulares, modifica-se para uma célula com hiperplasia, hiperplasia atípica e, posteriormente, a ocorrência de mais mutações promovem a formação de um carcinoma, que pode ser ou não invasivo.

Figura 1 - Microevolução de uma célula tumoral.



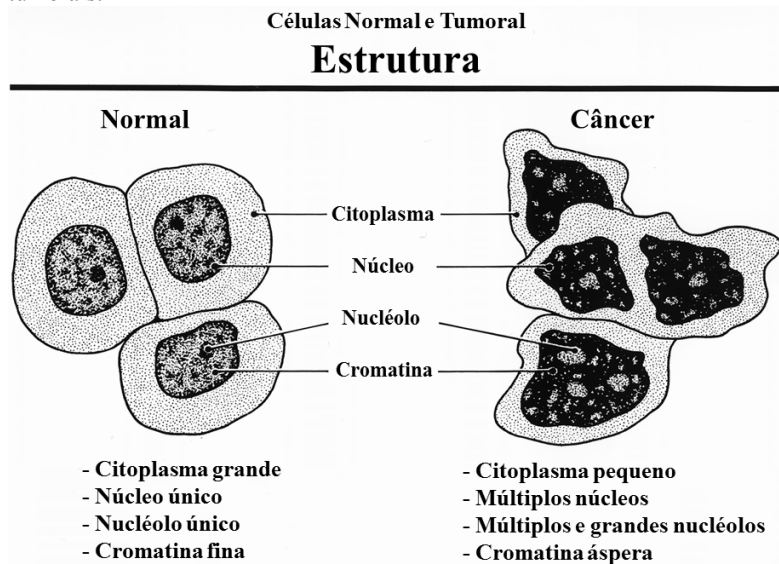
Mutações em série numa célula aumentam a taxa de proliferação em comparação com as células vizinhas adjacentes. O grupo de células com crescimento alterado se divide e mutações adicionais transformam as células com hiperplasia atípicas em células tumorais (carcinoma). A invasão das células tumorais para outros tecidos e órgãos (metástase) ocorre quando a adesão das células tumorais é perdida e essas células conseguem facilmente colonizar novos locais. **Fonte:** Extraído de Nature Education (2010).

1.1.1 Diferença entre as células normais e tumorais

As células normais e tumorais se diferenciam em vários aspectos, incluindo os morfológicos e funcionais. Dentre as diferenças estruturais, as principais alterações morfológicas são observadas no citoplasma, núcleo, nucléolo e cromatina, que mudam de uma célula normal para a tumoral.

A figura 2 mostra a estrutura de uma célula normal, que apresenta citoplasma grande, núcleo único, nucléolo único e padrão fino de textura da cromatina comparada a uma célula tumoral, que apresenta citoplasma pequeno, múltiplos núcleos, múltiplos e grandes nucléolos, além de um padrão áspero de textura da cromatina.

Figura 2 - Caracterização da estrutura morfológica de células normais e células tumorais.



Apresentação da estrutura do citoplasma, núcleo, nucléolo e cromatina de células normais e tumorais. **Fonte:** Extraído de Pat Kenny (Ilustrador) do National Cancer Institute (2001).

As transições entre o estado epitelial e mesenquimal, definidas como transições epitelial-mesenquimais (EMT) e mesenquimais-epiteliais (MET), têm papel crucial no desenvolvimento embrionário. Atualmente, as EMT e MET estão sendo relacionadas com patologias humanas, incluindo o câncer. Isso ocorre pelo papel fundamental das EMT e MET na regulação da plasticidade celular em tecidos normais e em tumores (POLYAK; WEINBERG, 2009).

Esses processos de EMT e MET divergem entre células normais e tumorais, onde uma diferença essencial é o envolvimento de células geneticamente anormais no tumor, que perderam sua habilidade responsiva aos sinais regulatórios de crescimento normal e possuem habilidades de expansão. Tais evoluções derivam da instabilidade genética e epigenética que são inerentes à maioria dos tipos celulares neoplásicos. E isso pode favorecer o crescimento de múltiplas subpopulações distintas dentro de um tumor, causando uma fonte de heterogeneidade fenotípica. Além disso, o microambiente de células estromais tumorais sinaliza mudanças biológicas celulares associadas com a programação das EMT e MET (POLYAK; WEINBERG, 2009).

Na EMT as células epiteliais modificam suas características diferenciadas, como adesão célula-célula, polaridade planar e apical-basal e falta de mobilidade. Ao mesmo tempo, adquirem características mesenquimais como motilidade, aumento do potencial de invasão e acentuada resistência a apoptose (POLYAK; WEINBERG, 2009).

O acúmulo de observações de tumores humanos e modelos experimentais em animais permite a obtenção de evidências convincentes de que esse processo fisiológico apresenta relevância, tanto para células normais quanto para o processo de carcinogênese. Tal efeito no processo tumorigênico é observado tanto em EMT quanto em MET. Entretanto, foi descoberto que EMT contribui para invasão, disseminação metastática e resistência terapêutica, enquanto que MET (a reversão de EMT) parece ocorrer após a disseminação e com subsequente formação de metástase distante (POLYAK; WEINBERG, 2009).

O quadro 1 mostra o envolvimento da EMT no processo de carcinogênese, relacionando o gene envolvido com o tipo de câncer e sua respectiva característica clínico-patológica.

Quadro 1 - Expressão e relevância clínica de genes associados à transição epiteial-mesenquimal (EMT) em tumores primários em humanos.

Gene	Tipo de câncer	Características clínico-patológicas associadas
Famílias <i>miR-200</i> e <i>miR-205</i>	Câncer de ovário papilares serosos	Não determinadas
Famílias <i>miR-200</i> e <i>miR-205</i>	Câncer de mama	Não determinadas
Assinatura do gene <i>miR-335</i>	Câncer de mama	Redução de sobreviventes sem desenvolver metástase
<i>miR-10b</i>	Câncer de mama	Presença de metástase
Marcadores de EMT	Câncer de mama	Subtipo basal- <i>like</i>
<i>FOXC2</i>	Câncer de mama	Subtipo basal- <i>like</i>
<i>SNAIL</i>	Câncer de mama	Prognóstico pobre
<i>SNAI2</i>	Câncer de mama	Prognóstico pobre
<i>TWIST1</i>	Câncer de mama	Prognóstico pobre
<i>ZEB1</i>	Câncer de útero	Agressividade tumoral
<i>ZEB2</i>	Câncer de mama e ovário	Prognóstico pobre

Fonte: Extraído de Polyak e Weinberg (2009).

Na busca de compreender a complexa diferença entre células humanas normais e tumorais, faz-se uso de estudos de identificação de padrões de expressão gênica. Tais padrões podem ser uma ferramenta importante e útil para caracterizar o câncer, identificar novos subtipos, identificar redes transcricionais desreguladas em diferentes tipos de câncer, melhorar a classificação estratificada do paciente e prever a sobrevida, bem como pode ser útil no diagnóstico ou na identificação dos marcadores de prognósticos (ZHANG et al., 1997; RAPIN et al., 2014).

A título de exemplo, temos o estudo de Zhang et al. (1997) que analisou os transcritos de vários genes e identificou padrões de expressão gênica de tumores gastrointestinais. Apesar da grande similaridade entre os perfis de expressão gênica de células normais e tumorais, alguns transcritos foram expressos de forma diferente, mostrando que existem diferenças sutis entre o perfil genético de células normais e tumorais (ZHANG et al., 1997).

Outro aspecto bastante importante é a multicelularidade dos animais, que por apresentarem mais de uma célula em sua composição estrutural precisam de comunicação entre as mesmas para a manutenção da integridade global do organismo. Isso só acontece devido à existência de elaborados mecanismos de controle, entretanto, o seu funcionamento inadequado pode levar à tumorigênese. Assim, a homeostasia é necessária para manter a integridade do organismo e de processos celulares como sobrevivência, proliferação e morte, permitindo que as células normais (células não transformadas) parem de se dividir ao entrarem em contato com as células vizinhas, o que em geral, não ocorre nas células transformadas (cancerosas), que perdem essa sensibilidade (BAYNES; DOMINICZAK, 2010).

Em organismos multicelulares, esse conjunto de mutações pode causar o bloqueio de várias vias de sinalização celular, e a sequência de eventos que acumula mais mutações está relacionada com a promoção do câncer. Nas células tumorais é observada a perda da regulação da cooperação multicelular (multicelularidade), que apresenta cinco características principais: (i) inibição da proliferação celular, (ii) regulação da morte celular, (iii) divisão de tarefas, (iv) transporte de nutrientes, e (v) criação e manutenção do ambiente extracelular (AKTIPIS et al., 2015).

O conjunto de mutações observado nas células tumorais, além de ser responsável pela divisão celular descontrolada, está relacionado com a malignidade tumoral, ou seja, com a habilidade de invasão tumoral. Tal processo é conhecido como metástase, onde as células tumorais se

disseminam em outros tecidos que não estão relacionados com aqueles em que foram originadas (CHIANG; MASSAGUÉ, 2008).

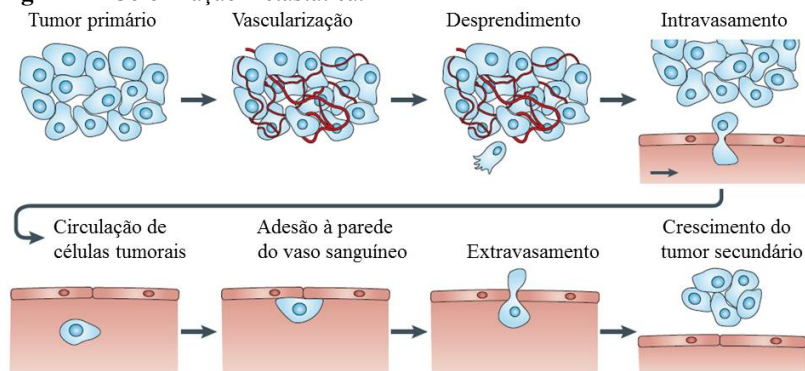
1.1.2 Metástase

A metástase é um processo bastante complexo que ocorre em várias etapas e é a principal causa de morte em pacientes com câncer, sendo responsável por mais de 90% da mortalidade desses indivíduos. (SEYFRIED; HUYSENTRUYT, 2013). Pode ocorrer via vasos sanguíneos (propagação hematogênica), vasos linfáticos (propagação linfогênica), ou diretamente dentro dos tecidos e cavidades corporais (STACKER; BALDWIN; ACHEN, 2002; WIRTZ; KONSTANTOPOULOS; SEARSON, 2011).

As interações físicas que ocorrem entre a célula e sua matriz extracelular são bastante importantes, uma vez que permitem as células migrarem do tumor para as proximidades do vaso sanguíneo. Durante o intravasamento e extravasamento, as células devem sofrer grandes deformações elásticas para penetrarem nas junções endoteliais célula-célula. No sistema vascular a ação combinada entre velocidade celular e adesão influencia a ligação das células tumorais à parede dos vasos sanguíneos, e conseqüentemente, o local onde o tumor secundário poderá ser formado e crescer (WIRTZ; KONSTANTOPOULOS; SEARSON, 2011).

O estudo dos diferentes padrões do processo metastático, os quais podem ser distinguidos nos diferentes tipos tumorais, é muito importante. Um exemplo relevante foi a descoberta de um padrão comum de desenvolvimento de metástases, primeiro nas regiões dos nódulos linfáticos em carcinomas, o que possibilitou o uso da técnica cirúrgica linfadenectomia sentinela (STACKER; BALDWIN; ACHEN, 2002).

A metástase (Figura 3) é um processo que compreende a migração das células tumorais de um tecido para outro que não o da sua origem. Esse fluxo ocorre através dos diferentes microambientes, incluindo o estroma, o endotélio do vaso sanguíneo, o sistema vascular e o tecido em um local secundário. Nesse processo, apesar das células tumorais serem invasivas e apresentarem motilidade para entrar no sistema circulatório, a maioria é destruída, embora uma pequena porção consiga se infiltrar em órgãos distantes, evadir o sistema imune, sobreviver e disseminar sua descendência para eventual reincidência, aumentando a falha no tratamento dos pacientes com tumor (MASSAGUÉ; OBENAUF, 2016).

Figura 3 - Colonização metastática.

A invasão local ocorre através do desprendimento de células do tumor primário vascularizado, que penetram no tecido circunjacente, entram nas proximidades dos vasos sanguíneos (intravasamento) e circulam no sistema vascular. Eventualmente, algumas dessas células aderem às paredes do vaso sanguíneo e são capazes de extravasarem e migrarem para dentro do tecido local, formando um tumor secundário. **Fonte:** Extraído de Wirtz; Konstantopoulos; Searson (2011).

Outros processos importantes na metástase são a angiogênese e a linfangiogênese, que permitem a criação de um novo vaso. Em células tumorais malignas esses processos podem servir para o escape de células do tumor primário. No entanto, os vasos já existentes também podem proporcionar um mecanismo de escape das células tumorais (STACKER; BALDWIN; ACHEN, 2002). Além dessa função, o crescimento angiogênico de vasos sanguíneos e linfáticos está associado à coordenação de vários processos biológicos, como proliferação celular, migração guiada, diferenciação e comunicação célula-célula (ADAMS; ALITALO, 2007).

A angiogênese é importante no crescimento de tumores sólidos e metástase hematogena, pois em células tumorais a estimulação da angiogênese permite um melhor acesso a nutrientes e oxigênio. Na estimulação do crescimento angiogênico a biomolécula mais importante que controla a morfogênese vascular sanguínea é o fator vascular de crescimento endotelial A (VEGFA). Além disso, outros membros da mesma família são potentes reguladores angiogênicos, como o fator de crescimento placentário (PlGF), VEGFB, VEGFC e VEGFD (STACKER; BALDWIN; ACHEN, 2002; ADAMS; ALITALO, 2007).

Em contrapartida, pouco se sabe sobre o papel da linfangiogênese tumoral na metástase e como esse processo é

importante na dispersão via linfática. Entretanto, alguns estudos experimentais e clínicos relacionados com fatores linfoangiogênicos e marcadores linfáticos indicaram influência dos fatores linfoangiogênicos na dispersão dos tumores (STACKER; BALDWIN; ACHEN, 2002).

1.1.3 Epidemiologia do câncer no Brasil

Estudos sobre o câncer, como o documento *World Cancer Report* 2014 da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (International Agency for Research on Cancer - IARC), da Organização Mundial da Saúde (OMS), revelam um considerável crescimento na incidência, prevalência e morte devido a esta patologia. Esta doença é caracterizada como um enorme problema de saúde pública mundial e para 2025 são estimados mais de 20 milhões de novos casos. Esse problema é ainda mais grave nos países em desenvolvimento, uma vez que é esperada a ocorrência de 80% dos casos estimados para 2025 (INCA, 2015).


De acordo com o INCA (2015), no Brasil os Registros de Câncer de Base Populacional (RCBP) fornecem informações sobre o impacto das neoplasias nas comunidades, configurando-se uma condição necessária para o planejamento e a avaliação das ações de prevenção e controle dessa doença. Em conjunto, os RCBP, os Registros Hospitalares de Câncer (RHC) e o Sistema de Informação sobre Mortalidade (SIM) do Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde (DataSUS), formam o eixo estruturante para a vigilância do câncer e para o desenvolvimento de pesquisas em áreas afins.


O uso desse sistema permitiu a estimativa de câncer para o Brasil, levando em consideração o biênio 2016-2017, que aponta a ocorrência de cerca de 600 mil casos novos de câncer, distribuídos em aproximadamente 180 mil casos novos de câncer de pele não melanoma e 420 mil casos novos de outros tipos de câncer (INCA, 2015).

O perfil epidemiológico observado para o Brasil estima que, sem contar os casos de câncer de pele não melanoma, os tipos mais frequentes em homens serão próstata (28,6%), pulmão (8,1%), intestino (7,8%), estômago (6,0%) e cavidade oral (5,2%), enquanto nas mulheres, os cânceres de mama (28,1%), intestino (8,6%), colo do útero (7,9%), pulmão (5,3%) e estômago (3,7%) estarão entre os principais (INCA, 2015).

A figura 4 apresenta os dez tipos de câncer mais incidentes estimados por sexo, para 2016, excluindo o câncer de pele não melanoma.

Figura 4 – Epidemiologia dos principais tipos de câncer no Brasil.

Localização Primária		Casos	%	
	Próstata	61.200	28,6%	Homens 
	Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.330	8,1%	
	Cólon e Reto	16.660	7,8%	
	Estômago	12.920	6,0%	
	Cavidade Oral	11.140	5,2%	
	Esôfago	7.950	3,7%	
	Bexiga	7.200	3,4%	
	Laringe	6.360	3,0%	
	Leucemias	5.540	2,6%	
	Sistema Nervoso Central	5.440	2,5%	

Localização Primária		Casos	%	
Mulheres	Mama feminina	57.960	28,1%	
	Cólon e Reto	17.620	8,6%	
	Colo do útero	16.340	7,9%	
	Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.890	5,3%	
	Estômago	7.600	3,7%	
	Corpo do útero	6.950	3,4%	
	Ovário	6.150	3,0%	
	Glândula Tireoide	5.870	2,9%	
	Linfoma não Hodgkin	5.030	2,4%	
	Sistema Nervoso Central	4.830	2,3%	

*Números arredondados para múltiplos de 10.

Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes (exceto câncer de pele não melanoma). Estimativa separada por sexo para o ano de 2016. **Fonte:** Extraído do INCA (2015).

Esse estudo epidemiológico é muito importante, pois informa os fatores que afetam a incidência do câncer, a estimativa, a ocorrência da doença na população brasileira e nas suas regiões, além de medidas usadas para a prevenção e controle dessa doença (INCA, 2014). Nesse sentido, baseado nas estimativas da incidência de câncer, é consenso a necessidade de estudos que busquem a prevenção e o tratamento tumoral.

1.1.4 Terapia do Câncer

Os tratamentos para câncer englobam a quimioterapia, a radioterapia, a cirurgia, a terapia hormonal, e muitas vezes a combinação de dois ou mais tratamentos. Além disso, a imunoterapia vem ganhando bastante destaque, assim como a medicina alternativa e complementar (DENG; CASSILETH, 2013; KHALIL et al., 2016).

Na tentativa de erradicar o câncer, inúmeros estudos foram realizados e permitiram aos pesquisadores um grande entendimento sobre a evolução tumoral, englobando a compreensão sobre o crescimento tumoral, o surgimento das mutações e como emergem populações de células geneticamente distintas. Também se sabe que as células resistentes ao tratamento sobrevivem e se expandem, não importando qual o tipo de medicamento seja aplicado aparentemente, o tumor se adapta. Dessa forma, fica difícil para os pesquisadores reverterem esse processo, devido ao fato do câncer evoluir lentamente com o passar dos anos (WILLYARD, 2016).

Antes do avanço tecnológico na pesquisa clínica, dava-se informações aos pacientes de que os diferentes tipos de câncer estavam evoluindo de forma “darwiniana”, mesmo sem quantidades de evidências para provar essa hipótese. Com os avanços tecnológicos e produção de informações, como a tecnologia de sequenciamento e desenvolvimento de amplas coleções de amostras e dados clínicos, várias informações foram reunidas em um quadro mais preciso de como o câncer evolui, revelando as raízes da resistência tumoral, e em alguns casos, descobrindo como pode ser superada (WILLYARD, 2016).

Na tentativa de entender essa contínua adaptação das células tumorais, pesquisadores desenvolveram um modelo experimental muito útil. Neste modelo, as células de câncer colorretal respondem a terapias direcionadas que são dadas em combinação, revelando formas de prevenir a resistência das células tumorais. Assim, dados experimentais muito interessantes foram gerados, mostrando a possibilidade de acompanhar e tratar a evolução tumoral a partir desse modelo (MISALE et al. 2015; WILLYARD, 2016).

Atualmente, as pesquisas estão mostrando que a reposição de fármacos (aplicação de fármacos existentes para uma nova indicação terapêutica) é uma importante estratégia comparativamente ao desenvolvimento de novos fármacos (NOSENGO, 2016). A criação de um novo fármaco é um processo bem complexo e marcado pelo aumento progressivo das taxas de falhas, altos custos, baixa biodisponibilidade, baixa segurança, eficácia limitada e longo processo

de design e de testes (GUPTA et al., 2013). Nesse sentido, diversos fármacos existentes estão sendo redirecionados para o uso antitumoral, levando em consideração o fato de proporcionar uma oportunidade rápida para avançar em estratégias terapêuticas em ensaios clínicos. Isso possivelmente acontece devido às diferentes doenças compartilharem vias moleculares e alvos celulares comuns (GUPTA et al., 2013).

O reposicionamento de fármacos, originalmente identificados como antitussígeno, sedativo, analgésico, antipirético, anti-inflamatório, anestésico, anti-diabético, cardioprotetor, antiparasitários, entre outros, para o uso na terapia de neoplasias já vem sendo investigado.

Estudos pré-clínicos realizados com o mebendazol, fármaco usado no tratamento de helmintíases, indicaram evidências de efeito deste medicamento em diferentes tipos de câncer, incluindo o adrenocortical, de mama, de cólon, glioma, leucemia, de pulmão, melanoma, osteossarcoma e de ovário. Além disso, foi investigado possíveis combinações desse medicamento com outros fármacos (PANTZIARKA et al., 2014). A cloroquina e hidroxicloroquina, fármacos indicados como antimalárico e anti-reumático, também apresentam eficácia terapêutica para diversos tipos de câncer em estudos clínicos de fase I e II em combinação com outros fármacos (MANIC et al., 2014).

Nesse aspecto, o quadro 2 mostra a indicação original de alguns fármacos que estão sendo reposicionados para o tratamento antitumoral.

Quadro 2 - Reposicionamento farmacêutico: indicação original e antitumoral
(continua)

Fármaco	Indicação Original	Indicação antitumoral
Talidomida ^{a,b}	Antiemético na gravidez ¹	Mieloma múltiplo ¹
Aspirina ^c	Analgésico, antipirético ¹	Câncer colorretal ¹
Ácido valpróico ^a	Antiepiléptico ¹	Leucemia, tumores sólidos ¹
Celecoxib ^{a,b}	Osteoartrite, artrite reumatóide ¹	Câncer colorretal, câncer de pulmão ¹
Estatinas ^c	Dislipidemia ²	Câncer de próstata, leucemia ¹
Metformina ^a	Diabetes mellitus ¹	Mama, adenocarcinoma, próstata, colorretal ¹
Rapamicina ^{b,d}	Imunossupressor ¹	Câncer colorretal, linfoma, leucemia ¹

Quadro 2 - Reposicionamento farmacêutico: indicação original e antitumoral.
(conclusão)

Fármaco	Indicação Original	Indicação antitumoral
Metotrexato ^b	Leucemia aguda ¹	Osteosarcoma, câncer de mama, linfoma de Hodgkin ¹
Acido zoledrônico ^c	Anti-reabsorção óssea ¹	Mieloma múltiplo, câncer de próstata, câncer de mama ¹
Vesnarinona ^c	Cardioprotetor ¹	Câncer oral, leucemia, linfoma ¹
Tiocolchicósido ^c	Relaxante muscular ¹	Leucemia, mieloma múltiplo ¹
Nitroxolina ^c	Antibiótico ¹	Câncer de bexiga, câncer de mama, câncer oral ^{1,3}
Noscapina ^c	Antitussígenos, antimaláricos, analgésico ¹	Vários tipos de câncer ¹
Mebendazol ^{a,c}	Anti-helmíntico ⁴	Vários tipos de câncer ⁴
Cloroquina ^a	Doenças reumáticas e antimalárico ⁵	Vários tipos de câncer ⁶
Hidroxicloroquina ^a	Doenças reumáticas e antimalárico ⁵	Vários tipos de câncer ⁶

Fonte: Do autor com base em ¹Gupta et al. (2013), ²McFarland et al. (2014), ³Uchida et al. (2009), ⁴Pantziarka et al. (2014), ⁵Ben-Ziv et al. (2012), ⁶Manic et al. (2014). Nota: ^a denota ensaios clínicos; ^b fármaco aprovado pela FDA; ^c ensaios pré-clínicos; ^d fármaco aprovado pela Agência de Medicina Européia; ^e fármaco aprovado sem indicação do órgão responsável.

Avanços na genômica, proteômica e tecnologia de informação, assim como o desenvolvimento de ferramentas analíticas permitiram a descoberta de origens moleculares comuns de diversas patologias. Conseqüentemente, isso vem possibilitando pesquisas simultâneas para um amplo número de fármacos existentes contra um determinado alvo molecular da doença.

Tendo em vista o que foi relatado, é importante estudar detalhadamente a patologia do câncer para descobrir novos tratamentos antitumorais e formas de prevenir a carcinogênese. Para tanto, estudos de importantes vias, como o funcionamento dos sistemas de reparo do dano ao DNA, são fundamentais para o entendimento do processo de transformação de uma célula normal em uma célula tumoral e

descoberta de novos alvos moleculares que auxiliem na terapia do câncer.

1.2 SISTEMAS DE REPARO DO DANO AO DNA

O sistema de reparo do dano ao DNA é muito importante para assegurar a integridade genômica, pois o genoma humano sofre espontaneamente mutações no DNA a uma taxa de 10^{-6} mutações por gene por divisão celular, podendo ser maior quando ocorre exposição a agentes mutagênicos. Uma vez que, no corpo humano ocorre aproximadamente 10^{16} divisões celulares ao longo do tempo médio de vida, a probabilidade que cada gene humano sofra mutação seria aproximadamente 10^{10} ocasiões, o que revela claramente que uma única mutação não é suficiente para transformar uma célula normal em tumoral (BAYNES; DOMINICZAK, 2010).

Naturalmente, o genoma humano é exposto a danos ao DNA, e uma única célula pode sofrer mais de um milhão de insultos durante um período de um dia (LODISH et al, 2004). Neste particular, os danos de natureza endógena causados por ataque oxidativos são responsáveis por uma frequência aproximada de 10.000 lesões por células por dia (BERNSTEIN et al., 2013).

Além disso, outros tipos de danos endógenos podem ser observados, tais como: dano oxidativo causado especificamente por produtos originados de 8-hidroxi guanina, 8-hidroxideoxiguanosina, 5-(hidroximetil) uracil; depuração e depirimidização; ruptura de uma fita ou da dupla fita de DNA; desaminação da citosina; e 6-O-metilguanina (BERNSTEIN et al., 2013). Ainda, a reação de Fenton pode conduzir danos oxidativos no DNA, uma vez que é responsável pela geração de um radical reativo, formado após a redução do peróxido de hidrogênio pelo ferro ferroso (IMLAY; CHIN; LINN, 1988).

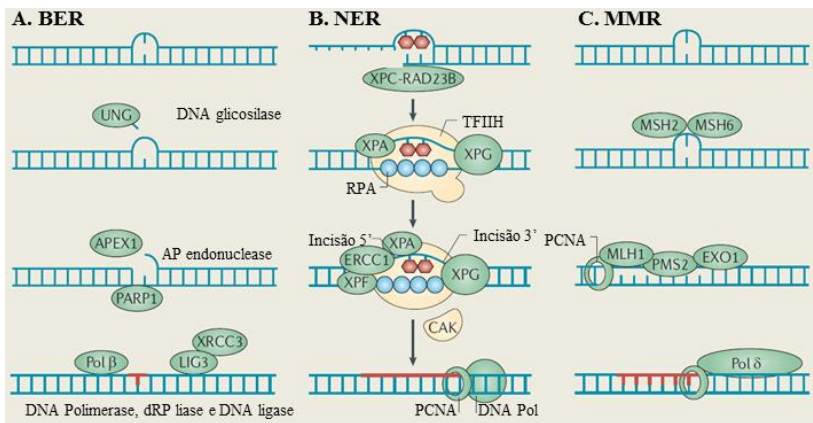
Entretanto, o corpo humano apresenta sistemas de reparo do DNA, que envolve mecanismos inatos para assegurar o reparo do genoma que sofre modificações espontaneamente. Esses sistemas atuam tanto em células proliferativas quanto replicativas. São altamente eficientes e ativados rapidamente, garantindo a integridade genômica celular (NICKOLOFF, 2015).

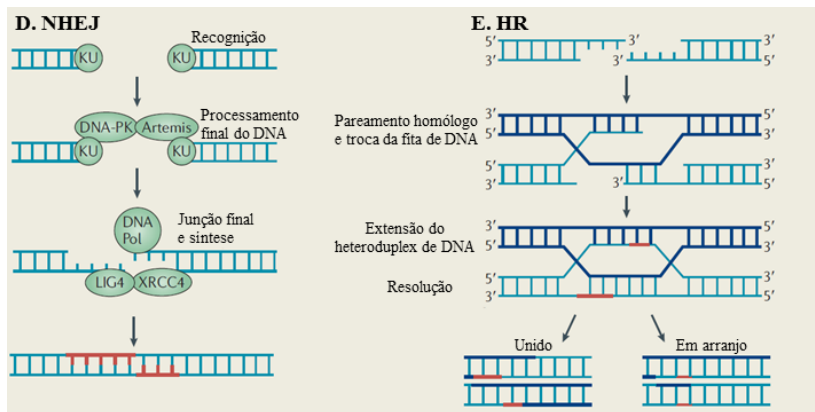
Todavia, a ineficiência ou falhas nesses sistemas de reparo pode estar associada ao processo conhecido como mutagênese, que se encontra intimamente relacionado com o desenvolvimento do câncer (NICKOLOFF, 2015). Vale salientar que a transformação de uma célula normal em tumoral ocorre em várias etapas e envolve o acúmulo de

várias mutações ao longo do tempo como resultado de eventos independentes, caracterizando a progressão do câncer como um processo microevolucionário, pois a divergência evolucionária entre células normais e tumorais é extremamente pequena. Ademais, defeitos no sistema de reparo do DNA, em células tumorais, permite o acúmulo de alterações genômicas que contribuem para um fenótipo mais agressivo (DIETLEIN; THELEN; REINHARDT, 2014; WU et al., 2016).

Os mecanismos celulares desenvolvidos para lidar com o ataque constante ao DNA, apesar de eficientes, não são processos perfeitos de reparação, existindo diferentes mecanismos de reparo, devido ao fato de haver vários tipos de lesão ao DNA (KASTAN; BARTEK, 2004). Assim, as células de mamíferos, em resposta aos danos, possuem vários tipos de vias de reparo do DNA, tais como: reparo de pareamentos errados (MMR), reparo por excisão de base (BER), reparo por excisão de nucleotídeo (NER), recombinação homóloga (HR), junção de extremidades não-homólogas (NHEJ), reparo por síntese de translesão (TLS), via da anemia Fanconi (FA), e O⁶-metilguanina DNA metiltransferase (MGMT), que são as vias mais comuns (DIETLEIN; THELEN; REINHARDT, 2014). A Figura 5 representa esquematicamente as principais vias de reparo do DNA.

Figura 5 - Representação esquemática das principais vias de reparo do DNA.





A. BER - Reparo por excisão de base. **B.** NER - Reparo por excisão de nucleotídeo. **C.** MMR - Reparo de pareamentos errados. **D.** NHEJ - Reparo por junção de extremidades não-homóloga. **E.** HR - Reparo por recombinação homóloga. **Fonte:** Extraído de Lange, Takata e Wood (2011).

Dessa forma, a resposta ao dano envolve várias vias importantes, e nos casos em que o dano é muito extenso, ultrapassando a capacidade de reparo, vias de sinalizações adicionais em resposta ao dano ao DNA (DDR) são responsáveis pela ativação da apoptose. Tal sinalização se faz necessária para eliminar o potencial de risco de mutação celular (DIETLEIN; THELEN; REINHARDT, 2014).

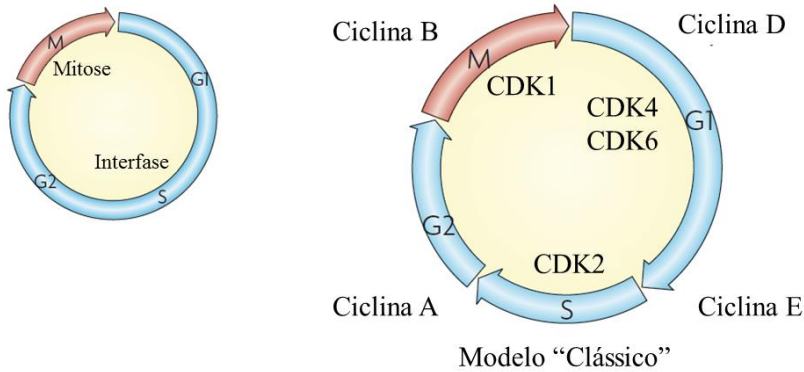
Embora haja relação do processo de reparo de DNA com a parada do ciclo celular ou apoptose, a compreensão de como essa relação é coordenada ainda é limitada (KASTAN; BARTEK, 2004; BOUWMAN; JONKERS, 2012).

1.3 CICLO CELULAR

1.3.1 Definição e fases do ciclo celular

O ciclo celular é um processo muito ordenado que duplica e transmite fielmente as informações genéticas de uma geração de células para a seguinte. As quatro fases características do ciclo celular (Figura 6) são: intervalo/gap 1 (G1), fase S, intervalo/gap 2 (G2) e fase M (ISRAELS; ISRAELS, 2001).

Figura 6 - Representação esquemática do Ciclo Celular.



Visão geral do modelo clássico, mostrando as fases do ciclo celular com sua respectiva regulação por ciclinas e cinases dependentes de ciclinas (CDKs).
Fonte: Extraído de Malumbres e Barbacid (2009).

As duas principais fases do ciclo celular são a fase S, onde ocorre a duplicação dos cromossomos e a fase M, que compreende dois eventos principais: a divisão nuclear (mitose) e a divisão citoplasmática (citocinese). No entanto, os intervalos G1 e G2 são dois intervalos fundamentais, não só reservados para garantir o crescimento celular, mas também para monitorar o ambiente interno e externo, o que assegura condições adequadas para permitir que as células se comprometam com as principais transformações na fase S e M (ALBERTS et al., 2010).

A primeira fase G1, período entre as fases M e S, é marcada pela estimulação por mitógenos extracelulares e fatores de crescimento. Em condições favoráveis de estímulo, ocorre o avanço das células do início de G1 até um ponto de comprometimento próximo ao fim desta fase, conhecido como ponto de restrição. Após passar esse ponto, as células se comprometem com a replicação do DNA, mesmo que os sinais extracelulares, que estimulam o crescimento e a divisão celular, sejam removidos (ALBERTS et al., 2010).

A fase S é marcada pela síntese de DNA, enquanto que a fase G2, que se trata do intervalo entre o término da fase S e M, é marcada pela continuidade do crescimento celular e síntese de proteínas da fase M. Por fim, a fase M é marcada pela geração de fusos mitóticos bipolares,

segregação das cromátides irmãs e divisão celular (COOPER, 2000; ALBERTS et al., 2010).

As células eucarióticas desenvolveram uma complexa rede de proteínas reguladoras, conhecida como sistema de controle do ciclo celular, que permite a progressão do mesmo. Entretanto, os níveis adicionais de regulação aumentam a fidelidade da divisão celular e permitem que o sistema de controle responda a vários sinais. Em animais multicelulares esse sistema é responsivo a sinais de outras células, que leva ao estímulo ou à inibição da divisão celular. Contudo, o mau funcionamento desse sistema pode levar ao excesso de divisões celulares podendo resultar em câncer (ALBERTS et al., 2010).

1.3.2 Pontos de checagem e reguladores do ciclo celular

A regulação do ciclo celular pode garantir que os eventos em cada fase desse processo sejam completados antes da célula avançar para a etapa seguinte (ISRAELS; ISRAELS, 2001). Durante a progressão do ciclo celular existem vários pontos de checagem molecular para assegurar que a célula só se replique em condições favoráveis, garantindo a integridade do genoma (KASTAN; BARTEK, 2004). Esses pontos de checagem são estrategicamente localizados no final da fase G1 e na interface G2/M, para prevenir a progressão e propagação de mutações ou células danificadas (ISRAELS; ISRAELS, 2001).

As etapas do ciclo celular regulatórias em sua totalidade apresentam um grupo de proteínas associadas com regulação precisa em cada ponto de checagem, para evitar que divisões celulares erradas modifiquem o genoma e sejam repassadas para as células filhas. Dentre os grupos das proteínas que regulam o ciclo celular, dois são essenciais: as ciclinas e as cinases dependentes de ciclinas - CDKs (BEHL; ZIEGLER, 2014).

As ciclinas são proteínas que oscilam sua concentração durante momentos específicos do ciclo celular e regulam a progressão do mesmo pela ativação das CDKs (GALDERISI; JORI; GIORDANO, 2003). As CDKs são enzimas heterodiméricas com duas subunidades, uma referente à proteína cinase e outra à ciclina, sendo a última responsável por regular as várias modificações químicas nas CDKs (HOCHEGGER; TAKEDA; HUNT, 2008).

O sistema de controle do ciclo celular, na maioria das células eucarióticas, ativa a progressão do mesmo em três principais pontos de transição reguladora, que são: (i) o ponto de restrição no final da fase

G1, relacionado com o comprometimento celular a entrada no ciclo celular e duplicação dos cromossomos; (ii) o ponto de checagem G2/M, responsável por desencadear os eventos iniciais que conduzem ao alinhamento dos cromossomos no fuso metafásico; (iii) o ponto de checagem M (transição entre metáfase e anáfase), responsável pelo controle da separação das cromátides-irmãs, conduzindo a conclusão da mitose e citocinese (ALBERTS et al., 2010).

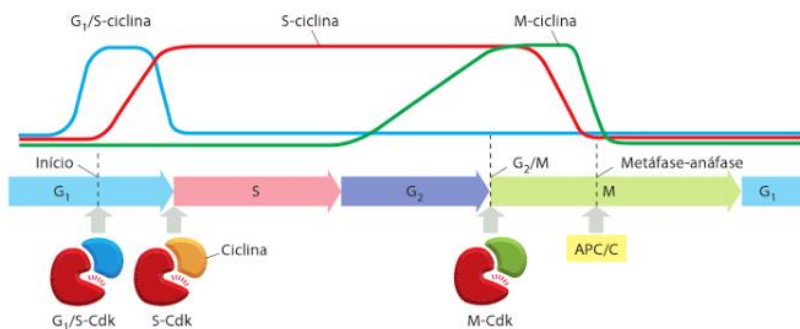
As proteínas CDKs mantêm o funcionamento do sistema de controle do ciclo celular e para isso, sua atividade é regulada, aumentando ou diminuindo, à medida que a célula avança no ciclo celular.

No processo de regulação do ciclo celular, as G1-ciclinas ajudam a regular as atividades das G1/S-ciclinas, as quais controlam, no final de G1, a progressão ao ponto de restrição por meio da ativação das CDKs, comprometendo a entrada da célula no ciclo celular, e apresentando redução de seus níveis na fase S. As S-ciclinas se ligam às CDKs logo após a progressão ao ponto de restrição e ajudam a estimular a duplicação dos cromossomos, apresentando elevados níveis até a mitose, pois essas ciclinas também contribuem para controlar alguns eventos mitóticos iniciais. As M-ciclinas ativam as CDKs que estimulam a entrada na mitose no ponto de checagem G2/M, e essas ciclinas são destruídas no meio da mitose (ALBERTS et al., 2010).

Nas células de vertebrados existem quatro CDKs e diferentes complexos de ciclinas que atuam em conjunto. As diferentes combinações entre CDKs e ciclinas permitem a ocorrência de diversos eventos no ciclo celular. O ponto de restrição de G1 é marcado pela ação integrada da ciclina D e CDK4 ou CDK6. Já o estímulo para iniciar a fase S (transição das fases G1-S) é mediado pela ciclina E-CDK2, enquanto a regulação do final da fase S ocorre pela ciclina A-CDK2 e ciclina A-CDK1. Por fim, a mitose é regulada pela ciclina B-CDK1 (ALBERTS et al., 2010).

A figura 7 mostra os complexos de ciclina-CDK e os respectivos eventos desencadeados no ciclo celular, assim como os níveis das ciclinas durante a progressão do mesmo. O quadro 3 lista os complexos ciclinas-CDKs, especificando os nomes das ciclinas e CDKs de cada complexo.

Figura 7 – Regulação da progressão do ciclo celular pela ação de ciclinas e cinases dependentes de ciclinas (CDKs).



Fonte: Extraído de Alberts et al. (2010).

Quadro 3 - Principais ciclinas e CDKs de vertebrados.

Complexo ciclina-CDK	Ciclina	CDK
G1-CDK	Ciclina D	CDK4, CDK6
G1/S-CDK	Ciclina E	CDK2
S-CDK	Ciclina A	CDK2, CDK1
M-CDK	Ciclina B	CDK1

Fonte: Extraído de Alberts et al. (2010).

Outro regulador chave, que envolve a transição entre metáfase e anáfase é o complexo promotor da anáfase ou ciclismo (APC/C, membro da família enzimática das ligases de ubiquitina). Diferentemente dos outros reguladores que envolvem a fosforilação de proteínas, essa regulação não envolve fosforilação e sim a destruição das proteínas, levando aos estágios finais da divisão celular (ALBERTS et al., 2010).

Outros reguladores mitóticos apresentam papéis essenciais na mitose, como a cinase semelhante a Polo - 1 (PLK1) e os membros da família das Auroras cinases, que estão entre substratos APC/C destruídos durante a anáfase. Aurora A está associada com os pólos do fuso mitótico durante a mitose, enquanto que Aurora B, componente enzimático do complexo passageiro de cromossomo (CPC), mostra localização dinâmica através da mitose. Na anáfase, tanto PLK1 quanto o CPC, são recrutados para a zona média do fuso, em um arranjo de microtúbulo antiparalelo (também conhecido como fuso central), que se

reúne entre os cromossomos segregados, desempenhando funções essenciais na organização de sinais para citocinese (FLOYD; PINES; LINDON, 2008).

O ponto de checagem mitótico também é um importante mecanismo de controle do ciclo celular e tem como função evitar a missegregação cromossômica e a subsequente produção de células filhas aneuplóides. A maioria das células tumorais são aneuplóides e frequentemente apresenta missegregação de cromossomos durante a mitose. De fato, a aneuploidia, definida como número de cromossomos que não são múltiplos ao conjunto haplóide, pode ocorrer devido a erros que causam ganhos ou perdas de cromossomos inteiros, bem como mutações estruturais que geram arranjos desiguais (ORR; GODEK; COMPTON, 2015). Além disso, a aneuploidia é uma característica comum dos tumores e, durante mais de 100 anos, tem sido proposta como fator que conduz à progressão tumoral (HOLLAND; CLEVELAND, 2009).

Modelos animais mostraram que a aneuploidia pode aumentar o risco de transformação neoplásica, entretanto como a aneuploidia aumenta esse risco permanece desconhecida. Uma possibilidade é que a aneuploidia *per se* gera perda de equilíbrio proteico, o que facilita o desenvolvimento tumoral por promover instabilidade genômica adicional. Outra possibilidade envolve o fato da aneuploidia permitir a duplicação de cromossomos que contêm alelos oncogênicos ou permitir a perda de cromossomos que possuem apenas uma cópia remanescente do tipo selvagem de um gene supressor tumoral, processo conhecido como perda de heterozigidade – LOH (HOLLAND; CLEVELAND, 2009).

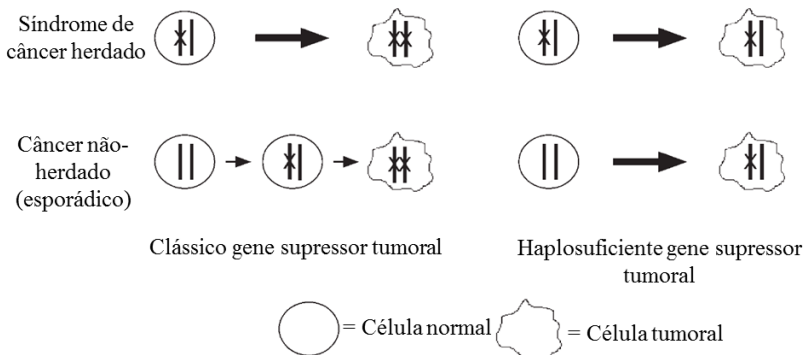
1.4 PERDA DE HETEROZIGOSIDADE

A LOH é definida como uma desigualdade alélica que altera a taxa normal 1:1 de dois alelos em um determinado locus genético pela diminuição do número de cópia de um alelo. Em outras palavras, a perda alélica, ou seja, a deleção de um dos dois alelos de um cromossomo homólogo, pode ser identificada como LOH (SCHWAB, 2012).

O processo de LOH é bastante frequente em mudanças genéticas somáticas em tumores humanos, e geralmente sua alta frequência em regiões cromossômicas particulares é considerada indicativo da localização de gene supressor tumoral, cuja perda ou inativação ocorre pelo mecanismo dois “*hits*”. Uma característica marcante de um gene

supressor tumoral é a perda funcional durante a iniciação ou progressão tumoral, e isso tipicamente ocorre por um dos conjuntos de cromossomos que é perdido devido à LOH (SCHWAB, 2012). A figura 8 esquematiza o desenvolvimento de tumores via inativação de genes supressores tumorais, por dois “*hits*” (genes clássicos) ou por apenas um único “*hit*” (genes haplossuficientes).

Figura 8 - Inativação de Genes Supressores Tumorais.



Os clássicos genes supressores tumorais são inativos via dois “*hits*”. Em caso de suscetibilidade de câncer inerente, um desses “*hits*” é adquirido na linhagem germinativa, com o segundo “*hit*” sendo adquirido somaticamente durante o desenvolvimento tumoral. E genes supressores tumorais haplossuficientes necessitam de apenas um único “*hit*”, sendo desnecessário dois “*hits*” para o desenvolvimento tumoral. **Fonte:** Extraído de Payne e Kemp (2005).

O exposto anterior implica na importância da LOH em pacientes haplossuficientes. Nesse sentido o quadro 4 mostra alguns genes supressores tumorais haplossuficientes e o respectivo câncer associado com a mutação do mesmo.

Quadro 4 - Genes supressores tumorais haplossuficientes e o respectivo câncer associado com mutações nesses genes.

(continua)

Gene	Câncer humano inerente associado
<i>APC</i>	Mutado na Síndrome de FAP coli
<i>ARF</i>	Mutado nos tumores de melanoma familiar e neural
<i>ATM</i>	Mutado na Ataxia Telangiectasia; aumenta a susceptibilidade ao câncer de mama em heterozigotos
<i>ATR</i>	Mutado na Síndrome de Seckel
<i>BLM</i>	Mutado na Síndrome de Bloom
<i>BRCA1/2</i>	Mutado na Síndrome de câncer de mama familiar e de ovário
<i>CBFA2/AML1/RUNX1</i>	Mutado no transtorno plaquetário familiar com predisposição para leucemia mielóide aguda
<i>CDHI (E-cad)</i>	Mutado no câncer gástrico familiar
<i>CDKN1A (p21^{Waf1/Cip1})</i>	Variantes genéticas associadas com risco aumentado de câncer de mama e sarcoma, câncer de pulmão, pele, câncer de cabeça e pescoço e câncer cervical
<i>LIG4</i>	Mutado na Síndrome de Lig4; variantes genéticas associadas com risco aumentado de câncer de mama, mieloma múltiplo e câncer de pulmão
<i>LKB1</i>	Mutado na Síndrome de Peutz-Jeghers
<i>MLH1/MSH2</i>	Mutado no câncer de cólon não polipose hereditário (HNPCC)
<i>NF1</i>	Mutado em neurofibromatose tipo 1
<i>PRKARIA</i>	Mutado no complexo Carney, uma síndrome de neoplasia múltipla familiar
<i>PTCH</i>	Mutado em Síndrome do carcinoma de células basais nevoide
<i>PTEN</i>	Mutado em várias Síndromes Hamartomatosas autossômicas raras, incluindo a síndrome de Cowden
<i>RBI</i>	Mutado em retinoblastoma familiar
<i>Genes da Proteína ribossomal (ex. L35, L37a, RPS19 e S8)</i>	<i>RPS19</i> , um gene de proteína ribossomal humana; mutado na anemia familiar Diamond-Blackfan com predisposição à leucemia (evidência de haploinsuficiência em algumas famílias)
<i>SMAD4/DPC4</i>	Mutado na polipose juvenil familiar
<i>TSC2</i>	Mutado no complexo de esclerose tuberosa

Quadro 4 - Genes supressores tumorais haplossuficientes e o respectivo câncer associado com mutações nesses genes.

(conclusão)

Gene	Câncer humano inerente associado
<i>TP53</i>	Mutado na Síndrome de Li-Fraumeni
<i>TGF-β</i>	Mutado na doença de Camurati-Engelmann, um distúrbio ósseo raro

Fonte: Extraído de Payne e Kemp (2005).

Mediante ao que foi exposto, o estudo da regulação da integridade do genoma é fundamental, ao passo que defeitos no complexo do fuso predispõem a ativação de pontos de checagem, erros na segregação de cromossômica e apoptose (LENS; VOEST; MEDEMA, 2010).

1.5 MORTE CELULAR

A morte celular é um conjunto de eventos que ocorre naturalmente nas células, apresentando diversas funções fisiológicas e celulares, como desenvolvimento, morfogênese, respostas ao estresse e danos celulares (NIKOLETOPOULOU et al., 2013). Os eventos de morte celular são determinados por processos bioquímicos e morfológicos diferenciados, e a caracterização deste processo permite diferenciar os tipos morte celular (KRYSKO, 2008). Dentre algumas vias de morte celular estão a apoptose e as formas necróticas, como necroptose e piroptose. O quadro 5 mostra as principais características morfológicas destas vias (BRUNE; ANDONIOU, 2017).

Quadro 5 - Principais características morfológicas da morte celular por apoptose e pelas formas necróticas.

Tipo de morte celular	Características morfológicas
Apoptose	Redução do volume celular Condensação nuclear Fragmentação do DNA Formação de corpos apoptóticos
Necroptose e piroptose	Inchaço celular Ruptura da membrana celular

Fonte: Do autor com base em Brune e Andoniou (2017).

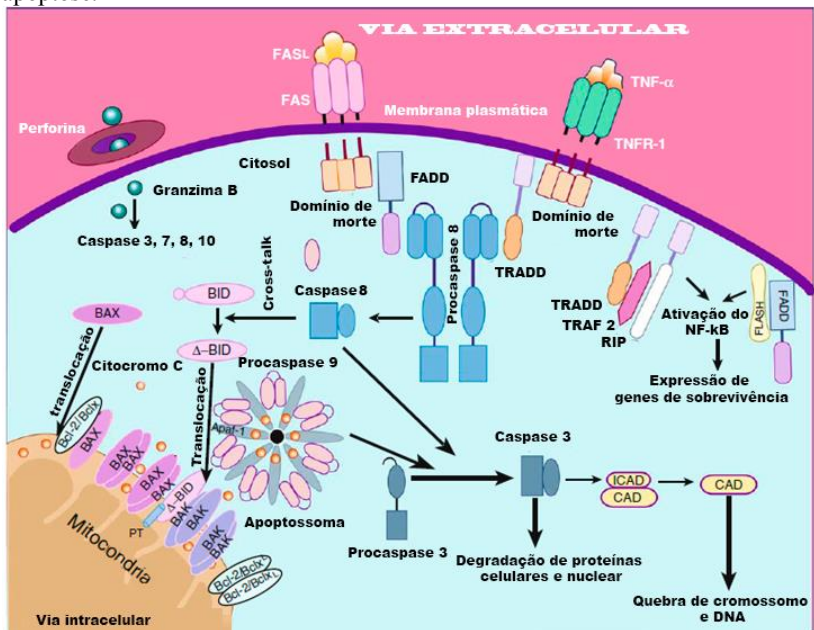
A apoptose é um evento que ocorre naturalmente, como passo obrigatório para o desenvolvimento tecidual, bem como para a prevenção a danos celulares que possam conduzir a problemas fisiológicos (NIKOLETOPOULOU et al., 2013). Este tipo de morte celular, diferentemente da necrose, apresenta aspectos morfológicos mais específicos. Assim, a apoptose é caracterizada pelo arredondamento celular, retração de pseudópodes, redução do volume celular, condensação da cromatina e fragmentação nuclear. Células apoptóticas apresentam pouca ou nenhuma modificação morfológica em organelas citoplasmáticas, contudo sua membrana plasmática em estágios finais do processo forma vesículas, sendo por fim, engolfadas por fagócitos residentes, o que evita processos inflamatórios (KROEMER et al., 2009).

A via extrínseca de apoptose envolve a ligação de ligantes de morte como o fator de necrose tumoral α (TNF- α), o ligante CD95 (ligante Fas) e o ligante indutor de apoptose relacionado com TNF (TRAIL), aos seus receptores de superfície celular cognatos o TNFR1, o CD95/Fas, o TRAIL-R1, o TRAIL-R2, e as séries de receptores DR, resultando na ativação da caspase-8 iniciadora (NIKOLETOPOULOU et al., 2013; ELMORE, 2007).

Por outro lado, a ativação da via intrínseca de apoptose envolve mudanças na permeabilidade da membrana mitocondrial externa e a liberação do citocromo c, que se liga à proteína adaptadora (Apaf-1) e à procaspase-9, para formar o complexo “apoptossomo” e ativar as caspases efetoras (caspase 3, 6 e 7), os quais ativam endonucleases que degradam proteínas nucleares e de citoesqueleto (NIKOLETOPOULOU et al., 2013; ELMORE, 2007).

Vários sinais de estresse e perturbações metabólicas podem ativar a apoptose, que pode ocorrer por uma das duas vias de sinalização, extrínseca ou intrínseca (Figura 9).

Figura 9 - Representação esquemática das vias intrínseca e extrínseca da apoptose.



Fator de necrose tumoral (TNF), ligante Fas (FASL), domínio associado à morte – Fas (FADD), receptor do fator de necrose tumoral (TNFR)-associado ao domínio de morte (TRADD), receptor da proteína de interação (RIP), DNase ativada por caspase (CAD). **Fonte:** Extraído de Saikumar; Venkatachalam (2009).

A caspase-3 é considerada a mais importante caspase efetora, sendo ativada pelas caspases iniciadoras (caspase-8, caspase-9 ou caspase-10). Esta caspase ativa a endonuclease CAD, que degrada o DNA cromossomal e causa condensação da cromatina. Ela também induz a reorganização e desintegração do citoesqueleto em corpos apoptóticos (ELMORE, 2007).

A ativação de diversas proteínas é responsável pela regulação das caspases e ativação do processo de apoptose, dentre elas as proteínas Bcl-2 e p53. A família de proteínas Bcl-2 é muito importante para a regulação da via intrínseca. Essas proteínas podem agir tanto de forma pró-apoptótica (Bcl-10, Bax e Bad) quanto antiapoptótica (Bcl-2, Bcl-x e Bcl-xL). Apesar das diferenças entre essas proteínas, o principal modo de ação de todas é a regulação da liberação do citocromo c (fundamental

para a ativação de apoptose), via alteração da permeabilidade de membrana mitocondrial. Quando não está heterodimerizada com Bad (proteína inibidora), Bcl-xL ou Bcl-2 inibem a liberação do citocromo c da mitocôndria através de um mecanismo ainda não muito bem compreendido, contudo, este evento é muito importante para a inibição das caspases efetoras (ELMORE, 2007).

Em geral, a via intrínseca da apoptose pode ativar a proteína p53, levando a ativação da transcrição de vários genes pró-apoptóticos, incluindo algumas proteínas da família Bcl-2, como a proteína Bax. Ainda, na mitocôndria a p53 induz a oligomerização das proteínas Bax e Bak com a Bcl-xL e Bcl-2, inibindo seus efeitos antiapoptóticos (AMARAL et al., 2010; FRIDMAN; LOWE, 2003). A proteína Bax ativa na mitocôndria leva à formação de poros, permitindo a liberação de fatores pró-apoptóticos, como o citocromo c, e a formação do apoptossoma (PORTT et al., 2011).

No passado a necrose era reportada como um evento “sujo”, e por muito tempo esse processo foi considerado como acidental e não regulado, culminando com processos inflamatórios. Entretanto, atualmente existe um acúmulo de evidências que indicam que a execução do processo de morte celular por necrose pode ser regulado por uma série de vias de transdução de sinal e mecanismos catabólicos, como a ativação da proteína RIP1, que conduz à necrose de forma programada, conhecido como necroptose (PAPATRIANTAFYLLOU, 2012; GOLSTEIN; KROEMER, 2007; FESTJENS; VANDEN BERGHE; VANDENABEELE, 2006).

Durante a necroptose, os receptores de interação com as proteínas cinases-1 e -3 (RIPK1 e RIPK3) são mediadores fundamentais, uma vez que são componentes do complexo II, também conhecido como necrossomo. Este complexo, ativado por TNFR1, é formado pelo heterodímero da caspase-8 e cFLIP em conjunto com FADD, RIPK1 e RIPK3. O cFLIP neste complexo previne a ativação autocatalítica da caspase-8, prevenindo a morte celular por apoptose. Apesar desta inibição, a caspase-8 apresenta uma atividade basal de protease e também atua como regulador negativo da necroptose, através da degradação e silenciamento de cinases pró-necroptóticas (BRUNE; ANDONIOU, 2017).

A ativação desta via morte ocorre através da ativação de RIPK3, que pode ocorrer de forma dependente ou independente de RIPK1. Uma vez ativado RIPK3 fosforila a proteína MLKL, que ao modificar sua conformação para sua forma oligomerizada, interage com a membrana da célula e causa sua ruptura (BRUNE; ANDONIOU, 2017).

Outra forma de morte celular é a piroptose, um processo que envolve caspases inflamatórias, como a caspase-1. Basicamente, a iniciação desta morte celular ocorre quando, em resposta ao estresse celular, é formado o inflamassoma, complexo multiproteico intracelular responsável pela ativação de caspases. Quando a caspase-1 é ativada, ela promove inflamação porque cliva a pro-interleucina (IL)-1 β e a pro-IL-18 nas suas formas ativas. Essa ativação resulta na clivagem da proteína gasdermina D, e a porção N-terminal desta proteína forma poros dentro da membrana celular, causando inchaço na célula e resultando na ruptura da membrana (BRUNE; ANDONIOU, 2017; PAIVA-OLIVEIRA et al., 2010).

Um grande número de agentes e eventos tem sido descrito como ativador de processos de morte celular, tais como processos inflamatórios, induzido por patógenos, através de toxinas formadoras de poros (FINK; COOKSON, 2005) e pelo estresse oxidativo (PORTT et al., 2011).

As células apresentam uma capacidade de adaptação e reparo aos danos ocasionados pela exposição a condições estressantes geradas por agentes externos ou por anormalidades intrínsecas. Porém a exposição continuada a essa situação de estresse, pode gerar estímulos lesivos que afetam várias vias metabólicas e organelas celulares, no qual a progressão dessa lesão culmina com a morte celular (FINK; COOKSON, 2005).

O processo de lipoperoxidação não enzimática (gerando ácidos graxos poli-insaturados) iniciado pelo ataque de espécies reativas (radicais livres, espécies reativas de oxigênio - EROs e de nitrogênio - ERNs), é descrito como ativador de ambas as vias, extrínseca e intrínseca, regulando positivamente a caspase-3 e, conseqüentemente, a apoptose (DALLEAU et al., 2013). Ainda, esses agentes oxidantes são também descritos por conduzirem à necrose celular e à disfunção na atividade da Bcl-2, através da ativação de Bax e liberação de citocromo c mitocondrial (PORTT et al., 2011; RYTER et al., 2007).

1.6 ESTRESSE OXIDATIVO

As EROs podem estar associados aos processos metabólicos que conduzem a danos celulares, pois são capazes de oxidar biomoléculas, como proteínas, lipídios, incluindo os constituintes de membranas e ácidos nucléicos, podendo alterar a sua funcionalidade. Nesse sentido, reações mediadas pelas EROs e por seus produtos podem causar a oxidação de lipídios de membrana (peroxidação lipídica), produzindo

derivados (como hidroxiperóxidos lipídicos) que reduzem a permeabilidade e afetam a integridade da membrana (NORDBERG; ARNER, 2001).

Essa toxicidade das EROs está relacionada com a sua capacidade em oxidar ácidos graxos poliinsaturados das membranas (NORDBERG; ARNER, 2001), pelo ataque das duplas ligação dos lipídeos, resultando em dano celular e disfunção tecidual (MANDAL, 2009).

A remoção de um hidrogênio de uma dessas duplas ligações leva à produção de peroxil lipídico, que sequestra o hidrogênio de outros lipídeos, produzindo radicais hidroperóxidos lipídicos (KEHRER, 2000), que, por sua vez podem decompor-se em várias espécies, tais como o malondialdeído (VACA; HARMS-RINGDAHL, 1989). As EROS como afirmado acima, podem oxidar outras moléculas, como o DNA e proteínas, diretamente ou indiretamente (DONG; YAO, 2008; YANG et al., 2005).

Essas espécies reativas ainda podem estar associadas à ativação de vias específicas de sinalização e geração de compostos tóxicos, que ocasionam danos, os quais podem levar à morte celular (FAN, 2009; VALKO, 2006). As EROs, ocorrem naturalmente nos organismos vivos e apresentam papel importante na modulação da transdução de sinais celulares (FINKEL, 2011), da proliferação celular e da apoptose (DEEB et al., 2012) e do sistema imune inato (RADA; LETO, 2008). Contudo, as EROs são também a maior fonte de estresse celular devido à sua capacidade de gerar danos às biomoléculas (MANDAL et al., 2009).

Nos organismos, as três principais formas reativas geradas a partir do oxigênio são: peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila ($\bullet OH$) e ânion superóxido ($\bullet O_2^-$), que estão associadas a patologias como Parkinson, Alzheimer, diabetes, esclerose múltipla, câncer, entre centenas de outras (BANDYOPADHYAY et al., 2009; WANG et al., 2008; CHEN et al., 2006).

O $\bullet OH$, é o principal responsável por injúrias em biomoléculas enquanto que outras EROs, como o H_2O_2 e o $\bullet O_2^-$, podem gerar danos celulares indiretamente, pois estão associados com a produção de $\bullet OH$, via reação de Fenton e/ou reação de Haber–Weiss (CUI; KIM; PARK, 2005).

Além das EROs supracitadas, também existem o oxigênio singlete (1O_2) e o ozônio (O_3), que são espécies altamente reativas que podem ser formadas endogenamente. Atualmente, foi demonstrado que anticorpos ou aminoácidos são responsáveis por catalizar a conversão do 1O_2 em O_3 , durante a morte de bactérias por neutrófilos ativados

(ONYANGO, 2016; WENTWORTH et al. 2002; YAMASHITA et al., 2008).

Em contrapartida, estudos têm demonstrado que a modulação do estresse oxidativo pode ser usada no tratamento do câncer como uma estratégia nova e eficiente para ocasionar morte seletiva das células tumorais (VERRAX et al., 2009), uma vez que as defesas antioxidante das células tumorais estão alteradas em comparação com as células normais. Essas defesas antioxidantes podem ser classificadas em dois tipos: (i) enzimáticas e (ii) não-enzimáticas.

A glutathiona reduzida (GSH), tripeptídeo (L- γ -glutamil-L-cisteinil-L-glicina), é considerada a principal defesa antioxidante marjoritária endógena não enzimática dos organismos aeróbios, protegendo as células contra a apoptose pela interação com fatores das vias de sinalização pró-apoptótica e antiapoptótica (BIRBEN et al., 2012).

Sabe-se que a atividade da GSH é atribuída à presença de um grupo tiol (SH) localizado na cadeia lateral da cisteína, que é responsável pela atividade antioxidante: (i) direta, através da interação com EROs ou ERNs e eletrófilos (acceptor de elétrons); e (ii) indireta, agindo como cofator de várias enzimas (LUSHCHAK, 2012).

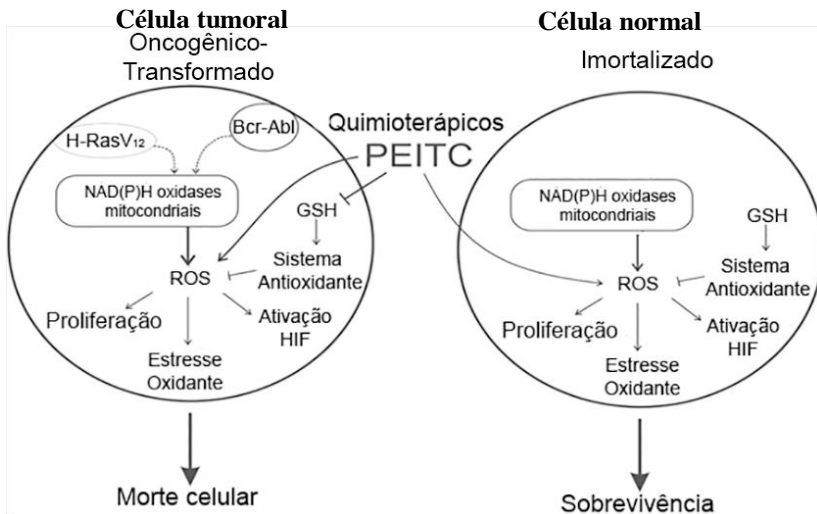
Este tripeptídeo também está envolvido em vários processos celulares, dessa forma, alterações na homeostase do mesmo podem estar relacionadas com a progressão de várias doenças, incluindo o câncer. Por isso, os pesquisadores estão estudando a importância da GSH, dos seus análogos e dos seus agentes moduladores como estratégias terapêuticas para inibir a progressão celular dos tumores e quimioresistência (BATIST; TULPULE; SINHA, 1986; CHAKRAPANI et al., 2008; LUSHCHAK, 2012; TRAVERSO et al., 2013; SCHAFFER; BUETTNER, 2001).

As enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPx) estão presentes nos organismos eucarióticos, e reagem com os compostos oxidantes para proteger as células e os tecidos de possíveis danos ocasionados pelo estresse oxidativo. O $\bullet\text{O}_2^-$ é convertido em H_2O_2 pela SOD e, em seguida, a CAT e/ou a GPx convertem o H_2O_2 em H_2O e O_2 . Porém, na reação catalisada pela GPx, a GSH é requerida como cofator (BIRBEN et al., 2012), resultando na sua oxidação. Entretanto, a forma oxidada (GSSG), altamente tóxica, deste tripeptídeo pode ser novamente convertida à sua forma reduzida (GSH) pela ação da glutathiona redutase (GR) que oxida o NADPH para fazer essa reciclagem (RAHMAN; KODE; BISWAS, 2006).

Alguns estudos revelaram que o excesso de EROs pode causar nas células tumorais dano oxidativo mitocondrial, inativação de moléculas redox-sensíveis e morte celular massiva. Nesse contexto, estudos revelaram que animais com tumor que foram tratados com compostos indutores de estresse oxidativo tiveram o crescimento tumoral inibido e/ou o tempo de sobrevivência prolongado. Esses dados indicam que a modulação de EROs poderia ser usada como estratégia terapêutica (CALDERON et al., 2002; SCHUMACKER, 2006; TRACHOOTHAM et al., 2006; VERRAX et al., 2006; VERRAX; CALDERON, 2009).

A figura 10 apresenta os efeitos do estresse oxidativo causados por quimioterápicos em células tumorais e normais, revelando um efeito seletivo de morte celular, que foi observado apenas nas células tumorais, enquanto que nas células normais o estresse oxidativo modulou a sinalização da sobrevivência. Estas observações se justificam pelo fato do microambiente tumoral apresentar um status redox alterado e das células tumorais possuírem um sistema de defesa antioxidante alterado, deixando-as mais susceptíveis à morte celular que as células normais (CALDERON et al., 2002; SCHUMACKER, 2006; VERRAX; CALDERON, 2009).

Figura 10 - Representação esquemática dos efeitos da modulação do estresse oxidativo em células tumorais e normais tratadas com quimioterápico.



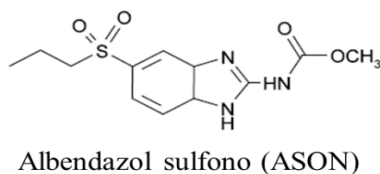
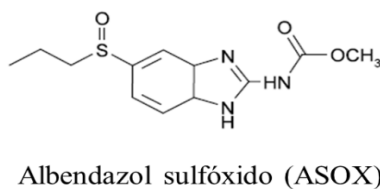
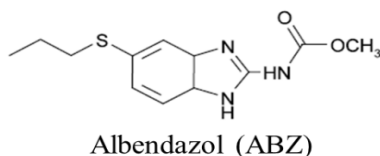
PEITC: fenetil isotiocianato. **Fonte:** Extraído de Schumacker (2006).

Assim, o conjunto de informações apresentadas anteriormente sugere que a modulação do estresse oxidativo poderia ser usada como uma estratégia alternativa na terapia do câncer.

1.7 ALBENDAZOL

O albendazol (ABZ; Figura 11) é um importante fármaco aprovado para uso humano pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (AVISA), agência reguladora que controla e supervisiona medicamentos no Brasil. Trabalhos mostram que, neste país, desde 1980, esse fármaco é usado em humanos para tratamento de parasitoses intestinais (RODRIGUES; MARTIRANI; BRANDÃO, 1980; AMATO NETO et al., 1983a; AMATO NETO et al., 1983b; AMATO NETO et al., 1985).

Figura 11 - Estrutura química do ABZ e dos seus produtos de oxidação.



Fonte: Extraído de Dayan (2003).

Atualmente, o ABZ está disponível comercialmente para o tratamento de helmintíases e elefantíase (filariose linfática). Esse

fármaco apresenta pelo menos 636 nomes comerciais diferentes listados no banco de dados Medindia, sendo fabricado por 385 laboratórios (acesso em www.medindia.net/drug-price/albendazole.htm; APÊNDICE A). Tal relevância se dá principalmente devido ao grande número de indivíduos infectados com helmintíase, aproximadamente 1,5 bilhões de pessoas (WHO, 2015a). Outros também são infectados com elefantíase, e aproximadamente 950 milhões de pessoas estão localizadas em área de risco, podendo facilmente contrair a filariose linfática (WHO, 2015b).

Um importante problema de saúde global é a infecção parasitária, especialmente nas regiões tropicais e subtropicais. A consequência desse problema é grave, pois algumas dessas doenças podem causar mutilação e desconfiguração, tornando miserável a vida de mais de um bilhão de pessoas. Nos casos mais graves, se o parasita não for detectado ou tratado, ocorre a morte de humanos e outros animais. Dessa forma, a OMS criou programas que objetivam prevenir, controlar, eliminar, ou erradicar essas doenças (WHO, 2015c).

Dentre os programas de erradicação de doenças tropicais negligenciadas, o uso do ABZ é amplamente indicado para o tratamento da filariose linfática e helmintíases. Para o tratamento da filariose linfática, o ABZ é combinado com ivermectina ou citrato de dietilcarbamazina, enquanto que para o tratamento de helmintíases pode-se usar somente o ABZ, ou usar este medicamento combinado com outros (como ivermectina, praziquantel ou citrato de dietilcarbamazina). Tais tratamentos para helmintíases também são usados em crianças com menos de 24 meses (WHO, 2015c).

Devido a esse fármaco ter sido implementado no mercado há mais de 30 anos, diversos parâmetros farmacológicos e farmacocinéticos já são conhecidos e bem descritos. Sabe-se que o principal mecanismo de ação do ABZ envolve a inibição da polimerização da tubulina, o que evita a formação de microtúbulos citoplasmáticos (LACEY, 1988, COOPER, 2000). Além disto, o ABZ também age inibindo a fumarato redutase e o transporte de glicose, e como consequência, o glicogênio é depletado, levando à imobilização e morte do parasita por redução dos estoques de glicose (BARROWMAN; MARRINER; BOGAN, 1984; SASTRY; BHAT, 2014).

O ABZ é relativamente insolúvel em água e na maioria dos solventes orgânicos, fazendo com que sua absorção seja baixa no trato gastrointestinal, tendo absorção máxima variando entre 1-5% em humanos. No entanto, a solubilidade e biodisponibilidade deste fármaco são aumentadas com a ingestão de alimentos gordurosos ou toranja (grapefruit), uma vez que, a combinação do ABZ com a dieta rica em

lipídios ou tortanja aumentou a concentração sérica (C_{max}) do albendazol sulfóxido em 6,5 vezes e 3,2 vezes respectivamente, ainda, o aumento ocasionado pela coadministração de tortanja, provavelmente foi, devido ao seu efeito na inibição da degradação intraluminal do ABZ pelas CYP3A4 (DAYAN, 2003; NAGY et al., 2002; RIGTER et al., 2004).

Após a absorção, o ABZ é rapidamente convertido no fígado ao seu metabólito primário, o albendazol sulfóxido, que geralmente é considerado como a forma responsável pela atividade terapêutica do ABZ. Por sua vez, o albendazol sulfóxido é metabolizado em albendazol sulfonado, outro metabólito gerado pela oxidação do ABZ (DAYAN, 2003).

A bioconversão intestinal do ABZ em sulfóxido de albendazol pode ocorrer por dois sistemas enzimáticos: citocromos P450 (CYP) e monooxigenases contendo flavina (FMO). Entretanto, o CYP3A4 apresenta maior contribuição na formação desse metabólito nos enterócitos, uma vez que são expressos em elevados níveis nas vilosidades próximas do intestino delgado (RAWDEN et al. 2000; MOLINA et al., 2007; WATKINS et al., 1987).

Segundo Rawden et al. (2000), tanto os CYP3A quanto as FMO, seriam responsáveis pela sulfoxidação hepática do ABZ em humanos, enquanto que o CYP1A parece ser responsável pela sulfonação (MARQUES; TAKAYANAGUI; LANCHOTE, 2002).

Estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa revelaram que o tratamento com ABZ aumentou a geração de EROs em hepatócitos de ratos Wistar (LOCATELLI et al., 2004). Nesses estudos, foi revelado que o ABZ induzia a produção de EROs, aumentando a peroxidação lipídica e depletando os níveis de GSH, o que levou a uma depleção no conteúdo de GSH total e um aumento dos níveis de GSSG. Além disso, foi observado que a atividade de enzimas antioxidantes como a SOD e CAT se elevou. Desta maneira, o conjunto de resultados revelou que o tratamento com ABZ promoveu uma condição severa de estresse oxidativo em hepatócitos de ratos (LOCATELLI et al., 2004).

Vale salientar que compostos pertencentes a família química do benzimidazol, como o ABZ, apresentam uma notória citotoxicidade que classifica esses compostos como inibidores mitóticos com ação específica no complexo do fuso. Essa compreensão se dá pelo fato desses compostos inibirem a dinâmica dos microtúbulos, que é essencial para a formação funcional do complexo do fuso e adequada distribuição das cromátides irmãs durante a mitose. Esse mecanismo pode ser importante na terapia antitumoral, porém acompanhado a ele, surge uma

preocupação com os efeitos genotóxicos do fármaco em células não transformadas.

Atualmente, existem estudos que recomendam a revisão de metodologias para avaliar de forma apropriada a genotoxicidade de substâncias químicas, garantindo assim a confiabilidade dos resultados. Essa preocupação surgiu mediante ao mesmo composto apresentar resultado negativo em teste de genotoxicidade *in vitro* e resultado positivo em teste realizado *in vivo*. A exemplo, algumas substâncias que atuam como inibidores mitóticos como colchicina, taxol e vimblastina sulfato, apresentaram resultados negativos no teste de Ames, embora *in vivo* os resultados tenham sido positivos para formação de micronúcleo (KIRKLAND et al., 2016).

Sob tal enfoque, uma busca feita na base de dados PubMed, em relação aos estudos genotóxicos do ABZ em células de mamíferos, revelou apenas quatro estudos (MANTOVANI, 1992; ALTINTAS et al., 2005; OZTAS et al., 2007; TWEATS et al., 2016). Entretanto, as conclusões gerais da genotoxicidade do ABZ foram divergentes. Por exemplo, o ABZ apresentou resultados negativos no teste de Ames (DAYAN, 2003), enquanto que em outros testes foi notada a capacidade do ABZ em induzir micronúcleo, o qual promove aberrações cromossômicas e missegregação (RAMÍREZ; EASTMOND; HERRERA, 2007).

Ainda, é oportuno enfatizar que o ABZ apresentou um forte efeito teratogênico em ratos e ovelhas (DAYAN, 2003), e, por esta razão, seu uso em humanos é contra-indicado em caso de gravidez. Dayan (2003) em sua retrospectiva, na avaliação de fármacos “antigos”, informa que os dados experimentais e não clínicos sobre a atividade, toxicidade e cinética podem ser considerados inadequados, com base nos guias regulatórios e normas profissionais atuais que são bastantes rigorosos. E considerando que o ABZ é um fármaco relativamente antigo, a análise da sua segurança farmacêutica, através de uma análise sistemática do seu potencial genotóxico, necessita ser melhor e mais profundamente investigada.

2 JUSTIFICATIVA

O estudo do Albendazol como antitumoral pode ser de grande relevância na terapia do câncer. Esse estudo leva em consideração o contexto mundial e nacional que apontam: (i) o crescimento da taxa de incidência de câncer, e (ii) a descoberta de medidas que reduzam e/ou contenham esse crescimento (INCA, 2015).

Nesse sentido, o reposicionamento de fármacos existentes para uma nova aplicação pode ser considerado como uma medida fundamental para gerar novas opções de terapia farmacêutica. Sendo assim, pode-se constituir numa estratégia importante e rápida para avançar na terapia tumoral, em comparação à pesquisa e desenvolvimento de um novo fármaco.

A possibilidade de reposicionar fármacos para uma nova aplicação ocorre principalmente por dois motivos: (i) por consequência das doenças apresentarem algumas vias de sinalização comuns, e (ii) devido ao desenvolvimento de um novo fármaco ser um processo bastante demorado e caro (GUPTA et al., 2013; NOSENGO, 2016). A exemplo, tem-se a descoberta de medicamentos originalmente identificados como analgésico, anti-inflamatório, anestésico, antiparasitários, anti-diabético, cardioprotetor entre outros, que atualmente estão tendo indicação para serem reposicionados para o tratamento antitumoral, com base em estudos pré-clínicos e clínicos, bem como nas aprovações por órgãos reguladores, com FDA e Agência de Medicina Européia (BEN-ZIV et al., 2012; GUPTA et al., 2013; MANIC et al., 2014; McFARLAND et al., 2014; PANTZIARKA et al., 2014; UCHIDA et al., 2009).

Nesse contexto o ABZ, objeto desse estudo, originalmente descoberto para o tratamento de helmintíases e filariose, poderia ser redirecionado para o tratamento de tumores. Tal estratégia de reposicionamento do ABZ está fundamentada na indução de EROs, que pode influenciar eficientemente a morte seletiva das células tumorais, e principalmente na ação em microtúbulos (CALDERON et al., 2002; VERRAX et al., 2009; VERRAX; CALDERON, 2009; LACEY, 1988). Dessa forma, o excesso de EROs pode causar, em tais tipos celulares, dano oxidativo mitocondrial, inativação de moléculas redox-sensitivas e morte celular. Ainda, o ABZ foi indicado como potente indutor de EROs em roedores (LOCATELLI et al., 2004).

Outro aspecto fundamental é o efeito genotóxico do ABZ, posto que o mecanismo de ação do ABZ é a inibição da polimerização da tubulina, interrompendo a dinâmica dos microtúbulos e a formação

adequada dos fusos mitóticos. Conseqüentemente, tais efeitos promovem a morte celular ou divisão celular de maneira inadequada. Essa divisão celular errônea está associada à missegregação cromossômica e LOH, as quais estão envolvidos no processo de desenvolvimento tumoral.

Visto que a avaliação do potencial genotóxico em mamíferos do ABZ apresenta poucos estudos sem uma conclusão clara (MANTOVANI, 1992; ALTINTAS et al., 2005; OZTAS et al., 2007; TWEATS et al., 2016), faz-se necessário revisar o estudo da segurança medicamentosa desse fármaco. Ainda, é oportuno enfatizar que o ABZ, por ser um fármaco relativamente “antigo”, poderia apresentar uma avaliação sobre atividade, toxicidade e cinética considerada inadequada na atualidade, com base nos guias regulatórios e normas profissionais atuais (DAYAN, 2003).

Nesse contexto, a condução de estudos do potencial genotóxico do ABZ é muito importante, pois permite verificar o seu efeito nas células de mamíferos e suas possíveis implicações. E o conjunto de dados permite implicar o seu efeito em pacientes normais, especialmente os haplossuficientes (que carregam geneticamente apenas uma cópia do alelo), os quais são mais susceptíveis ao desenvolvimento do câncer.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve como objetivo geral um estudo de reposicionamento do anti-parasitário albendazol, avaliando a sua ação promotora de estresse oxidativo, sua potencial atividade antitumoral, assim como os aspectos críticos em relação à genotoxicidade desse medicamento, investigando os possíveis mecanismos de ação associados a esses efeitos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

No intuito de alcançar o objetivo geral deste trabalho, foram propostos os seguintes objetivos específicos:

1. Avaliar as interações e os danos oxidativos ao CT-DNA após o tratamento com ABZ;
2. Determinar *in vitro* a citotoxicidade em diferentes linhagens imortalizadas, transformadas e não transformada (normal), de origem humana ou murina, após o tratamento com ABZ;
3. Analisar o potencial antiproliferativo do ABZ *in vitro*;
4. Avaliar o envolvimento do estresse oxidativo na promoção dos efeitos citotóxicos e/ou antiproliferativo induzidos pelo tratamento com ABZ *in vitro*;
5. Determinar o efeito do ABZ no potencial de membrana mitocondrial *in vitro*;
6. Avaliar *in vivo* a inibição do crescimento tumoral e tempo de sobrevida após o tratamento com ABZ;
7. Caracterizar *in vivo* a indução do estresse oxidativo por ABZ em camundongos Balb-c implantados com TAE;
8. Avaliar a fragmentação do DNA e o tipo de morte das células TAE dos animais tratados com o ABZ;
9. Avaliar a expressão de proteínas envolvida no dano oxidativo ao DNA (γ H2AX) e na morte celular (p53, Bax e Bcl-xL) de células TAE, após tratamento com o ABZ;
10. Caracterizar *in vivo* as alterações no ciclo celular pelo tratamento ABZ em camundongos Balb-c implantados com TAE;

11. Analisar *in vitro* os efeitos sobre o ciclo celular das células do linfoma DDT após o tratamento com ABZ;
12. Averiguar o perfil no sequenciamento de RNA de células do linfoma DDT após o tratamento com ABZ;
13. Estudar o efeito do tratamento com ABZ na dinâmica de microtúbulos;
14. Determinar o efeito do ABZ na LOH.

4 METODOLOGIAS

As metodologias desta tese foram realizadas na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e no Instituto de Câncer da Holanda (NKI), e o quadro 6 especifica o local de desenvolvimento destas.

Quadro 6 - Local de desenvolvimento das metodologias usadas nesta tese.

Metodologia	Local
Interação do ABZ com o CT-DNA	UFSC
Tipo de interação com o DNA por fluorescência	UFSC
Dano oxidativo ao CT-DNA	UFSC
Cultivo celular de MCF-7	NKI
Cultivo celular de DDT, DDinT, HeLa, U-2 OS, RPE-1, MLH1	UFSC
Integridade de mitocondrial	UFSC
Integridade de membrana	NKI
Estresse replicativo	NKI
Atividade antiproliferativa e citotóxica	NKI
Conteúdo intracelular de EROs	UFSC
Potencial de membrana mitocondrial	UFSC
Atividade Antitumoral	UFSC
Indicadores de estresse oxidativo e defesas antioxidantes	UFSC
Fragmentação do DNA de células do TAE	UFSC
Tipo de morte de células do TAE	UFSC
Expressão das proteínas γ -H2AX, p53, BAX, BCL-xL	UFSC
Ciclo celular	UFSC e NKI
Sequenciamento de RNA das células de linfoma DDT	NKI
Dinâmica dos microtúbulos	NKI
Perda de heterozigidade	NKI

Fonte: Do autor.

4.1 REAGENTES E ANTICORPOS

Para cultivo de células foi usado meio de cultura DMEM, G-MEM BHK 21 e RPMI, tampão PPBS, soro fetal bovino, soro fetal de bezerro e antibióticos, adquiridos da Gibco. Albendazol, albumina de soro bovino (BSA), brometo de etídio (EtdBr), DNA de timo de bezerro (CT-DNA), agarose, beta mercaptoetanol, 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), 2',7'-diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA), dimetil-sulfóxido (DMSO), 5,5'-ditio-bis(2-nitrobenzóico) (DTNB), ácido

tiobarbitúrico (TBA), coquetel inibidor de protease, catalase (CAT), glutationa redutase, dinucleotídeo de nicotinamida e adenosina fosfato reduzido (NADPH), L-arginina, L-glutamina, metotrexato, nocodazol, noscapina, sal 3-(4,5-dimetil -2-tiazol)2,5-difenil-brometo de tetrazolium - MTT, taxol e tetrametilrodamina etil éster (TMRE), foram comprados da Sigma-Aldrich. O coquetel inibidor de fosfatase foi adquirido da Calbiochem (Merck Biosciences). O kit de solução contendo PI/RNase foi adquirido da Immunostep. O kit quimioluminescente para detecção das bandas de proteínas (horseradish peroxidase – HRP) foi adquirido da Millipore. Os anticorpos primários e secundários utilizados para o western blot, conforme apresentados no quadro 7, foram obtidos da Santa Cruz Biotechnology e Merck Millipore, enquanto que aqueles utilizados para a análise da dinâmica dos microtúbulos foram obtidos conforme apresentados no quadro 8. Todos os demais reagentes foram usados com grau de pureza atendendo as normas da American Chemical Society (ACS).

Quadro 7 - Anticorpos primários e secundários usados no *western blot*.

Anticorpo Primário	Diluição	Empresa
Anti-Bax (mouse monoclonal)	1:500	Santa Cruz Biotechnology (sc-7480)
Anti-Bcl-xL (mouse monoclonal)	1:500	Santa Cruz Biotechnology (sc-8392)
Anti- β Actina (rabbit policlonal)	1:1.000	Santa Cruz Biotechnology (sc-7210)
Anti- γ H2AX (Ser 139) (rabbit policlonal)	1:1.000	Santa Cruz Biotechnology (sc-101696)
Anti-p53 (rabbit policlonal)	1:1.000	Santa Cruz Biotechnology (sc-6243)
Anticorpo Secundário	Diluição	Empresa
Anti-mouse IgG (goat polyclonal)	1:10.000	Merck Millipore (AP 181P)
Anti-rabbit IgG (goat polyclonal)	1:10.000	Merck Millipore (AP 132P)

Fonte: Do autor.

Quadro 8 - Anticorpos primários e secundários usados na análise da dinâmica dos microtúbulos.

Anticorpo Primário	Diluição	Empresa
Anti- α -tubulina (mouse)	1:10.000	Sigma
Anti-crest (human)	1:5.000	Cortex Biochem
Anticorpo Secundário	Diluição	Empresa
Alexa Fluor 568 (anti-mouse)	1:500	Molecular probes
Alexa Fluor 647 (anti-human)	1:500	Molecular probes

Fonte: Do autor.

4.2 PREPARO DAS SOLUÇÕES DE ABZ E CT-DNA

4.2.1 ABZ

Foi preparada uma solução estoque em água destilada de 1 mM de ABZ (Sigma Aldrich, nº de catálogo: A4673), solubilizado em 1% de DMSO (Sigma Aldrich, nº de catálogo: D8418) para os ensaios *in vitro*.

No ensaio da varredura do CT-DNA a solução estoque foi diluída para a obtenção das concentrações em estudo usando água ultrapura (Mili-Q). A diluição foi realizada com o tampão fosfato (50 mM) contendo de cloreto de sódio (100 mM) em pH 7,4, e na análise da oxidação do DNA, foi usado tampão fosfato (50 mM) para a diluição.

Nos ensaios de citotoxicidade, de proliferação celular, determinação de EROs e potencial de membrana mitocondrial a solução estoque foi diluída, para a obtenção das concentrações em estudo, usando o meio de cultura DMEM. Uma solução estoque de 100 mM de ABZ em DMSO foi feita para os ensaios de genotoxicidade, com posterior diluição em meio para 10 mM de ABZ, empregada para o preparo das diluições usadas nos experimentos. Para os ensaios *in vivo* foi feita uma solução em salina (0,9%), usando 1% de DMSO para solubilizar o ABZ, na concentração de 20 mg de ABZ/kg do peso do animal.

4.2.2 CT-DNA

A solução estoque de 1 mM de CT-DNA foi preparada em duas etapas: a primeira constou na solubilização de 5 mg de CT-DNA (Sigma Aldrich, nº de catálogo: D4522) em 5 mL de água ultrapura (Mili-Q) autoclavada, gerando uma solução com concentração igual a 12,16 mM que foi calculado de acordo com o protocolo de procedimentos do fabricante. Na segunda etapa foi preparada uma solução para obter a concentração estoque de DNA desejada, utilizando água ultrapura (Mili-Q) autoclavada.

O grau de pureza do DNA foi avaliado através dos valores de razão da absorbância (A_{260}/A_{280} e A_{260}/A_{230}) que se encontraram dentro da faixa entre 1,8-1,9, garantindo que o DNA usado estava livre de proteína.

4.3 ANÁLISE DA INTERAÇÃO DO ABZ COM O CT-DNA

A análise da interação com o DNA foi realizada através do método de varredura espectrofotométrica do CT-DNA, segundo Sirajuddin, Ali e Badshah (2013), com o intuito de verificar se o composto teste, no caso o ABZ, era capaz de interagir com este ácido nucléico.

Os espectros de varredura das soluções de CT-DNA, em presença ou não de ABZ, foram avaliados com respeito à ocorrência ou não de hipocromismo e outros tipos de interação intramoleculares. O CT-DNA (40 μ M) e o ABZ (10 μ M) foram pipetados (isolados e em associação) em uma placa de 96 poços específica para leitura em UV. Posteriormente, foi feita uma varredura espectrofotométrica, usando um multileitor de placas (TECAN Infinity M200), abrangendo os comprimentos de onda de 220 a 320 nm. Os dados obtidos foram representados em forma de gráficos e analisados.

4.4 AVALIAÇÃO DO TIPO DE INTERAÇÃO COM O DNA POR FLUORESCÊNCIA

A análise do tipo interação do ABZ com o DNA foi realizada através do método de varredura espectrofotométrica da combinação entre o CT-DNA e o brometo de etídio (EtBr), utilizando medidas de fluorescência (DA SILVEIRA et al., 2011).

Tal experimento foi realizado para verificar se o tipo interação do composto em estudo ocorria por meio de intercalação. Para isso, foi feita

uma curva do EtBr (nas concentrações de 5, 10, 20, 30, 50 e 70 μM) na ausência e na presença do CT-DNA na concentração de 10 μM , para a obtenção do ponto de saturação do EtBr nos sítios do DNA. A diluição do EtBr e do DNA foi feita usando tampão fosfato (50 mM) com NaCl (0,1 M) pH 7,4.

Uma vez calculado a melhor concentração de EtBr, o ensaio foi realizado usando a combinação do EtBr (20 μM) com CT-DNA (10 μM) associados ou não com ABZ (10, 20, 30 e 40 μM). Essas soluções foram pipetadas em uma placa de 96 poços específica para leitura em UV, e após a incubação (10 min em temperatura ambiente e ao abrigo da luz), foi realizada uma leitura nos comprimentos de onda de excitação (492 nm) e de emissão (620 nm), usando um multileitor de placas (TECAN Infinity M200). Os dados obtidos foram tabulados para a construção dos gráficos e uma posterior análise.

4.5 ANÁLISE DO DANO OXIDATIVO AO CT-DNA

A análise do dano oxidativo ao CT-DNA foi baseada na capacidade do ABZ em oxidar o carbono-4 (C-4) da desoxirribose, gerando o propenal, de acordo com metodologia proposta por Jun, Bochu e Liancai (2007). A clivagem oxidativa do DNA mediada por EROs foi mensurada pela reação do propenal com o ácido tiobarbitúrico (TBA).

Assim, foi usado CT-DNA (0,5 mM) em tampão fosfato (50 mM, pH 7,2) na presença de ABZ (10 μM). Para os grupos controle negativo e controle positivo foi usado o tampão fosfato e apenas no controle positivo a solução tinha 100 μM de $[(\text{Fe}(\text{EDTA}))^{2-}]$ e 10 mM de H_2O_2 . Todas as soluções foram incubadas por 24h a 37 °C. Depois foram adicionados uma solução de TBA (1%) em NaOH (50mM) e o ácido acético glacial, seguidos de outra incubação (por 30 min a 100 °C). Em seguida depois de um banho de gelo, foi adicionado 80 μL da solução em uma placa de 96 poços, para a leitura em triplicata no comprimento de onda de 532 nm, usando um multileitor de placas (TECAN Infinity M200).

4.6 CULTIVO CELULAR

As diversas linhagens celulares usadas nesse estudo estão listadas no quadro 9, contendo algumas informações gerais, como o organismo e o tecido de origem, o tipo celular, as propriedades da cultura e a doença associada.

Quadro 9 – Informações gerais das linhagens celulares

Linhagem	Tecido	Tipo celular	Doença
DDT ^{m,S}	Baço	Conjuntivo	Linfoma
DDinT ^{m,S}	Baço	Conjuntivo	Linfoma
HeLa ^{m,A}	Cérvix	Epitelial	Adenocarcinoma
MCF-7 ^{h,A}	Glândula mamária	Epitelial	Adenocarcinoma
MLH1 ^{m,A}	Embrião	Células tronco embrionárias	Síndrome de Lynch
RPE-1 ^{h,A}	Retina	Epitelial	Normal
U-2 OS ^{h,A}	Ossos	Conjuntivo	Osteosarcoma

Fonte: Do autor. Nota: ^m denota origem *Mus musculus*, ^h denota origem *Homo sapiens*, ^s denota células suspensas e ^A denota células aderentes.

A linhagem celular tumoral MCF-7 (adenocarcinoma de mama) utilizada neste trabalho foi procedente do banco de células da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Essa linhagem aderente foi cultivada e mantida a 37 °C, em uma atmosfera de CO₂ (5%) com 95% de umidade, em meio DMEM rico em glicose, suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de *pen strep* (10.000 unidades/mL de penicilina e 10.000 µg/mL de estreptomicina).

As linhagens DDT e DDinT utilizada neste trabalho foram gentilmente cedidas pelo laboratório do pesquisador Heinz Jacobs, do Instituto de Câncer da Holanda (NKI). Essas linhagens suspensas foram cultivadas e mantidas a 37 °C, em uma atmosfera de CO₂ (5%) com 95% de umidade, em meio RPMI, suplementado com 8% de soro fetal bovino, 5% de L-arginina, 1% de antibiótico e 1% de beta mercaptoetanol.

As linhagens HeLa (adenocarcinoma de cérvix) e U-2 OS (osteosarcoma), utilizada neste trabalho foram gentilmente cedidas pelo laboratório do pesquisador René Medema, enquanto a linhagem RPE-1 (células epiteliais imortalizadas) foi gentilmente doada pelo laboratório do pesquisador Reuven Agami, ambos do NKI. Essas linhagens aderentes foram cultivadas e mantidas a 37 °C, em uma atmosfera de CO₂ (5%) com 95% de umidade, em meio DMEM rico em glicose, suplementado com 8% de soro fetal bovino e 1% de L-glutamina.

A linhagem MLH1, gentilmente cedida pelo laboratório do pesquisador Hein te Riele, do NKI, foi cultivada e mantida a 37 °C, em uma atmosfera de CO₂ (5%) com 95% de umidade, em meio G-MEM

BHK 21, suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de piruvato, 1% de aminoácidos, 1% de LIF e 0.1% de beta mercaptoetanol.

4.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA E DO ESTRESSE REPLICATIVO

4.7.1 Avaliação da integridade mitocondrial

A citotoxicidade *in vitro* do ABZ foi avaliada em termos de viabilidade mitocondrial, através do método que emprega o sal 3-(4,5-dimetil -2-tiazol)2,5-difenil-brometo de tetrazolium - MTT (MOSMANN, 1983).

As células da linhagem MCF-7 foram cultivadas em placas de 96 poços, com a densidade celular de 10^4 células por poço. Após o tempo (*overnight*) para a aderência celular, o meio foi removido para submeter as células ao tratamento com o ABZ ou metotrexato (MTX; como controle positivo) em diferentes concentrações (1, 5, 10, 50 e 100 μM), no período de 24h de incubação. Como controle foi usado o meio contendo 1% de DMSO.

Posteriormente, o meio foi removido e os poços foram lavados duas vezes com PBS estéril (200 μL ; 37°C). E em seguida, foi adicionado 100 μL da solução de MTT (0,5 mg/mL, 1:10 v/v de PBS:MEIO). Após 2h de incubação, houve a remoção dessa solução e adição DMSO puro (100 μL). Por fim, a placa foi agitada por 10 min no agitador de placa antes da sua leitura no multileitor de placas (TECAN Infinity M200), no comprimento de 540 nm. Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos em média \pm erro padrão da média (E.P.M).

A citotoxicidade do ABZ foi comparada a um grupo controle negativo (tratado somente com veículo) e os dados obtidos foram expressos em percentual de células viáveis em relação ao controle negativo. A partir desses resultados, foi calculado o valor do EC_{50} pela análise da regressão linear, em que o valor de EC_{50} correspondeu à concentração efetiva de 50%, ou seja, a concentração na qual um determinado composto potencialmente tóxico é capaz de produzir a morte de 50% das células expostas ao tratamento em estudo.

4.7.2 Avaliação da integridade de membrana

A citotoxicidade *in vitro* do ABZ foi avaliada em termos de integridade de membrana, através da marcação por um composto

intercalante de DNA, o iodeto de propídio. A detecção por citometria de fluxo aumenta a precisão da análise, pois esta contagem avalia diretamente o número de células.

A quantidade de 2×10^4 células DDT e DDinT por poço foi semeada nas placas de 24 poços no mesmo dia do tratamento com diferentes concentrações de ABZ (0,1, 0,2, 0,4 e 0,8 μM), enquanto que $7,5 \times 10^4$ células de HeLa, U-2 OS e RPE-1, foram semeadas por poço nas placas de 12 poços um dia antes do tratamento.

O tempo de tratamento usado foi de 24h. Após o tratamento, as células foram transferidas para tubos de 5 mL, centrifugadas (5 min; 302 x g) com posterior remoção do sobrenadante e as células foram ressuspensas em 100 μL de tampão FACS e transferidas para uma placa de 96 poços. Em seguida uma nova centrifugação (3 min; 435 x g) foi realizada com posterior remoção do sobrenadante, as células foram ressuspensas em 120 μL de tampão FACS com iodeto de propídio (1 mg/mL) e mensuradas usando o citômetro FACSArray (BD). Os dados foram analisados pelo programa *Flowjo software x7.0* (WIT et al., 2015).

4.7.3 Avaliação do estresse replicativo

O modelo experimental, desenvolvido pelo laboratório do pesquisador Heinz Jacobs, do NKI, permitiu investigar a existência de estresse replicativo pela análise dos dados de toxicidade das linhagens DDT e DDinT (descrita no item 4.7.3). Esse modelo englobou um conjunto único de isogênicos selvagens (wild type), os quais são tolerantes ao dano ao DNA (DDT) e os mutantes PCNA^{K164R}, os quais são intolerantes ao dano ao DNA (DDinT). As duas linhagens celulares foram derivadas de células TP53 de camundongos selvagens (sem mutação no PCNA) e mutantes (PCNA^{K164R}), que desenvolvem linfoma tímico (LANGERAK et. al., 2007).

Essa estratégia avaliou o PCNA, uma proteína central na replicação e no reparo do DNA. A monoubiquitinação dessa proteína (PCNA-Ub na posição K164) ocorre em presença de dano ao DNA, uma vez monoubiquitinada, essa proteína pode receber poliubiquitinações responsáveis pela tolerância ao dano. Entretanto, a mutação pontual, nas células DDinT, impede a monoubiquitinação do PCNA, tornando essa linhagem celular intolerante ao dano, em outras palavras, ocorre o aumento na sensibilidade dessa linhagem a compostos que causam dano ao DNA.

A citotoxicidade dessas duas linhagens foi comparada. A ocorrência de diferença significativa da toxicidade para um mesmo tratamento é indicativo de um possível estresse replicativo.

4.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA E CITOTÓXICA

A avaliação da atividade antiproliferativa e citotóxica foi realizada pelo método proposto por Aithal et al. (2009). Células MCF-7 (500 células por poço) foram semeadas em placa de cultura de 6 poços e incubadas 24h para a aderência. Após este período, o meio de cultura foi substituído por outro contendo ABZ ou MTX, em diferentes concentrações (5 e 10 μM). Para o controle negativo foi utilizado somente meio de cultura contendo 1% de DMSO.

O tempo de tratamento usado foi de 24h, e posteriormente, as células foram lavadas 3 x com PBS a 37 °C e o meio foi substituído por meio fresco a cada 4 dias e, após 15 dias, foi verificada a presença de colônias. As colônias foram fixadas e coradas com solução cristal violeta (0,2%) para serem posteriormente visualizadas e quantificadas. As colônias foram contadas e os resultados expressos pelo número de colônias em comparação ao controle.

4.9 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO INTRACELULAR DE EROs

A quantificação do conteúdo intracelular de EROs foi determinada de acordo com Glorieux et al. (2011). Esse ensaio foi baseado no princípio de que as esterases endógenas hidrolisam o DCFH-DA em 2',7'- diclorofluorescina (DCFH), um composto não fluorescente, e as EROs, principalmente os hidroperóxidos, oxidam o DCFH em um composto altamente fluorescente.

As células da linhagem MCF-7 foram cultivadas em placas de 96 poços pretas, com uma densidade celular de 15×10^3 células por poço. Após o tempo para aderência celular (*overnight*), o meio foi removido e as células foram incubadas com a solução de DCFH-DA (10 μM , Sigma, St. Louis, MO) em solução salina tamponada de Hank (HBSS, Gibco, Grand Island, NY, USA) a 37 °C por 30 min.

Em seguida, essa solução foi removida, as células foram lavadas duas vezes com HBSS (200 μL) e tratadas com o ABZ em diferentes concentrações subtóxicas (5, 15 e 25 μM) durante 1h. Posteriormente à remoção dos tratamentos, as células foram lavadas duas vezes com HBSS (200 μL), e foi acrescentado HBSS (100 μL) para mensurar a

intensidade da fluorescência do DCFH, a qual foi feita em um comprimento de onda de excitação de 485 nm e de emissão de 520 nm, usando o multileitor de placas (TECAN Infinity M200).

Consecutivamente à concentração de proteínas foi determinada pelo método de Bradford para normalizar a fluorescência pelo conteúdo de proteínas na amostra. A mudança na concentração de EROs foi determinada pela intensidade de fluorescência de cada poço dividida pelo seu respectivo conteúdo de proteínas, resultando em unidades de fluorescência (FU)/ μg de proteína. O experimento foi feito em triplicata e os resultados foram expressos em média \pm E.P.M.

4.10 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL

O potencial de membrana mitocondrial foi avaliado usando uma sonda fluorescente, o tetrametilrodamina etil éster (TMRE). O TMRE é um corante vermelho-laranja, carregado positivamente e permeável à célula, que se acumula facilmente em mitocôndrias ativas devido às suas cargas negativas relativas. As mitocôndrias despolarizadas ou inativas têm uma diminuição no potencial de membrana e não conseguem acumular o TMRE.

Para esse ensaio, células MCF-7 (10^4 células/poço) foram semeadas em placas fluorescentes de 96-poços, após a confluência, as células foram tratadas com diferentes concentrações de ABZ (1, 10 e 100 μM), NAC (5 mM), ou ABZ associado com NAC. Depois de 6h de tratamento, as células foram lavadas uma vez com HBSS livre de vermelho de fenol e incubadas com TMRE (1 μM) durante 20 min a 37 °C. Posteriormente, as células foram lavadas com HBSS livre de vermelho de fenol, seguida pela mensuração da intensidade de fluorescência, usando um pico de excitação de 549 nm e emissão de 575 nm, usando o multileitor de placas (TECAN Infinity M200).

4.11 ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTITUMORAL *in vivo*

4.11.1 Animais

A análise da atividade antitumoral *in vivo* foi feita utilizando camundongos isogênicos Balb/c (*Mus musculus*), machos (20 \pm 2 g de peso), com aproximadamente 60 dias, obtidos a partir de reprodução controlada realizada no biotério setorial do Laboratório de Bioquímica Experimental (LABIOEX), CCB – UFSC, sob a aprovação do Comitê

de Ética no Uso de Animais (CEUA), da UFSC (Protocolo: PP00784). Tais animais foram pesados e mantidos em gaiolas plásticas sob condições controladas (ciclo claro-escuro de 12h, temperatura 25 ± 2 °C), recebendo ração comercial autoclavada e água *ad libitum*.

4.11.2 Inibição do crescimento tumoral do Tumor Ascítico de Ehrlich

Os camundongos Balb/c foram distribuídos em diferentes grupos experimentais (n= 12) e tratados (via intraperitoneal - i.p.) com 50 μ L de: I) solução de NaCl 0,9% para o controle negativo; II) 20 mg/kg de peso do animal de ABZ e III) 2,5 mg/kg de peso do animal de MTX como controle positivo. O ABZ e MTX foram solubilizados em DMSO (1%) e salina.

O cálculo da dose do ABZ levou em consideração duas correções: I) conversão de dose entre animal e humano, usando a fórmula: $\text{Dose}_h \text{ (mg/kg)} = \text{dose}_c \text{ (mg/kg)} \times \text{Km}_c / \text{Km}_h$, onde h denota em humano e c em camundongo, com valores de $\text{Km}_c = 3$ e $\text{Km}_h = 37$ (REAGAN-SHAW; NIHAL; AHMAD, 2008); II) parâmetros de farmacocinética do ABZ em camundongos (absorção de 20-30%) e humanos (absorção de 1-5%), com base nos valores da média da absorção, os humanos apresentam uma taxa de absorção 8,33 vezes inferior aos camundogos (DAYAN, 2003). Com base nessas informações o valor da dose usada nos camundogos correspondeu a uma dose_h de 13,51 mg/kg.

As células (5×10^6) do tumor ascítico de Ehrlich (TAE) foram inoculadas (i.p.) no peritônio dos camundongos em condições assépticas. O dia da inoculação do tumor foi considerado dia zero. O tratamento dos animais iniciou 24h após a inoculação das células do TAE, durante 9 dias consecutivos.

No décimo dia, seis animais de cada grupo foram anestesiados e sacrificados por deslocamento cervical, sendo retirado o líquido ascítico para a realização das análises dos parâmetros de estresse oxidativo. Ainda, foi avaliada a inibição do crescimento tumoral através da avaliação morfológica da variação da medida da circunferência abdominal (KVICINSKI et al., 2008).

4.11.3 Sobrevida dos animais inoculados com TAE

Após o décimo dia, seis animais de cada grupo foram mantidos para avaliar o tempo de sobrevida. A análise deste parâmetro foi feita

diariamente apenas com o conjunto dos animais que morreram durante o curso do experimento (até 30 dias consecutivos após a inoculação do TAE). Para a análise foi utilizado a curva de Kaplan-Meier, que é importante para a estimativa de sobrevivência (não-paramétrica para a função de confiabilidade), com base na contagem da população e da sobrevivência. Isto foi importante para determinar se o tratamento com ABZ teve um melhor desempenho do que o grupo controle.

Nesse estudo foram avaliadas as taxas de sobrevivência dos animais submetidos ao tratamento com ABZ ou MTX. O resultado obtido foi binário-sobrevivência ou morte do animal e o objetivo foi estimar o intervalo de tempo que os animais sobreviveram com o tratamento com ABZ ou MTX, em relação ao controle negativo. Essa análise foi tomada como base para a construção do gráfico de sobrevivência de Kaplan-Meier.

A análise do tempo de sobrevida também incluiu a média do tempo de sobrevivência (MST), a porcentagem de aumento da vida útil (% ILS) e a porcentagem do MTS do grupo tratado dividido pelo controle [T/C (%)], que foram estimados da seguinte forma (BATISTA et al., 2013):

$$\text{MST} = (\text{1}^{\circ} \text{ ocorrência de morte} + \text{última ocorrência de morte})/2$$

$$\% \text{ ILS} = [(\text{MST}_{\text{tratamento}}/\text{MST}_{\text{controle}}) - 1] \times 100$$

$$\text{T/C (\%)} = (\text{MST}_{\text{tratamento}}/\text{MST}_{\text{controle}}) \times 100$$

4.12 AVALIAÇÃO DOS INDICADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO E DEFESAS ANTIOXIDANTES EM CÉLULAS DO TAE

O líquido ascítico, coletado 24h após o último tratamento, foi centrifugado (5.000 x g por 5 min) e o sobrenadante foi usado para as análises.

As amostras foram preparadas da seguinte forma: para as análises de lipoperoxidação por TBARS, proteína carbonilada (PC) e enzimas antioxidantes (SOD, CAT e GR), o líquido ascítico foi diluído (1:5 v/v) em tampão (pH 7,4) contendo fosfato de sódio (100 mM), NaCl (150 mM) e Triton X-100 (0,1%). Para a análise de GSH, o líquido ascítico foi precipitado em ácido tricloroacético (TCA 12%, 1:5 v/v). O total de proteína foi determinado usando a metodologia de

Lowry et al. (1951) para normatizar os valores de acordo com o conteúdo proteico.

As mensurações dos comprimentos de onda de cada ensaio foram realizadas no multileitor de placas (TECAN Infinity M200), usando placas de 96 poços e para o ensaio de CAT foi usado placas de 96 poços UV-Vis.

4.12.1 Medida da lipoperoxidação pelo TBARS

A avaliação da peroxidação lipídica endógena foi realizada conforme o método Bird e Draper (1984). As amostras foram precipitadas com TCA 12% e misturadas com tampão (60 mM de Tris-HCl e 0,1 mM de ácido dietilenotriaminopenta acético -DPTA, pH 7,4) e TBA (0,73%). Depois desse procedimento, ocorreu uma incubação (100 °C, 1h). Posteriormente, as amostras foram incubadas em banho de gelo (10 min) e, após essa etapa, houve a centrifugação (5.000 x g, 5 min). As amostras foram mensuradas espectrofotometricamente em 535 nm, e os valores foram expressos em conteúdo de TBARS (nmol/mg proteína).

4.12.2 Determinação do conteúdo de Proteína Carbonilada

A PC foi determinada pelo método descrito por Levine et al. (1990). As proteínas solúveis na amostra reagiram com o 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH, 10 mM) em solução de ácido clorídrico (HCl, 2 M) por 1h (temperatura ambiente, sob agitação e ao abrigo da luz). Posteriormente, houve precipitação com TCA 20%, seguido de agitação, banho de gelo (10 min) e centrifugação (10.000 x g por 5 min).

O *pellet* foi lavado três vezes com uma solução contendo etanol: acetato de etila (1:1, v/v) seguido de centrifugação (10.000 x g for 5 min). Depois, as proteínas foram solubilizadas com guanidina (6 M) em solução de fosfato de potássio monobásico (KH₂PO₄; 20 mM), seguido de incubação em banho-maria a 37 °C com agitação contínua por 60 min, e foram finalmente centrifugadas (10.000 x g for 5 min). O conteúdo de proteínas carboniladas foi mensurado, em um comprimento de onda específico de 360 nm, e os valores foram expressos em nmol/mg proteína.

4.12.3 Determinação do conteúdo de tióis não-proteicos

O conteúdo de GSH foi analisado pela determinação dos tióis não protéicos (NP-SH). Apesar da cisteína, da γ -glutamilcisteína, homocisteína e da coenzima A, fazerem parte dos NP-SH, a GSH é tiol mais abundante na célula (CHEN et al., 2008). O experimento foi realizado usando o sobrenadante das amostras precipitadas em TCA 12%, tampão fosfato de sódio (0,2 M, pH 8,0) e ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB; 2,5 mM) diluído em citrato de sódio 1%. Para o branco, a amostra foi substituída por TCA 12% em água destilada (3:2, v/v). A concentração de ânion tiolato (TNB), de cor amarela, foi mensurada espectrofotometricamente a 412 nm durante 3 min, e os valores foram expressos em conteúdo de NP-SH ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ proteína) (BEUTLER et al., 1963).

4.12.4 Avaliação da atividade da Glutaciona Redutase

A análise da enzima GR foi determinada pelo método de Carlberg, Sahlman e Mannervik (1985), o qual avalia a taxa de oxidação do NADPH em 340 nm, devido à formação da GSH, a partir do GSSG, pela ação da GR presente na amostra. A amostra foi misturada num meio de reação contendo tampão fosfato (100 mM, pH 7,0), NADPH (0,2 mM), glutaciona oxidada (1 mM) e ácido dietileno-triaminopentaacético (DPTA, 5 mM, pH 7,0). Em seguida, foi realizada uma leitura cinética a 340 nm durante 3 min (18 ciclos/20s). A atividade enzimática foi expressa como $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ proteína.

4.12.5 Avaliação da atividade da Superóxido Dismutase

A atividade da enzima SOD total foi determinada em homogenatos de acordo com o método proposto por Misra e Fridovich (1972) e modificado por Boveris et al. (1983), o qual se baseia na auto-oxidação da adrenalina (mudança de pH de 2,0 para 10,0), levando à formação de um cromóforo róseo, mensurável espectrofotometricamente em 480 nm. A enzima presente na amostra retarda a formação do cromóforo. Dessa forma, foi feita uma curva de concentração de amostra em tampão glicina (50 mM, pH 10,2). Após uma primeira leitura em 480 nm, para obtenção do branco de cada amostra, foi adicionado $5\mu\text{L}$ de uma solução (pH 2,0) constituída por adrenalina (60 mM), água e HCl (PA).

O monitoramento das absorbâncias foi feito em um intervalo de 10 em 10 segundos durante 10 minutos. A unidade de SOD foi definida como o conteúdo de enzima capaz de inibir a velocidade de oxidação da adrenalina em 50%, e os resultados foram expressos como USOD/mg proteína.

4.12.6 Avaliação da atividade da Catalase

A análise da enzima CAT foi quantificada pela medida da velocidade de decomposição de uma solução fresca de H₂O₂ (30%, 10 mM de H₂O₂ dissolvido em 50 mM de tampão fosfato, pH 7,0) a 240 nm (AEBI, 1984). Essa atividade foi mensurada pela variação da densidade ótica em cada 30 segundos durante 3 min. Os resultados foram expressos como mmol/min/mg proteína.

4.13 AVALIAÇÃO DA FRAGMENTAÇÃO DO DNA DE CÉLULAS DO TAE

A avaliação da fragmentação do DNA foi efetuada mediante o teste Cometa, proposto por Singh et al. (1988), com adaptações. Para tanto, após 24h do último tratamento, as células de TAE, tratadas com ABZ, MTX, bem como o grupo controle negativo, foram centrifugadas (1.000 x g; 10 min), com posterior remoção do sobrenadante e ressuspensão em tampão PBS (0,2 M, pH 7,4).

Uma alíquota de células foi transferida para um eppendorf, ressuspensa em PBS e misturada com agarose de baixo ponto de fusão (0,75%). Essa mistura foi colocada sobre uma lâmina de microscópio pré-coberta com agarose 1,5% e depois de ficarem mergulhadas em solução de lise (NaCl 2,5 M; EDTA 100 mM; TRIS 10 mM; Triton X-100 1%; lauril sarcosinato de sódio 1%; pH 10,0), a 4 °C por 2h, e foram submetidas à eletroforese alcalina (NaOH 10 N; EDTA 200 mM; pH 13,0) por 20 min a 300 mA e 25 V.

Todos os procedimentos acima mencionados foram conduzidos ao abrigo da luz para prevenir danos adicionais ao DNA. Posteriormente, as lâminas foram lavadas com tampão de neutralização (TRIS 0,4 M; pH 7,4), fixadas (ácido tricloroacético 15%, sulfato de zinco 5% e glicerol 5%), coradas com EtBr (0,25 mg/mL) e observadas usando o microscópio de fluorescência (Olympus – Bx41).

As células foram selecionadas e contadas, sendo 100 células por lâmina para cada concentração dos tratamentos testados. A seleção das células ocorreu de acordo com classificação (classes 1-4) que levou em

consideração o tamanho da cauda, indicativo de fragmentação. Cada núcleo recebeu um valor arbitrário entre 0 e 4 (0: nenhum dano; 4: máximo dano) (ROSS et al., 1995). Os resultados foram expressos como Índice de Dano (escore de 0-400), que foi calculado da seguinte forma (BURLINSON et al., 2007):

$$\text{Índice de Dano} = \text{células sem danos (número de células} \times 0) + \text{células com danos 1 (número de células} \times 1) + \text{células com danos 2 (número de células} \times 2) + \text{células com danos 3 (número de células} \times 3) + \text{células com danos 4 (número de células} \times 4).$$

4.14 ANÁLISE DO TIPO DE MORTE DAS CÉLULAS DO TAE

A análise do tipo morte celular foi realizada usando a metodologia de coloração dos núcleos com EtBr e laranja de acridina (AO) de acordo com McGahon et. al. (1995). Essa metodologia permite diferenciar células viáveis de células que estão em processo de morte celular, seja por apoptose ou necrose, tendo como base os parâmetros de alterações morfológicas no núcleo e citoplasma das células.

Uma alíquota do TAE foi coletada e centrifugada durante 10 min a 1.000 x g. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em solução salina 0,9%. A solução de células (v/v 5:7) foi colocada em tubo eppendorf e a esta solução foi adicionada a solução corante (1:1) de EtBr (v/v 1:7, 0,25 mM) e AO (v/v 1:7, 0,4 mM) e 10 µL desse preparo foram colocados em uma lâmina microscópica, e após, foi adicionada a lamínula.

As lâminas foram observadas no microscópio de fluorescência (Microscópio Olympus, Bx41) e fotografadas. Os resultados foram expressos em percentual de células viáveis, apoptóticas e necróticas, através da contagem de um total de 300 células por lâmina.

4.15 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS γ -H2AX, P53, BAX E BCL-xL

As células do TAE após 2h do último tratamento (com ABZ, MTX ou salina) foram centrifugadas (5.000 x g por 5 min) e o sobrenadante foi descartado, seguido de ressuspensão com o tampão de lise RIPA (Tris-Cl 25 mM, NaCl 150 mM, NP40 1%, desoxicolato de sódio 0,25%, fluoreto de fenilmetilsulfonil 1 mM, pH 7,4) suplementado com um coquetel inibidor de proteases (1%) e inibidor de fosfatases (3%) sob vigorosa agitação no vórtex.

A concentração de proteínas presente em cada amostra foi determinada pelo método de Bradford, utilizando as instruções do fabricante kit de determinação de proteínas (BioRad). Posteriormente, as amostras foram desnaturadas em tampão Laemmli (Tris-Cl 60 mM, dodecil sulfato de sódio 2%, glicerol 10%, β -mercaptoetanol 5%, azul de bromofenol 0,01%, pH 6,8).

Quantidades iguais de proteínas (30 μ g) provenientes dos homogenatos das células foram submetidas à eletroforese (60 V por 1h e depois 100 V por 1h) em géis de poliacrilamida (SDS-PAGE). Posteriormente, as proteínas foram separadas e transferidas para membranas de nitrocelulose por eletrotransferência (100 V por 1h).

Na sequência, estas membranas foram bloqueadas com leite em pó desnatado (5%) dissolvido em solução TTBS (0,24% de Tris, 0,8% de NaCl e 1% de Tween 20), lavadas com solução TTBS e incubadas *overnight* com os anticorpos primários nas diluições indicadas pelos fabricantes dos mesmos. Transcorrida esta incubação, as membranas foram lavadas e incubadas com os anticorpos secundários conjugados com peroxidase nas diluições indicadas pelos respectivos fabricantes.

A imunodeteção das bandas das proteínas analisadas foi realizada utilizando o fotodocumentador ChemiDoc MP (Bio-Rad) e um kit de detecção de quimioluminescência - ECL (Millipore, EUA) para anticorpos secundários acoplados a HRP. A análise foi feita usando o *Image Lab Software* da Bio-Rad. Os anticorpos primários e secundários utilizados, assim como sua concentração, estão listados no quadro 7.

4.16 ANÁLISE DO CICLO CELULAR

4.16.1 Avaliação do ciclo celular das células do TAE

A avaliação de modificações no ciclo celular ocasionadas pelo tratamento dos animais com ABZ foi realizada com o kit de solução contendo iodeto de propídio (PI)/RNAse (Immunostep), seguindo as instruções do fabricante. Uma alíquota do TAE contendo 5×10^5 células foi coletada e centrifugada a 1.000 x g por 10 min. Logo após a centrifugação, foi retirado o sobrenadante e as células ressuspensas com 250 μ L de PBS.

Uma alíquota de 200 μ L foi separada e novamente centrifugada a 1.000 x g por 10 min. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e adicionado 200 μ L de etanol 70% refrigerado, lentamente sob agitação em vórtex. As amostras foram acondicionadas a -20 °C por 24 h. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 1.000 x g por

10 min, retirado o etanol 70%, adicionado 1 mL de PBS e novamente centrifugadas a $1.000 \times g$ por 10 min. Após a centrifugação, o PBS foi retirado e adicionados 200 μL de solução contendo PI e RNase. As amostras foram analisadas em Citômetro de Fluxo FACSCanto II (BD).

Os dados foram analisados através do *Flowing Software 2.5*, a partir do qual foi determinada a porcentagem de células agrupadas em cada fase do ciclo celular.

4.16.2 Avaliação do ciclo celular das células do linfoma DDT

A avaliação de modificações no ciclo celular e a presença de aneuploidias ocasionadas pelo tratamento com ABZ na linhagem celular DDT foi realizada através do tratamento dessas células com RNase e posterior marcação com PI.

Para a análise do ciclo celular, as células DDT (5×10^5 células) foram plaqueadas e tratadas com ABZ, EtBr ou meio contendo 1% de DMSO por 24h, e posteriormente foram coletadas e fixadas em banho de gelo com etanol refrigerado, em concentração final de 70% de etanol. As amostras foram acondicionadas a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ por 24h. Posteriormente, as amostras foram tratadas com RNase e ressuspensas em PBS contendo PI, e os dados mensurados através do Citômetro de Fluxo FACScalibur (BD).

Os resultados foram analisados usando o programa *FlowJo software versão x7.0*, a partir do qual foi determinada a porcentagem de células agrupadas em cada fase do ciclo celular (WIT et al., 2015).

4.17 INVESTIGAÇÃO DO RNA DE CÉLULAS DO LINFOMA DDT POR SEQUENCIAMENTO

As células de linfoma da linhagem DDT (10^7 células/placa) foram plaqueadas em placas de petri (10 cm) e tratadas com ABZ (0,4 μM), EtBr (0,4 μM), ou somente com o controle do veículo (1% de DMSO) por 12h. Posteriormente, as células foram colhidas e lisadas com TRIZol. Em seguida, houve a adição de clorofórmio e o material foi agitado, a formando duas fases separadas, uma fase aquosa (contendo o RNA) em cima e uma fase TRIZol(fenol) em baixo. O RNA separado foi precipitado com isopropanol e no final foi lavado com etanol. O RNA total extraído foi utilizado para análise de sequenciamento de RNA (RNA-Seq). Esse procedimento foi repetido a fim de gerar três replicatas biológicas independentes.

O preparo das amostras para sequenciamento (TruSeq RNA) e o subsequente preparo de bibliotecas indexadas foram realizados de acordo com o protocolo do fabricante (Illumina). As análises de qualidade e os testes estatísticos usados foram o R packages limma, edgeR e GoSeq (ROBINSON et al. 2010; YOUNG et al. 2010). Os genes foram considerados diferencialmente quando o FDR <0,001, tendo como parâmetro os valores de \log_2FC , \log_2CPM e p-value.

4.18 ANÁLISE DA DINÂMICA DOS MICROTÚBULOS

A análise da dinâmica dos microtúbulos foi realizada para avaliar o perfil genotóxico do tratamento com ABZ na estrutura morfológica de células HeLa. Células HeLa ($7,5 \times 10^4$ células/poço) foram semeadas em placas de 48 poços, e após aderência foram tratadas com ABZ (0,4, 0,8 e 1,6 μM), Taxol (1 μM), Nocodazol (0,825 μM) ou Noscapina (25 μM) por 12h, e DMSO foi usado como controle.

As células foram fixadas por 20 min com uma solução em PBS contendo 4% de formaldeído e 0,5% de Triton X. Após esse procedimento, as células foram incubadas *overnight* a 4°C com anticorpos anti- α -tubulina e anti-crest, seguido de 2h de incubação com anticorpo secundário (Quadro 8), e DAPI em temperatura ambiente. Todos os anticorpos foram diluídos em PBS contendo 0,2% de Tween.

As imagens foram adquiridas usando um microscópio de deconvolução Deltavision (Applied Precision) com ampliação de 60x (NA 1,42) em objetiva (Olympus) com óleo de imersão. Os programas *Softworx* (Applied Precision), *ImageJ*, *Adobe Photoshop* e *Illustrator CS6* foram usados para processar as imagens capturadas.

4.19 INVESTIGAÇÃO DA PERDA DE HETEROZIGOSIDADE

A análise da LOH foi realizada usando células MLH1 com apenas um alelo funcional (MLH1^{wf}). A seleção das colônias resistentes ocorreu usando a 6-tioguanina (6-TG, 0,4 μM). A 6-TG é muito tóxica para essa linhagem celular, entretanto perde seu efeito em células mutadas que perdem seu único alelo funcional (MLH1^{-/-}). Dessa forma, o crescimento de colônias é um indicativo da promoção de LOH pelos diversos tratamentos (DE WIND et al., 1998).

As células MLH1^{wf/-} (3×10^6 células/placa de petri de 10 cm) foram plaqueadas. Após a aderência celular, ocorreu o tratamento com diferentes concentrações de ABZ (0,1 e 0,2 μM) e reversina (0,2

μM , potente inibidor do MPS1) durante 24h. O meio de cultivo celular foi usado como controle negativo. Depois, as placas foram lavadas com PBS para remover os tratamentos e novo meio foi adicionado. A seleção com 6-TG iniciou 3 dias após o tratamento e a cada 4 dias as placas recebiam meio fresco contendo 6-TG. As colônias formadas depois de 15 dias foram contadas e fotografadas.

4.20 ANÁLISE ESTATÍSTICA

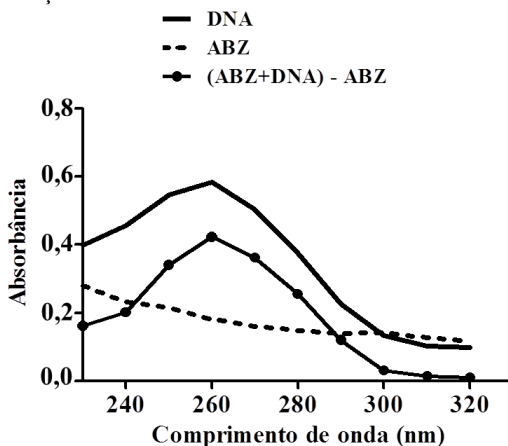
Os ensaios *in vitro* foram feitos em triplicata, sendo os resultados expressos a partir da média \pm E.P.M. Os ensaios *in vivo* tiveram um $n=12$ por grupo ($n=6$ para ensaios biológicos, $n=6$ para sobrevivência). Os dados foram expressos em média \pm E.P.M ou porcentagem. Os dados foram analisados pelo teste ANOVA seguido do teste Bonferroni. As comparações foram feitas usando o *software GraphPad Prism* versão 5.01, e valores menores do que 5% ($p < 0,05$) foram considerados estaticamente significativos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Interação do ABZ com o CT-DNA

No ensaio de interação com o DNA foi observado que o ABZ interagiu diretamente com essa molécula e alterou a absorvância desse ácido nucleico em comprimentos de ondas definidos, causando um efeito hipocrômico (Figura 12).

Figura 12 - Interação do ABZ com o DNA.



Espectrometria UV da interação do ABZ (10 μ M) com o CT-DNA (40 μ M). Leitura da absorvância nos comprimentos de onda entre 230 e 320 nm. **Fonte:** Do autor.

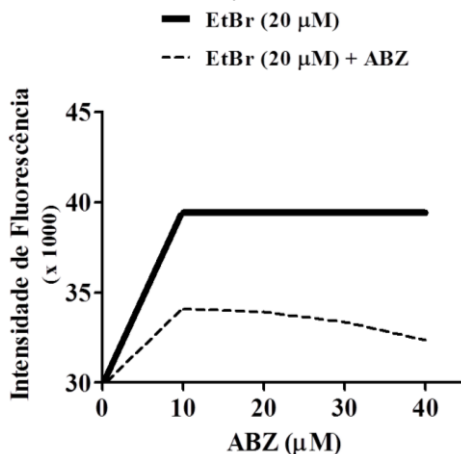
O resultado obtido foi significativo, visto que o DNA é um importante alvo de vários fármacos antitumorais e potenciais compostos antineoplásicos, mas também compostos mutagênicos (KOŽURKOVÁ et al. 2008; PLOŠNIK; VRAČKO; DOLENC, 2016). Isso porque moléculas que interagem com o DNA podem causar danos em células tumorais, bloqueando a divisão das mesmas e conduzindo à morte celular (SHAHABADI; MOHAMMADI, 2012).

Nesse sentido, algumas técnicas foram desenvolvidas para analisar as interações entre compostos e DNA, no entanto a espectroscopia que abrange a avaliação das faixas de comprimento de onda do ultravioleta (UV) ao visível é uma das técnicas mais úteis no estudo de ligações de fármacos com o DNA (SHAHABADI; MOHAMMADI, 2012).

Os compostos que intercalam o DNA geralmente causam hipocromismo e deslocamento batocrômico (também conhecido como deslocamento para o vermelho ou “*redshift*”). O hipocromismo geralmente é consistente com as forças da interação por intercalação, pois essa ligação envolve interações de empilhamento entre um cromóforo aromático e os pares de bases de DNA. Em outras palavras, a ocorrência do hipocromismo se dá pelas forças de interação eletrônica que diminuem à medida que o cubo da distância entre o cromóforo e as bases do DNA diminui. Além disso, o deslocamento para o vermelho, causado pela diminuição do nível de energia da transição de elétrons, contribui para a ocorrência do efeito hipocrômico (SIRAJUDDIN; ALI; BADSHAH, 2013).

De acordo com o efeito hipocrômico observado, indicativo de interação por intercalação, foi avaliado o potencial de intercalação do ABZ. Considerando a possibilidade que se esse composto fosse um agente intercalante de DNA, uma característica prevista seria a competição do ABZ com o EtBr, um agente intercalante de DNA bem descrito na literatura (SHAHABADI; MOHAMMADI, 2012; SIRAJUDDIN; ALI; BADSHAH, 2013). E, de fato, foi observado que o ABZ compete eficientemente com o EtBr, diminuindo a fluorescência específica deste intercalante de DNA (Figura 13).

Figura 13 - Efeito do ABZ na intercalação com o DNA.



Intensidade de fluorescência do CT-DNA (10 µM) corado com EtBr (20 µM) e tratado com ABZ (10, 20, 30 e 40 µM). A intensidade de fluorescência foi mensurada em comprimentos de onda excitação/emissão de 492 nm e 620 nm, respectivamente. **Fonte:** Do autor.

Os resultados obtidos indicaram que o ABZ interagiu com o DNA, aparentemente por intercalação. Apesar das interações não covalentes com o DNA (intercalação, ligação nos sulcos do DNA e interações eletrostáticas na parte externa da hélice de DNA), serem geralmente, consideradas menos citotóxicas do que as interações covalentes, o impacto das interações não covalentes incluem mudanças conformacionais que interferem na interação entre o DNA e proteínas, como as topoisomerases, assim como efeitos no DNAm e na função mitocondrial (SIRAJUDDIN; ALI; BADSHAH, 2013).

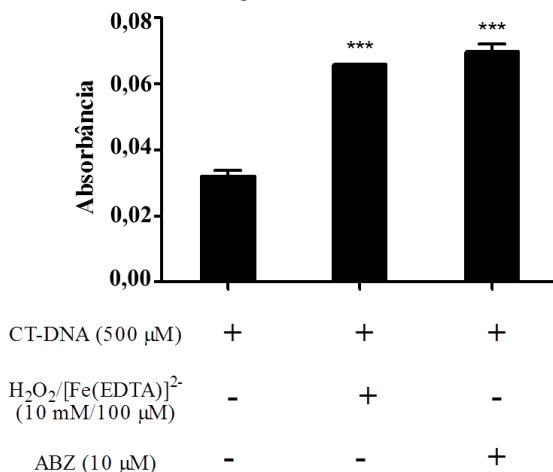
Este tipo de ligação é reversível e pode modificar a conformação e a tensão de torção do DNA, interromper a interação entre proteína e DNA e potencialmente ocasionar quebra, e todos esses eventos implicam em grandes efeitos na expressão gênica (SIRAJUDDIN; ALI; BADSHAH, 2013).

Nesse contexto, a doxorrubicina, um quimioterápico bastante usado na terapia do câncer e estudado, não tem seu mecanismo de ação completamente elucidado. Entretanto, estudos realizados por Ourique et al. (2015) revelaram que a doxorrubicina, assim como as quinonas, foram capazes de interagir com o DNA e de promover intercalação, induzida pela redução da fluorescência do EtBr. Assim, a intercalação parece ser um dos principais modos de ação da doxorrubicina, pois essa interação não covalente com o DNA promove mudanças conformacionais que interferem na interação entre esse ácido nucleico e as topoisomerases II, promovendo danos no DNA e resultando em morte celular (THORN et al., 2011; PÉREZ-ARNAIZ et al., 2014).

Sendo assim, o resultado do ABZ como composto intercalante de DNA é promissor, uma vez que a intercalação é o modo de interação não covalente com o DNA mais importante, pois está relacionado com a atividade antitumoral (SHAHABADI; MOHAMMADI, 2012).

5.2 Clivagem oxidativa do CT-DNA

Na avaliação do dano ao DNA foi observado que o CT-DNA exposto ao ABZ sofreu clivagem oxidativa (Figura 14). O tratamento com ABZ teve uma ação direta no DNA e foi capaz de aumentar o conteúdo de EROs. Isso gerou a oxidação do C-4 da desoxirribose, causando a quebra oxidativa do DNA.

Figura 14 - Efeito do ABZ na clivagem oxidativa.

Medida da absorbância de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em CT-DNA (500 µM) tratado com ABZ (10 µM). Controle Negativo: Tampão fosfato. Controle Positivo: [Fe(EDTA)]²⁻/H₂O₂. Resultados representados como média ± E.P.M., n=3. Valores com diferença significativa em ***p < 0,001, comparado ao grupo controle. **Fonte:** Do autor.

Outros compostos, como as quinonas, que apresentam potencial atividade antitumoral, foram capazes de causar clivagem oxidativa no DNA, pois clivaram especificamente o DNA no C-4 da desoxirribose, formando como produto de degradação a base propenal. Assim como o ABZ, esses compostos também promoveram intercalação neste ácido nucleico (OURIQUE et al., 2015). Isso indica que a clivagem oxidativa no DNA pode ter sido devido à intercalação, pois essa interação é capaz de modificar a conformação e a tensão de torção do DNA, potencialmente ocasionando a quebra dessa biomolécula (SIRAJUDDIN; ALI; BADSHAH, 2013).

O resultado encontrado foi muito importante, uma vez que, alguns estudos relatam a relevância do dano oxidativo do DNA na indução da morte celular programada. Por outro lado, essa estratégia é empregada na interação entre as células tumorais e quimioterápicos para conduzir ao dano no DNA da célula tumoral, seguido de indução de morte celular (BISCHOFF; HOFFMANN, 2002).

Em células com metabolismo aeróbico, a geração de EROs ocorre espontaneamente e randomicamente através de colisões ocasionais com de elétrons como produto da atividade mitocondrial. Entretanto, quando

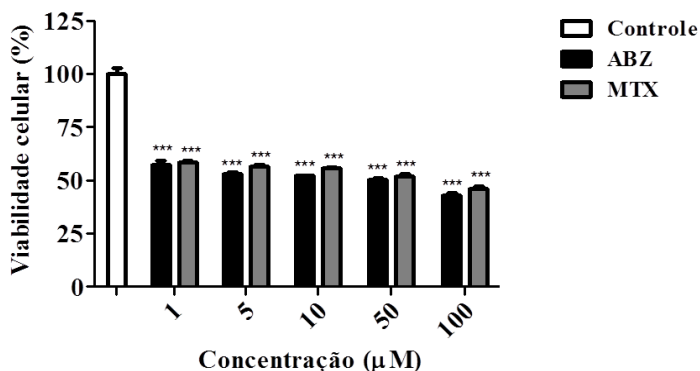
essa geração não é compensada, as EROs podem causar danos severos a macromoléculas, em especial o DNA. Em resposta às alterações celulares promovidas pelo dano oxidativo no DNA ocorre a ativação de vias de reparo. Essas vias são responsáveis pela ativação dos pontos de checagem do DNA. Estes por sua vez, param o ciclo celular e previnem a replicação de células com defeitos e danos no DNA (BARZILAI; YAMAMOTO, 2004).

Dessa forma, compostos que causam dano ao DNA podem proporcionar ferramentas terapêuticas para o tratamento do câncer (HOSOYA; MIYAGAWA, 2014; LORD; ASHWORTH, 2012).

5.3 Citotoxicidade do ABZ

A análise dos resultados obtidos mostrou que o tratamento com ABZ ou MTX interferiu na integridade mitocondrial e consequentemente, a viabilidade celular foi inibida (Figura 15). O valor do EC_{50} (relativo a 10^4 células/poço, calculado após 24h de tratamento) foi de $44,9 \mu\text{M}$ para o ABZ e $45,7 \mu\text{M}$ para o MTX, revelando uma elevada citotoxicidade para as células MCF-7, causada por estes tratamentos.

Figura 15 - Citotoxicidade do tratamento com ABZ e MTX através da determinação da viabilidade celular em células MCF-7.



Valores obtidos pelo ensaio de redução do MTT após 24h de tratamento (1-100 μM). Resultados representados como média de três experimentos independentes. Valores significativos em *** $p < 0,001$, comparado ao grupo controle. **Fonte:** Do autor.

Os resultados mostraram que os tratamentos com ABZ e MTX reduziram a viabilidade celular da linhagem MCF-7, sem apresentar efeito dose dependente. Além disso, foi observado que a toxicidade promovida pelos tratamentos foi similar.

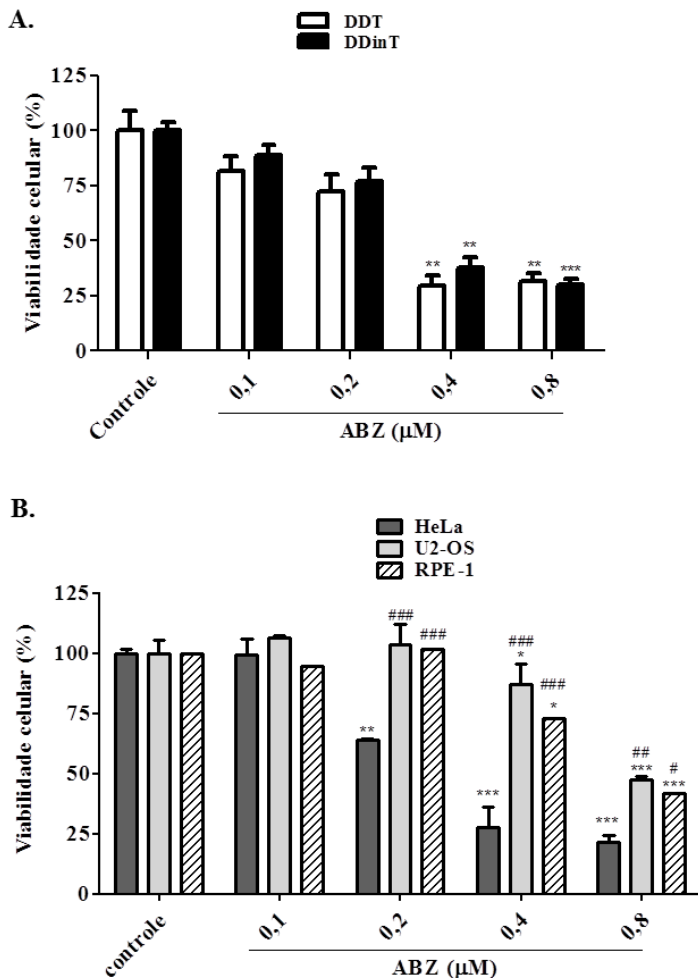
De forma similar ao ABZ, outros benzimidazóis como o mebendazol (MBZ) e flubendazol (FLU), também usados como antihelmínticos, apresentam efeitos na inibição da proliferação celular de vários tipos de células tumorais.

O MBZ mostrou efeito na inibição de diversos tipos de neoplasias, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, incluindo o câncer de pulmão, de cólon, glioblastoma multiforme humano, melanoma e adrenocortical metastático (BAI et al., 2011; DOBROSOTSKAYA et al., 2011; DOUDICAN et al., 2013; NYGREN et al., 2013; SASAKI et al., 2002). Além disso, estudos pré-clínicos do MBZ indicam seu alto potencial de reposicionamento como fármaco antitumoral, pois apresenta ação comprovada contra diversos tipos de câncer (PANTZIARKA et al., 2014).

O FLU apresentou efeito na inibição da proliferação de células de câncer de cólon, de intestino, de mama, leucemia e mieloma (HOU et al., 2015; KRÁLOVÁ et al., 2013; KRÁLOVÁ et al., 2016; SPAGNUOLO et al., 2010).

O efeito do ABZ na permeabilidade de membrana também foi estudado em linhagens celulares murinas de linfomas (DDT e DDinT) e humanas (HeLa, U-2 OS e RPE-1). Os resultados mostraram que esse fármaco foi bastante tóxico, pois pequenas concentrações (0,4 μ M) de ABZ promoveram morte celular nas linhagens DDT e DDinT. Essas linhagens foram equivalentemente sensíveis ao tratamento com ABZ (Figura 16A). As linhagens celulares humanas, transformadas e imortalizadas, também foram hipersensíveis ao tratamento com ABZ (Figura 16B).

Figura 16 - Detecção da citotoxicidade do ABZ através da integridade de membrana das linhagens celulares murinas e humanas.



Avaliação da citotoxicidade do tratamento com ABZ (0,1-0,8 μM) por citometria de fluxo de células marcadas com PI. **A.** Linhagens celulares de linfoma murino (DDT e DDinT). **B.** Linhagens celulares humanas (HeLa, U-2 OS e RPE-1). Resultados representados como média \pm E.P.M., $n=3$. Valores significativos em * $p < 0,1$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$, comparado ao grupo controle. # $p < 0,1$, ## $p < 0,01$ e ### $p < 0,001$ indica diferença estatística entre a linhagem HeLa x U-2 OS ou HeLa x RPE-1. Não foi observado diferença estatística entre as linhagens DDT x DDinT nem entre U-2 OS x RPE-1. **Fonte:** Do autor.

Em geral, a toxicidade promovida pelo tratamento com ABZ foi similar entre as linhagens celulares estudadas, mostrando que mesmo em baixas concentrações (inferiores a 1 μM), as células murinas e humanas foram afetadas e tiveram a sua viabilidade reduzida.

O efeito citotóxico do tratamento do ABZ nas células estudadas (MCF-7, DDT, DDinT, HeLa, U-2 OS e RPE-1), estão de acordo com a literatura (CHU et al., 2009; KHALILZADEH et al., 2007; PATEL et al., 2011; POURGHOLAMI et al., 2001; POURGHOLAMI et al., 2005). A toxicidade celular deste fármaco já foi descrita para outras linhagens celulares cancerosas, como carcinoma hepatocelular, células leucêmicas resistentes aos tratamentos com epotilona e paclitaxel (PTX), carcinoma de ovário resistente ao PTX, melanoma metastático, câncer coloretal (HT-29) e câncer de pulmão (KRÁLOVÁ et al. 2013).

Ainda, os resultados da Figura 16A, além de mostrarem a citotoxicidade celular, tiveram a função de avaliar se a interação do ABZ com o DNA mimetizava o dano ao DNA e bloqueava a replicação. Os resultados mostraram que os linfomas DDT e DDinT foram igualmente sensíveis ao tratamento com ABZ, sugerindo que este fármaco não interferiu significativamente na replicação do DNA. Isso ocorreu, provavelmente, pelo fato do ABZ ser intercalante de DNA. Como os intercaladores interagem não covalentemente com o DNA e são eficientemente removidos durante o desenrolamento do DNA, a exposição do ABZ apenas interferiu na viabilidade celular sem causar estresse replicativo (SIRAJUDDIN; ALI; BADSHAH, 2013).

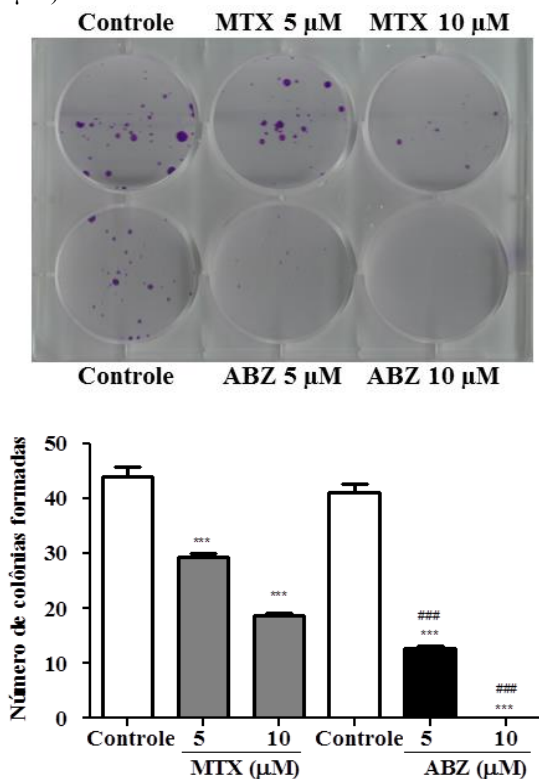
Na determinação da toxicidade do ABZ, avaliada no sistema humano, a pequena diferença no limite de sensibilidade da linhagem celular transformada HeLa (0,4 μM) em relação às linhagens celulares transformada U-2 OS e imortalizada RPE-1 (0,8 μM) provavelmente está relacionada com diferenças na taxa de proliferação celular, que mostra que o tempo de duplicação celular é de 19,0h para HeLa, 29h para U-2 OS e 23,5h para RPE-1 (DALY et al., 2016; KIM et al., 2008; MUSA; KANNAN; MUSTAFA, 2013).

5.4 Inibição da proliferação celular

Os tratamentos com ABZ e MTX em células MCF-7 apresentaram um significativo efeito antiproliferativo e citotóxico, uma vez que foram capazes de inibir eficazmente a formação de colônias (Figura 17). A inibição da formação de colônias após o tratamento com ABZ foi de 67% para a concentração de 5 μM , enquanto que em 10 μM

não foram observadas formação de colônias. Já para o MTX, nas mesmas concentrações, a inibição foi apenas de 36% e 50%, respectivamente, indicando um maior efeito antiproliferativo e citotóxico do ABZ.

Figura 17 - Inibição da proliferação celular após o tratamento com ABZ e MTX (5 e 10 μM).



Ensaio de formação de colônias. Valores expressos como média \pm E.P.M., $n=3$. Valores com diferença significativa em *** $p < 0,001$, comparado ao grupo controle. ### $p < 0,001$ indica diferença estatística entre os tratamentos com ABZ e MTX. **Fonte:** Do autor.

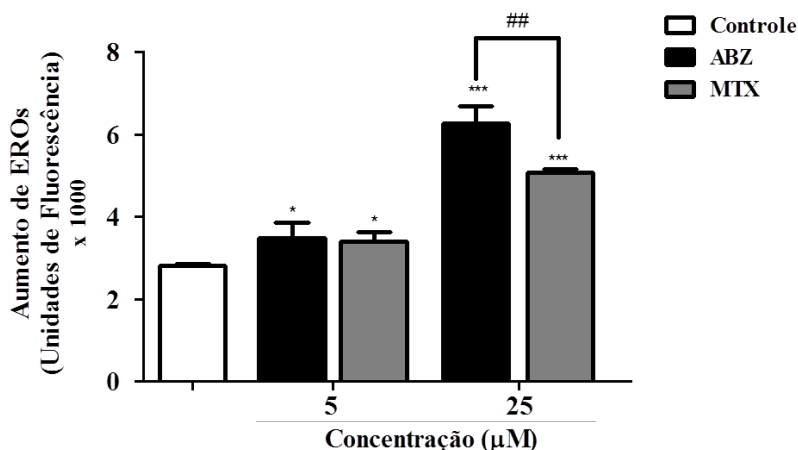
Os dados obtidos foram relevantes, uma vez que esse ensaio, além de indicar uma potencial citotoxicidade, também avalia os efeitos nas células-alvo relacionados com a redução na formação de colônias, que podem estar associados à perda na aderência celular ou à inibição do crescimento celular (LOTAN; LOTAN; RAZ, 1985).

Resultados semelhantes foram encontrados para o complexo ABZ e ciclodextrina, que, além de promover a citotoxicidade em células de câncer de ovário, também foi capaz de inibir (com apenas 1 μM) a formação de colônias (POURGHOLAMI; WANGOO; MORRIS, 2008).

5.5 Geração intracelular de EROs

O conteúdo intracelular de EROs aumentou em células MCF-7 tratadas com ABZ e MTX (Figura 18), em um perfil concentração-dependente.

Figura 18 - Avaliação do conteúdo intracelular de EROs em células MCF-7 após tratamento com ABZ e MTX (5 e 25 μM , por 1h).



Resultados representados como média de três experimentos independentes. Valores expressos como média \pm E.P.M., $n=3$. Valores com diferença significativa em * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$, comparados ao grupo controle. ## $p < 0,01$ indica diferença estatística entre os tratamentos com ABZ e MTX.

Fonte: Do autor.

O aumento de EROs em células MCF-7 promovido pelo tratamento com MTX, já era esperado, pois de acordo com a literatura científica, este quimioterápico apresenta como mecanismo de ação antitumoral secundário, a indução de estresse oxidativo (BABIÁK et al, 1998; HESS; KHASAWNEH, 2015). Entretanto, é importante observar que, na concentração 25 μM , o ABZ e o MTX apresentaram diferença estatística em relação ao potencial na indução de EROs.

Esses dados foram relevantes, uma vez que a produção de EROs está fortemente relacionada com danos em biomoléculas, como o DNA (DHILLON; CHIKARA; REINDL, 2014). Além disso, estudos revelam que a geração de estresse oxidativo pode ser uma importante ferramenta na terapia do câncer, pois leva a uma morte seletiva das células tumorais que, em geral, apresentam menor defesa antioxidante (CALDERON et al., 2002; VERRAX; CALDERON, 2009).

A geração de EROs intracelular devido ao tratamento com ABZ também foi observada em cultura celular de trofozoítos de *Giardia duodenalis*, que, assim como o controle pró-oxidante (H_2O_2), foi capaz de elevar o conteúdo de EROs nesses parasitas quando comparado ao controle não tratado (MARTÍNEZ-ESPINOSA et al., 2015). Os resultados de Martínez-Espinosa et al. (2015) juntamente com os mostrados na figura 18, revelam que a geração EROs *in vitro* pelo ABZ provavelmente está relacionada com a indução da morte celular. Isto seria devido à indução de EROs ser capaz de promover a ativação de Bax, sinalizando a indução da morte celular através da ativação da via intrínseca da apoptose (PORTT et al., 2011; RYTER et al., 2007).

Estudos com quinonas e sua associação ao ácido ascórbico (para potencializar o ciclo redox das quinonas) demonstraram que esses compostos induzem o aumento de EROs intracelulares, resultando no aumento da toxicidade celular associada ao estresse oxidativo, o qual induz vias de sinalização responsáveis pela morte celular (por apoptose ou necrose) ou pela indução de um fenótipo senescente (FELIPE et al., 2013; KVIECINSKI et al., 2012; OURIQUE et al. 2015; VERRAX et al., 2011).

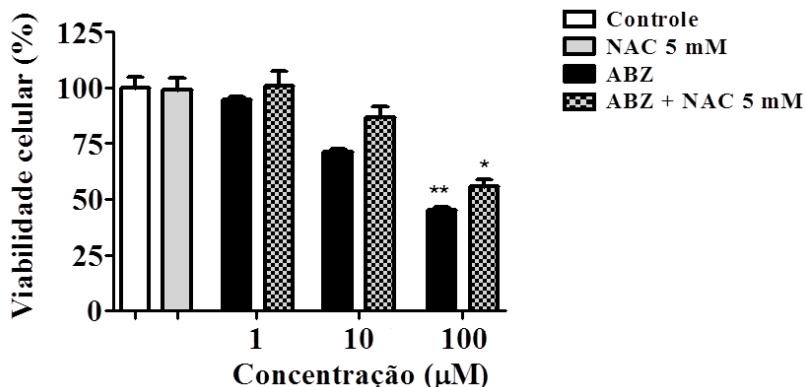
O conjunto desses resultados sugere que o aumento na geração de EROs observado pelos tratamentos com ABZ e MTX, poderia estar envolvido no seu efeito citotóxico sobre células MCF-7, o que levaria à redução da viabilidade dessa linhagem celular.

5.6 Efeito da NAC na citotoxicidade do ABZ

Tendo em vista os dados obtidos com o ensaio de geração EROs, no sentido de confirmar o potencial do ABZ na indução do estresse oxidativo, o presente estudo também avaliou se, em presença de um composto antioxidante, os efeitos observados com o tratamento com ABZ seriam afetados. Dessa forma, foi investigado, em células MCF-7, o efeito do ABZ na citotoxicidade, na geração de EROs e no potencial de membrana mitocondrial em presença de um antioxidante padrão, a N-acetil-L-cisteína (NAC).

Os resultados obtidos mostram que o efeito citotóxico observado em células MCF-7 tratadas com ABZ foi revertido em presença de NAC (Figura 19). Entretanto em altas concentrações de ABZ o NAC não foi capaz de reverter completamente o efeito citotóxico, apresentando assim, apenas um efeito protetor parcial.

Figura 19 - Citotoxicidade do ABZ (1-100 μ M), NAC (5 mM) e associação ABZ + NAC após 24h de tratamento em células MCF-7.



Resultados representados como \pm E.P.M, n=3. Valores com diferença significativa em * p < 0,05 e ** p < 0,01, comparado ao grupo controle. **Fonte:** Do autor.

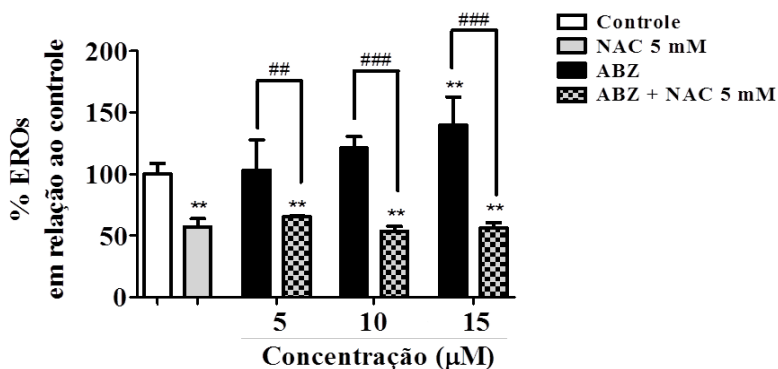
A NAC é um antioxidante capaz de prevenir a apoptose e promover a sobrevivência celular (ZAFARULLAH et al., 2003). Estudos realizados por Xue et al. (2011) revelaram que a NAC foi capaz de prevenir a apoptose em células humanas de queratinócitos (HaCaT) tratadas com nanopartículas de dióxido de titânio (nano-TiO₂), composto que induz estresse oxidativo por aumentar a formação intracelular de EROs e óxido nítrico. Esse estudo também mostrou que o tratamento com nano-TiO₂ reduziu a viabilidade celular de HaCaT, porém, quando tratado em associação com o NAC (5mM), esse composto antioxidante foi capaz de restaurar os níveis basais, revertendo a toxicidade celular promovida pelo tratamento com nano-TiO₂.

Nesse contexto, os resultados obtidos mostrados estão de acordo com essas informações, pois revelaram que a NAC não foi tóxico para as células MCF-7 e ainda foi importante na prevenção da morte celular ocasionada pelo tratamento com ABZ, provavelmente devido à capacidade antioxidante da NAC, por prevenir a apoptose.

5.7 Efeito da NAC na indução de EROs em células tratadas com ABZ

Os resultados obtidos mostraram que após o tratamento das células MCF-7 com ABZ ocorreu a indução da formação de EROs intracelular. No entanto, o tratamento com NAC foi capaz de proteger as células do aumento da geração dessas espécies induzidas pelo tratamento com ABZ (Figura 20).

Figura 20 - Conteúdo intracelular de EROs na linhagem celular MCF-7 tratada com ABZ (5, 10 e 15 μ M), NAC (5 mM) e associação ABZ + NAC, por 4h.



Resultados representados como média \pm E.P.M, n=3. Valores com diferença significativa em ** $p < 0,01$, comparado ao grupo controle. ## $p < 0,01$ e ### $p < 0,001$ indica diferença estatística entre os tratamentos com ABZ e NAC.
Fonte: Do autor.

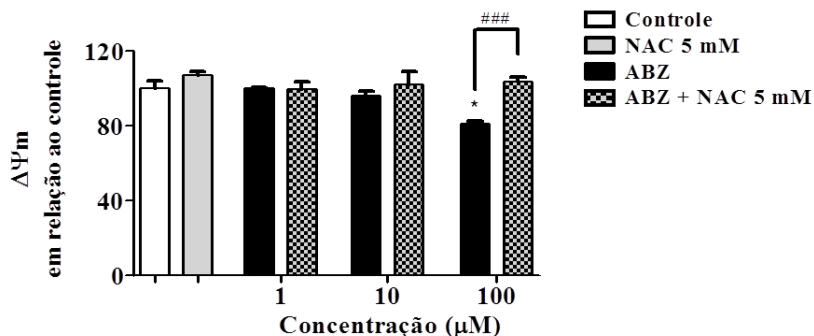
Os resultados da figura 20 foram similares aos resultados de Xue et al. (2011) que mostraram um efeito protetor da NAC, pois este antioxidante preveniu a formação de EROs intracelular em células HaCaT tratadas com nano-TiO(2). Em geral, os resultados de Xue et al. (2011) e da figura 20 indicam o efeito desse antioxidante na prevenção da formação de EROs.

Ainda, os resultados sugerem que EROs fazem parte do mecanismo de morte, mas não de todo, pois o NAC preveniu bastante a indução de EROs intracelular de células tratadas com ABZ, mas apenas preveniu parcialmente a morte celular, sugerindo que existem outros mecanismos associados com a morte celular induzida pelo ABZ.

5.8 Efeito da NAC no potencial de membrana mitocondrial de células tratadas com ABZ

A análise do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) revelou que o tratamento de células MCF-7 com ABZ foi capaz de causar mudanças no $\Delta\Psi_m$ apenas em concentrações elevadas. O tratamento com ABZ na concentração de 100 μM foi capaz de diminuir o $\Delta\Psi_m$ (Figura 21), entretanto a presença de NAC restaurou esse potencial de membrana às condições basais (do controle).

Figura 21 - Potencial de membrana mitocondrial da linhagem celular MCF-7 tratada com ABZ (5, 10 e 15 μM), NAC (5 mM) e associação ABZ + NAC, por 6h.



Resultados representados como média \pm E.P.M, n=3. Valores com diferença significativa em * $p < 0,05$, comparados ao grupo controle. ### $p < 0,001$ indica diferença estatística entre os tratamentos com ABZ e NAC. **Fonte:** Do autor.

A perda do potencial de membrana após o tratamento com ABZ é muito importante, já que esse efeito está envolvido na depleção energética celular com subsequente morte celular (KANNAN; JAIN, 2000).

Resultados similares obtidos por Xue et al. (2011) mostraram que a NAC foi capaz de restaurar o potencial de membrana mitocondrial às condições basais, que estava reduzido em células HaCaT tratadas com nano-TiO₂.

Em geral, os resultados de viabilidade celular, geração de EROs intracelular e potencial de membrana mitocondrial tomados em conjunto indicam que o efeito citotóxico do ABZ seria parcialmente devido à geração de EROs induzida por esse fármaco. Essa geração de EROs poderia estar induzindo nas células MCF-7 a morte celular via apoptose, uma vez que, o potencial de membrana mitocondrial foi reduzido, após

o tratamento com o ABZ. Isso acontece porque os EROs podem ativar Bax que induz apoptose e reduz a viabilidade celular (RYTER et al., 2007; PORTT et al., 2011).

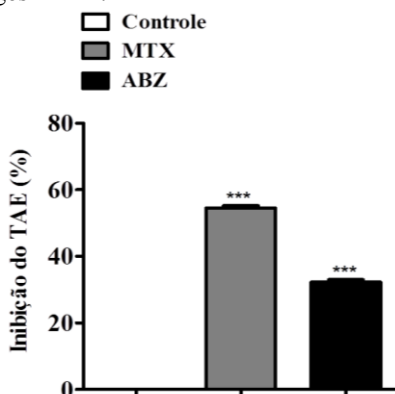
Ainda, esses resultados são fundamentais, levando em consideração que as terapias convencionais (quimioterapia ou radioterapia) podem promover a morte de células tumorais via sinalização redox (DING et al. 2015).

Considerando a importância desse equilíbrio, uma estratégia promissora para a terapia tumoral seria o uso de compostos que interferem na regulação redox intracelular (TRACHOOTHAM; ALEXANDRE; HUANG, 2009). Tal estratégia provavelmente se fundamenta no fato de altos níveis de EROs poderem induzir apoptose e necrose (CALDERON et al., 2002; DING et al. 2015; VERRAX; CALDERON, 2009).

5.9 Inibição do crescimento tumoral em animais implantados com TAE tratados com ABZ e MTX

O ensaio *in vivo* avaliou a atividade antitumoral, usando o modelo do TAE. Os resultados mostraram que o ABZ (20 mg/kg) causou 32% de inibição do crescimento tumoral (Figura 22), enquanto o MTX (2,5 mg/kg) causou 55% de inibição do crescimento tumoral.

Figura 22 - Análise da inibição do crescimento tumoral frente aos tratamentos i.p. com ABZ (20 mg/kg) e MTX (2,5 mg/kg, controle positivo) no modelo do TAE em camundongos *balb-c*.



Valores expressos como média \pm E.P.M, n=6. Valores com diferença significativa em *** $p < 0,001$ em comparação com as células do controle (salina). **Fonte:** Do autor.

Esses resultados ainda mostraram que o ABZ e o MTX, apesar de não promoverem a regressão completa, foram capazes de reduzir significativamente o crescimento tumoral em comparação ao controle negativo.

O efeito observado no tratamento com MTX já era esperado, pois o mecanismo de ação clássico desse fármaco envolve a inibição da dihidrofolato redutase (DHFR), levando à depleção do tetrahidrofolato e inibindo a produção de timidilato. Sendo assim, a ausência de timidina impede a síntese de DNA e, como consequência direta, a proliferação celular é inibida. Além do mecanismo clássico, o MTX também apresenta a indução de estresse oxidativo como um mecanismo alternativo da sua atividade antitumoral (BABIÁK et al, 1998; HESS; KHASAWNEH, 2015).

Outros estudos mostraram a atividade tumoral do ABZ em modelos tumorais de implante xenográfico de câncer colorretal HCT-116 e HT-29 (EHTEDA et al., 2012; POURGHOLAMI et al., 2005). Os dados apresentados na figura 22 e os obtidos por EHTEDA et al. (2012) e POURGHOLAMI et al. (2005) sugerem que o ABZ apresenta uma atividade antitumoral que abrange diferentes tipos de tumores.

5.10 Efeito do ABZ na sobrevida de animais implantados com TAE

O tratamento com MTX e ABZ aumentou a sobrevida dos animais (Figura 23), mostrando que de forma similar, ambos os fármacos, prolongaram a vida dos animais em comparação com o grupo controle. A área sob a curva resultante dos animais do controle foi de 1038 unidades arbitrárias (UA), enquanto que os animais tratados com ABZ e MTX tiveram os valores de 1830 e 2100 UA, respectivamente.

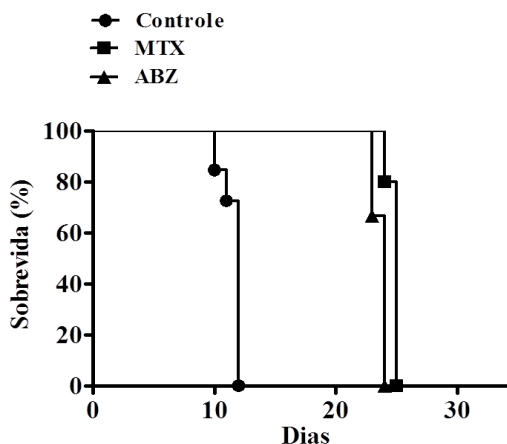
Além do tempo de sobrevida outros parâmetros de sobrevivência foram analisados, como o MST, %ILS e T/C(%). Esta análise revelou que os animais tratados, com ABZ e MTX, em comparação ao grupo controle, aumentaram todos esses parâmetros (Quadro 10).

Quadro 10 – Avaliação de alguns parâmetros de sobrevivência de animais que foram tratados com ABZ (20 mg/kg) e MTX (2,5 mg/kg).

Tratamento	MST	%ILS	T/C (%)
Controle	11,0	0,00	100,00
ABZ	23,5	109,09	209,09
MTX	25,5	131,82	231,82

Fonte: Do autor.

Figura 23 - Aumento do tempo de sobrevida dos camundongos implantados com TAE e tratados com ABZ (20 mg/kg) ou MTX (2,5 mg/kg, controle positivo).



Análise diária do número de animais mortos, até 30 dias após a inoculação do TAE, n=6. **Fonte:** Do autor.

Outros estudos com o ABZ mostraram que o tempo de sobrevida de animais foi prolongado após o tratamento com formulações de complexos contendo esse fármaco, indicando a eficácia do mesmo como antitumoral (EHTEDA et al., 2012; HETTIARACHCHI et al., 2016). Estudos prévios, usando o mesmo modelo experimental, revelaram o aumento na sobrevida de animais tratados com doxorrubicina e outros compostos com efeito antitumoral promissores, como quinonas e extratos de plantas (FELIPE et al., 2013; GRINEVICIUS et al, 2016; OURIQUE et al. 2015).

Os resultados mostraram que os valores de %ILS e T/C (%) estavam aumentados em animais que foram tratados com ABZ (109,1% e 209,1%, respectivamente) e MTX (131,8% e 231,8%, respectivamente). De acordo com Orsolíc, Kosalec e Basic (2005), os critérios da NCI revelam que as percentagens acima de 25% para o ILS e acima de 125% para o T/C são indicativas de que o fármaco apresenta uma atividade antitumoral significativa. Nesse contexto, os resultados apresentados confirmam que o ABZ apresenta atividade antitumoral.

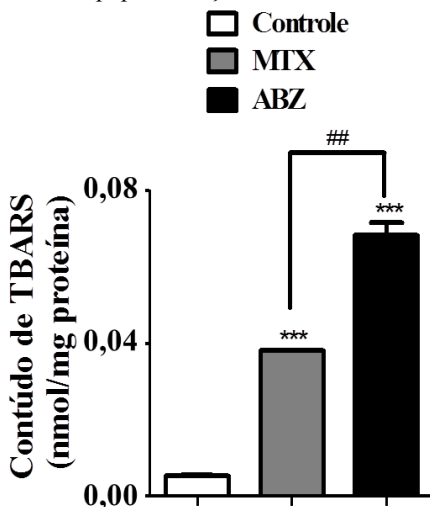
5.11 Indução *in vivo* de estresse oxidativo pelo ABZ

No intuito de verificar se os efeitos observados *in vitro* se confirmavam *in vivo*, considerando a possibilidade dos mecanismos envolvidos na atividade antitumoral do ABZ estarem relacionados com a biossinalização via EROs, foram analisados os marcadores de estresse oxidativo e defesas antioxidantes usando o líquido ascítico dos animais implantados com TAE e tratados com ABZ e MTX.

5.11.1 MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO

Os resultados mostraram que os tratamentos com os fármacos em estudo apresentaram maiores níveis de lipoperoxidação. O aumento no conteúdo de TBARS foi 12,9 vezes superior para o tratamento com ABZ e 7,2 vezes superior para MTX em comparação ao controle (Figura 24).

Figura 24 - Conteúdo de lipoperoxidação em células do TAE.



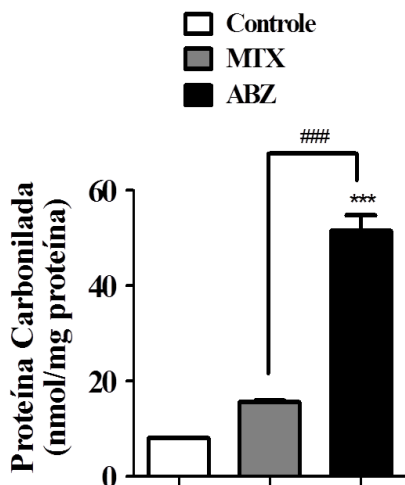
Líquido ascítico obtido de animais do controle e tratados com ABZ (20 mg/kg) ou MTX (2,5 mg/kg, controle positivo). Valores expressos como média \pm E.P.M, n=6. Valores com diferença significativa em *** $p < 0,001$ comparados ao grupo controle (salina). ## $p < 0,01$ indicativo de significância entre os grupos ABZ e MTX. **Fonte:** Do autor.

Os maiores níveis de degradação oxidativa de lipídios nos tratamentos com os fármacos foram indicativos de que esses tratamentos apresentaram maiores danos causados por agentes oxidantes em relação ao grupo controle. Já está descrito na literatura que uma das principais consequências do estresse oxidativo são as injúrias nas células, nos tecidos e no organismo causadas pelos danos oxidativos. Diversos estudos reconhecem que as EROs podem influenciar diretamente nos danos a lipídios, pois essas espécies podem reagir com ácidos graxos poliinsaturados ou lipídios de membrana, promovendo a lipoperoxidação (AYALA; MUÑOZ; ARGÜELLES, 2014; BARRERA, 2012; MOLDOVAN; MOLDOVAN, 2004).

Ouriq et al. (2015) mostraram que as quinonas, compostos que apresentaram atividade antitumoral, aumentaram peroxidação lipídica, e quando associadas ao ácido ascórbico (um potencializador do ciclo redox das quinonas), a oxidação dos lipídios foi ainda maior.

Vários fármacos antitumorais que são utilizados atualmente na quimioterapia do câncer induzem estresse oxidativo. Isso pode ser observado em pacientes que receberam tratamento com esses fármacos e apresentaram, como sinal de aumento dos níveis EROs, um maior conteúdo de peroxidação lipídica no plasma (BARRERA, 2012; CONKLIN, 2004; GORRINI; HARRIS; MAK, 2013; SANTIAGO-ARTECHE et al., 2012).

A carbonilação proteica, um tipo de oxidação de proteína que pode ocorrer devido à maior presença de EROs, também foi usada como marcador de estresse oxidativo. Os resultados obtidos mostraram que os níveis de PC (Figura 25) estavam aumentados nos tratamentos com ABZ (6,4 vezes) e MTX (2,0 vezes), quando comparados ao grupo controle.

Figura 25 - Níveis de carbonilação de proteínas em células do TAE.

Líquido ascítico obtido de animais do controle e tratados com ABZ (20 mg/kg) ou MTX (2,5 mg/kg, controle positivo). Valores expressos como média \pm E.P.M, n=6. Valores com diferença significativa em *** $p < 0,001$ comparados ao grupo controle (salina). ### $p < 0,001$ indicativo de significância entre os grupos ABZ e MTX. **Fonte:** Do autor.

Ourique et al. (2016) mostraram que as quinonas, aumentaram a carbonilação de proteínas, além disso, quando associadas ao ácido ascórbico foi observado uma elevação da oxidação proteica, o que indica o papel de EROs na oxidação dessas macromoléculas.

A oxidação de proteínas por EROs pode ocorrer por espécies reativas na forma de radical (como superóxido, hidroxil, peróxil, alcoxil e hidroperóxil) e espécies na forma não-radicalar (peróxido de hidrogênio, ácido hipocloroso, ozônio, oxigênio singlete e peroxinitrito). Uma vez que essas espécies oxidam a cadeia lateral dos aminoácidos (preferencialmente prolina, arginina, lisina e treonina), ocorre a formação dos grupos carbonil (aldeídos e cetona), que, por apresentarem estabilidade química, são bastante úteis para a detecção de oxidação proteica (DALLE-DONNE et al., 2003).

A carbonilação de proteínas também pode ser gerada através de clivagem oxidativa dessas macromoléculas pela via da α -amidação ou pela oxidação do glutamyl das cadeias laterais. Outro gerador do grupo carbonil envolve produtos da lipoperoxidação ou derivados reativos carbonil (ceto-aminas, cetoaldeídos e desoxosonas) gerados como consequência de reações de redução de açúcares ou seus produtos de

oxidação com resíduos de lisina das proteínas (DALLE-DONNE et al., 2003).

Geralmente esse processo de oxidação de proteínas ocorre pela formação de cetonas reativas ou aldeídos que podem reagir com o DNPH (2,4-dinitrofenilhidrazina), formando hidrazonas. A carbonilação “primária” de proteínas acontece quando ocorre uma oxidação direta da cadeia lateral dos resíduos de lisina, arginina, prolina e treonina, entre outros aminoácidos. Esta reação produz o DNPH, produto proteico que é detectável por métodos específicos (SUZUKI; CARINI; BUTTERFIELD, 2010).

O DNPH, produto derivado de proteína, também pode ser formado em carbonilação “secundária” de proteínas através reações adicionais de aldeídos, como os que são gerados em processos de peroxidação de lipídios. A decomposição oxidativa de ácidos graxos poliinsaturados inicia reações em cadeia, responsáveis pela formação de várias espécies carboniladas. As espécies mais reativas e citotóxicas são os aldeídos α - β -insaturados, dialdeídos (malondialdeído) e cetoaldeídos (SUZUKI; CARINI; BUTTERFIELD, 2010). Em alguns casos, a formação de derivados de carbonila pode ser irreversível, causando alterações conformacionais e diminuindo a atividade catalítica em enzimas antioxidantes (PARVEZ; RAISUDDIN, 2005).

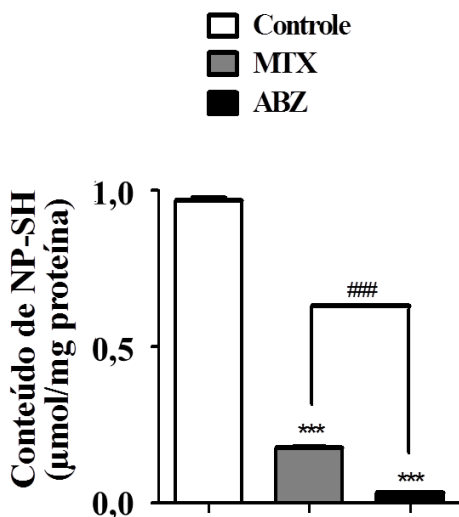
Mudanças nas concentrações de EROs podem implicar em uma defesa antioxidante prejudicada ou em um aumento de atividade. Além disso, a falta de equilíbrio entre os agentes antioxidantes e pró-oxidantes, com favorecimento dos últimos, conduz a um estado de estresse oxidativo, que está relacionado com o aumento da peroxidação lipídica e da formação de proteínas carboniladas (STEPIĆ et al., 2012). Ainda, os danos oxidativos a proteínas, lipídios ou DNA podem ser altamente deletérios à célula e ocorrerem concomitantemente (DALLE-DONNE et al., 2003).

Ademais, é bem descrito na literatura que as EROs ou os oxidantes estão envolvidos na indução da apoptose, bem como na necrose (VAIRETTI et al., 2005). Nesse contexto, os marcadores de estresse oxidativo (TBARS e PC) elevados em ambos os tratamentos (conforme as figuras 24 e 25) foram considerados positivos. O aumento desses marcadores foi indicativo de que os tratamentos com ABZ e MTX geraram um maior conteúdo de EROs que o controle, e por isso, os danos promovidos nos lipídios e nas proteínas foram maiores do que os observados no grupo basal.

5.11.2 MARCADORES DE DEFESA ANTIOXIDANTE

O conteúdo de GSH, que, segundo Gorrini, Harris e Mak (2013), é uma das principais formas de neutralização e eliminação de EROs, foi avaliado no presente estudo pela detecção de tióis não proteicos. Os resultados obtidos mostraram uma forte depleção no conteúdo deste tripeptídeo, uma vez que os tióis não proteicos estavam reduzidos (Fig. 26) nos tratamentos com ABZ (96,8%) e MTX (81,9%) em comparação com o grupo controle.

Figura 26 - Conteúdo de tióis não proteicos (NP-SH) nas células do TAE.



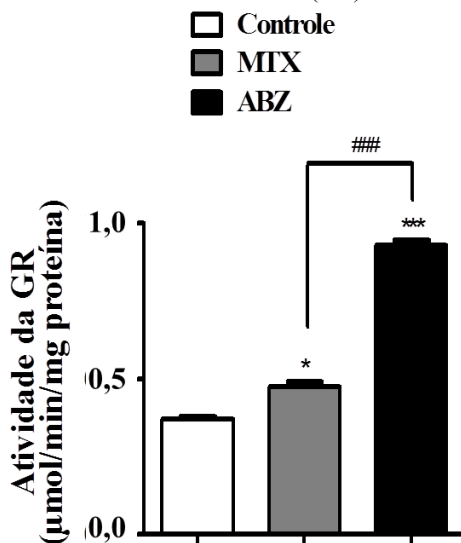
Líquido ascítico obtido de animais do controle e tratados com ABZ (20 mg/kg) ou MTX (2,5 mg/kg, controle positivo). Valores expressos como média \pm E.P.M, n=6. Valores com diferença significativa *** $p < 0,001$ comparados ao grupo controle (salina). ### $p < 0,001$ indicativo de significância entre os grupos ABZ e MTX. **Fonte:** Do autor.

Diversos fármacos com efeito direto ou indireto sobre a geração de EROs estão sendo usados para a terapia do câncer. Isso ocorre porque a indução de estresse oxidativo pode conduzir preferencialmente à morte de células tumorais. Nesse contexto, alguns compostos aprovados para a terapia antitumoral também apresentam ação na depleção de GSH, como L-asparaginase, aprovada para o tratamento de leucemia e câncer

pancreático, e 6-anicotinamida, aprovada para o tratamento de câncer de cólon (GORRINI; HARRIS; MAK, 2013).

A atividade da GR foi avaliada, tendo em vista que esta é uma importante via de regeneração da GSH. A atividade desta enzima (Figura 27) estava aumentada para os tratamentos com ABZ (2,5 vezes em relação ao controle) e MTX (1,3 vezes em relação ao controle).

Figura 27 - Atividade da Glutaciona Redutase (GR) em células do TAE.



Líquido ascítico obtido de animais do controle e tratados com ABZ (20 mg/kg) ou MTX (2,5 mg/kg, controle positivo). Valores expressos como média \pm E.P.M, n=6. Significante em * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$, comparados ao grupo controle (salina). ### $p < 0,001$ indicativo de significância entre os grupos ABZ e MTX. **Fonte:** Do autor.

O aumento da atividade da GR em células do TAE também foi observado no tratamento de compostos com atividade antitumoral por Ourique et al. (2016). Esse aumento provavelmente ocorreu em resposta à depleção do conteúdo de GSH, que também foi observado para o tratamento com ABZ.

O sistema redox via GSH é importantíssimo para atenuar o estresse oxidativo, e neste processo, a GSH funciona como um antioxidante com ação direta nos radicais livres e nas espécies reativas não radicalares. Nessa reação, a GSH é convertida em GSSG, enquanto

que a enzima GR recicla continuamente a GSSG para sua forma reduzida, GSH (YAO; LEONARD; REDDY, 2006).

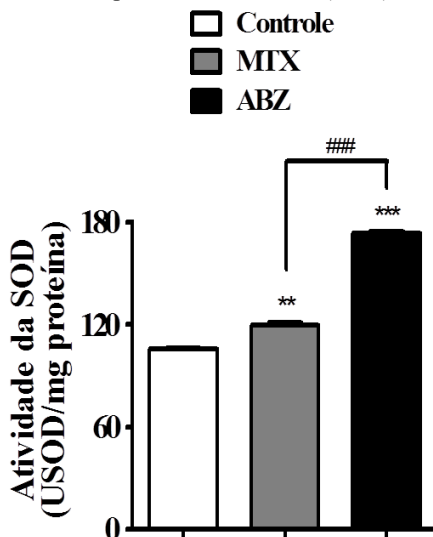
De acordo com o que foi exposto anteriormente, o aumento da atividade de GR observado em ambos os tratamentos poderia ser indicativo do aumento de EROs, que possivelmente ocasionou danos a lipídios e proteínas (Figuras 24 e 25, respectivamente). O consumo de GSH e o aumento da atividade de GR pode ter sido uma consequência do aumento de EROs, uma vez que GSH atua diretamente na eliminação de espécies reativas e a GR atua na regeneração deste tripeptídeo. Além disso, a GSH poderia estar sendo utilizada como co-fator das enzimas GST e GPx, que não avaliadas neste trabalho.

Frasier et al. (2013) mostraram que a atividade da GR foi muito sensível a modificações redox de tiol, revelando um aumento e redução da atividade dessa enzima após o tratamento com oxidante e redutor de tiol, respectivamente. Demonstraram assim, que a atividade dessa enzima é aumentada em decorrência do consumo de GSH. Neste contexto, os resultados obtidos para GSH e GR (Figuras 26 e 27, respectivamente) sugerem que, tanto ABZ como MTX, provavelmente induziram fortemente a geração de EROs, concomitantemente com a depleção de GSH e aumento da atividade da GR.

Vale salientar que o metabolismo das células tumorais é dependente dos níveis de GSH (ZHOU; SHAO; SPITZ, 2014). Por conseguinte, as células tumorais parecem depender fortemente de equivalentes de GSH para manter a sua homeostase redox e impedir os danos oxidativos gerados pelos radicais livres, EROs e ERNs. Sendo assim, a depleção de GSH por limitação da sua síntese e/ou inibição da sua reciclagem redox, mostrou ser uma forma eficaz de sensibilizar as células tumorais à morte. Essa estratégia apresenta um importante papel na indução de apoptose em vários de tipos de células tumorais, estando relacionada com a inibição do crescimento destas (CIRCU; AW, 2010).

A SOD, uma importante enzima antioxidante, também foi avaliada. Os resultados obtidos comparados ao controle mostraram que o tratamento com ABZ aumentou 1,64 vezes a atividade de SOD, enquanto que o tratamento com MTX aumentou em 1,13 vezes a atividade dessa enzima (Figura 28).

Figura 28 - Atividade da Superóxido Dismutase (SOD) em células do TAE.



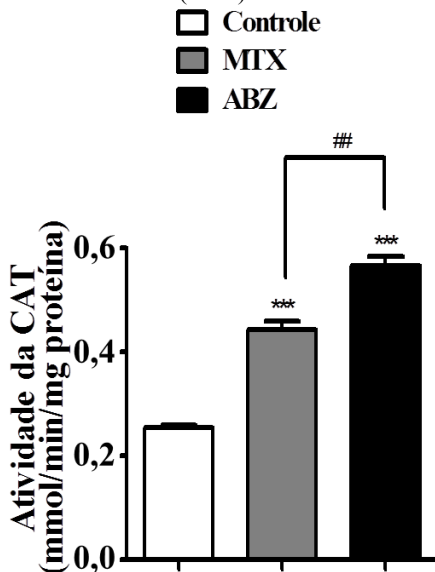
Líquido ascítico obtido de animais do controle e tratados com ABZ (20 mg/kg) ou MTX (2,5 mg/kg, controle positivo). Valores expressos como média \pm E.P.M., n=6. Valores com diferença significativa em **p < 0,01 e ***p < 0,001, comparados ao grupo controle (salina). ###p < 0,001 indicativo de significância entre os grupos ABZ e MTX. **Fonte:** Do autor.

Locatelli et al. (2004) avaliaram em seu estudo o estresse oxidativo induzido por ABZ em ratos normais. Nesse trabalho, o aumento da atividade SOD após o tratamento com ABZ foi responsável por elevar as concentrações intracelulares de H_2O_2 . Outros estudos usando as células de TAE mostraram que compostos com atividade antitumoral (como extato etanólico de *Piper nigrum* e naftoquinonas isoladas ou em associação com o ácido ascórbico) também aumentaram a atividade dessa enzima (GRINEVICIUS et al, 2016; OURIQUE et al., 2016).

Algumas pesquisas revelaram que o aumento na atividade da SOD está associado à diminuição da incidência e diversidade tumoral (LI et al., 2009; MANJU; NALINI, 2005). Além disso, a SOD pode mediar a prevenção de câncer, pois essa enzima está envolvida em várias vias de sinalização, que inclui proliferação celular, angiogênese e morte celular (ROBBINS; ZHAO, 2014). Nesse contexto, a *Curcuma aromatica* foi usada na prevenção de adenocarcinoma esofágico via indução de MnSOD (LI et al., 2009)

A catalase, uma importante enzima antioxidante, segundo Gorrini, Harris e Mak (2013) é uma das vias principais para a eliminação de EROs. Na avaliação da atividade de CAT (Figura 29), o ABZ induziu o aumento de 2,22 vezes a atividade enzimática, enquanto o tratamento com MTX elevou em 1,73 vezes.

Figura 29 - Atividade da Catalase (CAT) nas células do TAE.



Líquido ascítico obtido de animais do controle e tratados com ABZ (20 mg/kg) ou MTX (2,5 mg/kg, controle positivo). Valores expressos como média \pm E.P.M, n=6. Valores com diferença significativa em *** $p < 0,001$, comparados ao grupo controle (salina). ## $p < 0,01$ indicativo de significância entre os grupos ABZ e MTX. **Fonte:** Do autor.

O tratamento com ABZ foi responsável por aumentar a atividade de CAT em um estudo que avaliou o estresse oxidativo induzido por este fármaco (LOCATELLI et al., 2004). Outros estudos usando as células de TAE mostraram que compostos com atividade antitumoral também aumentaram a atividade da enzima CAT (GRINEVICIUS et al, 2016; OURIQUE et al., 2016).

A geração de estresse oxidativo, desencadeada por diversos fármacos antitumorais e radioterapia, está associada à indução de apoptose e com as respostas às terapias do câncer. Isso sugere que o aumento de EROs pode estar relacionado com a inibição do crescimento

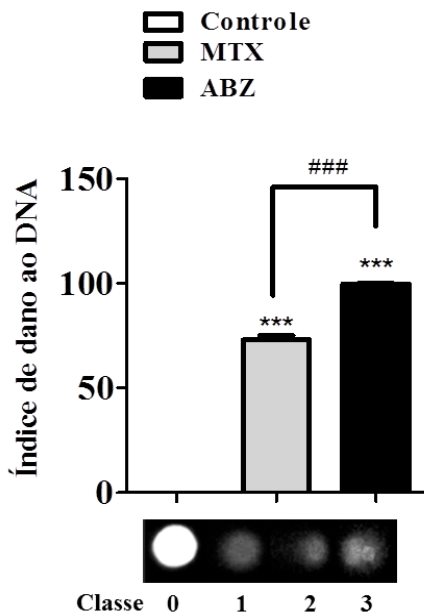
tumoral. Por exemplo, alguns fármacos (como taxanos, alcalóides da Vinca e antimetabolitos) induzem a produção de radicais superóxido, como resultado da sua interferência na cadeia transportadora de elétrons e liberação do citocromo c da mitocôndria (BARRERA, 2012; GORRINI; HARRIS; MAK, 2013; KAUFMANN; EARNSHAW, 2000).

Resumindo, os resultados de marcadores de estresse oxidativo e defesas antioxidantes, revelaram que os tratamentos com ABZ e MTX resultaram em uma drástica diminuição nos níveis do tripeptídeo GSH, enquanto as atividades de enzimas antioxidantes SOD, CAT e GR, assim como os marcadores de dano oxidativos (TBARS e PC) foram aumentados. Estes resultados tomados em conjunto sugerem um aumento na geração de estresse oxidativo causado por ambos os tratamentos, e isso possivelmente poderia parcialmente explicar a inibição do crescimento tumoral observada.

5.12 Indução do dano ao DNA pelo ABZ

Levando em consideração a possível indução de estresse oxidativo pelo ABZ, foi verificado se o tratamento com esse fármaco poderia causar dano ao DNA e desencadear a morte celular via apoptose em células do TAE. Para isso, foi avaliada a fragmentação do DNA pelo ensaio do cometa (Figura 30). Os resultados obtidos mostraram que houve dano ao DNA após o tratamento com ABZ (índice de dano de 99,5), que foi mais pronunciado que o tratamento com MTX (índice de dano de 73,0).

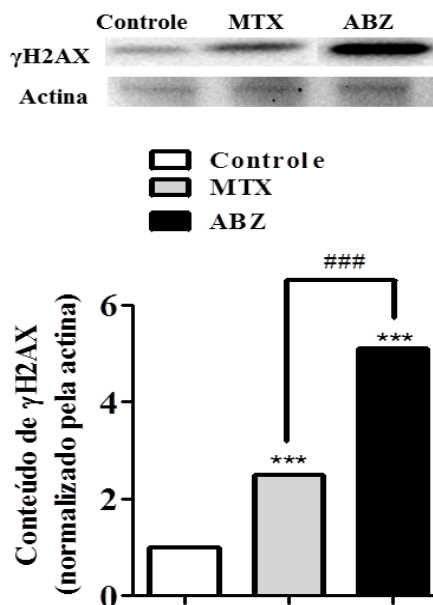
Figura 30 - Fragmentação do DNA de células do líquido ascítico de animais implantados com o TAE.



Efeito do tratamento com ABZ (20 mg/kg) ou MTX (2,5 mg/kg, controle positivo). Índice de dano ao DNA determinado pelo ensaio do cometa. Valores com diferença significativa em *** $p < 0,001$, comparados ao grupo controle (salina). ### $p < 0,001$ indicativo de significância entre os grupos ABZ e MTX. **Fonte:** Do autor.

Esse aumento no índice de dano, indica que a fragmentação do DNA, poderia estar associado a um ataque oxidativo devido ao aumento da geração de EROs promovido pelo ABZ, afetando assim, o DNA celular. Tais danos foram confirmados por ensaios de western blot (Figura 31) e os dados mostraram claramente que o tratamento com ABZ foi capaz de aumentar o conteúdo de γ H2AX em 5,1 vezes, quando comparado ao grupo controle, um efeito mais acentuado que o tratamento com MTX, que aumentou 2,5 vezes em comparação ao controle.

Figura 31 - Níveis da proteína γ H2AX.



Western blot de células do líquido ascítico de animais implantados com o TAE e tratados com ABZ (20 mg/kg) ou MTX (2,5 mg/kg, controle positivo). Valores expressos como média \pm E.P.M. Valores com diferença significativa em *** $p < 0,001$, comparados ao grupo controle (salina). ### $p < 0,001$ indicativo de significância entre os grupos ABZ e MTX. **Fonte:** Do autor.

Patel et al. (2011) mostraram que o ABZ promoveu dano ao DNA de células tumorais de melanoma e de câncer de pulmão, onde foi observado um aumento da fosforilação da proteína H2AX para as linhagens de melanoma metastático (A2058 e A375), e de câncer de pulmão (H1530 e H446). Adicionalmente, Oztas et al. (2007) mostraram um efeito genotóxico do ABZ associado ao aumento na frequência de micronúcleo.

Segundo Shiloh e Ziv (2013), o estresse oxidativo pode promover a danos ao DNA celular. A variante γ H2AX é uma variante da histona H2A, a qual, em respostas ao dano no DNA, recebe uma fosforilação posicionada na serina 139 (VIJAYAKURUP et al., 2012). Nesta perspectiva, os tratamentos com ABZ e MTX, além de aumentarem os níveis da proteína γ H2AX (Figura31), que é usada como um marcador de dano oxidativo no DNA, também elevaram o índice de fragmentação

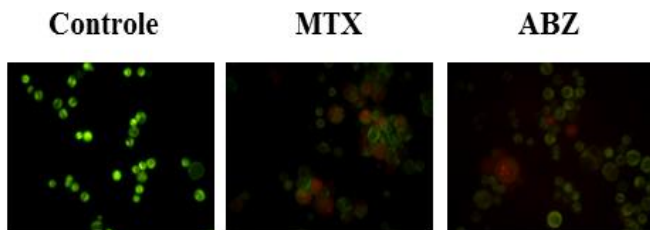
dessa macromolécula (Figura 30), indicando que os danos observados, provavelmente ocorreram pela indução do estresse oxidativo.

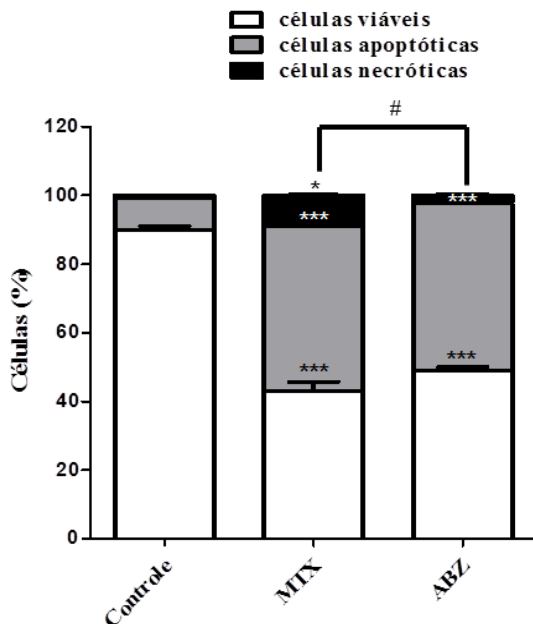
Ainda, o conjunto dos resultados apresentados nas figuras 14, 18, 30 e 31 (que mostraram o aumento na clivagem oxidativa do CT-DNA tratado com ABZ; o aumento de EROs em células MCF-7; a fragmentação do DNA e a expressão da proteína γ H2AX, respectivamente) indicaram uma provável indução, pelos tratamentos com ABZ e MTX, de danos no DNA por EROs.

5.13 Indução da morte celular via apoptose pelo ABZ

Os dados obtidos revelaram um forte aumento no número de células em apoptose após o tratamento com ABZ (5,4 vezes maior), em comparação com o grupo controle. Em contrapartida, o número de células viáveis foi diminuído drasticamente com esse mesmo tratamento (Figura 32). O tratamento com MTX também aumentou a apoptose (5,3 vezes). Entretanto, foi observado concomitantemente o aumento na morte celular via necrose (9,2 vezes em comparação com o grupo controle), resposta que não foi observada após o tratamento com ABZ.

Figura 32 - Indução da morte celular via apoptose e necrose pelos tratamentos com ABZ (20 mg/kg) ou MTX (2,5 mg/kg, controle positivo).



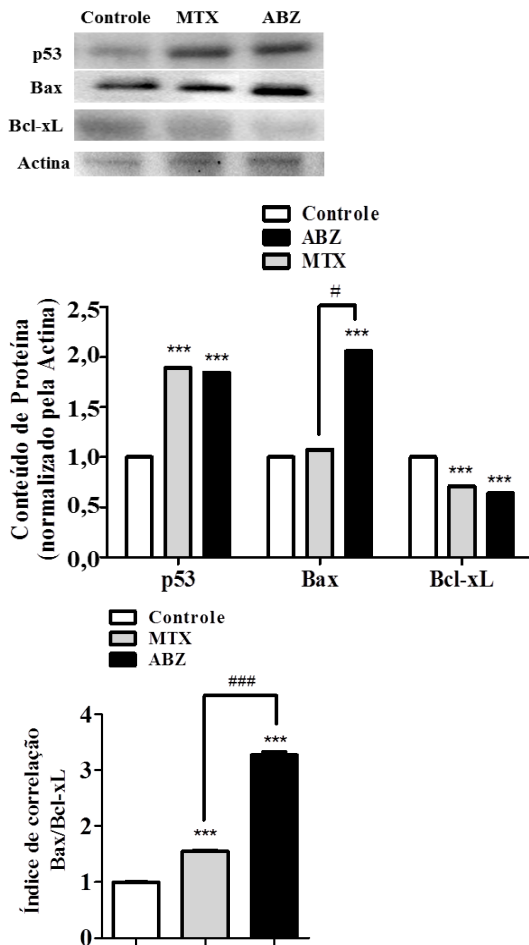


Detecção da morte celular pela coloração com EtBr/AO. Valores com diferença significativa em * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$, comparados ao grupo controle (salina). # $p < 0,05$ indicativo de significância entre os grupos ABZ e MTX.

Fonte: Do autor.

Algumas proteínas envolvidas na sinalização da apoptose foram analisadas através do ensaio de western blot. Os dados obtidos demonstraram que os tratamentos com ABZ e MTX, quando comparados com o grupo controle, apresentaram um aumento nos níveis das proteínas pro-apoptóticas p53 e Bax, enquanto que os níveis da proteína anti-apoptótica Bcl-xL foi diminuída (Figura 33).

Figura 33 - Níveis das proteínas pro- e anti-apoptóticas p53, Bax e Bcl-xL por *western blot*.



Valores com diferença significativa em*** $p < 0,001$, comparados ao grupo controle (salina). # $p < 0,05$ e ### $p < 0,001$ indicativos de significância entre os grupos ABZ e MTX. **Fonte:** Do autor.

Segundo Ditch e Paull (2012), as EROs podem ativar a p53. Após a ativação da p53 ocorre a indução da expressão de vários fatores proapoptóticos, incluindo Bax, responsável por induzir a morte celular (ZHOU; SHAO; SPITZ, 2014). Além disso, a p53 controla a apoptose em resposta a sinais proliferativos anormais e estresse, incluindo danos ao DNA (BENCHIMOL, 2001). Neste contexto, a indução da apoptose

pelos tratamentos com ABZ e MTX poderia ser explicada pela provável indução de EROs pelos tratamentos, a qual poderia ativar p53 e os fatores pro-apoptóticos, culminando na indução da apoptose observada no tratamento com estes fármacos (Figuras 32 e 33).

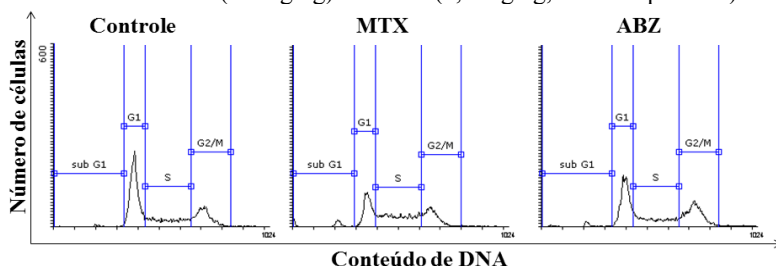
Os resultados ainda mostraram um aumento na correlação entre as proteínas Bax/Bcl-xL (Figura 33) para o tratamento com ABZ. O aumento da correlação de Bax/Bcl-xL mitocondrial induz a ativação da Bax e a liberação do citocromo c das mitocôndrias na presença de uma proteína única BH3, tBid (LIU et al., 2004). Esse aumento na taxa de Bax/Bcl-xL está de acordo com o aumento da p53, porque a apoptose dependente da p53 está envolvida com a liberação do citocromo c mitocondrial (BENCHIMOL, 2001).

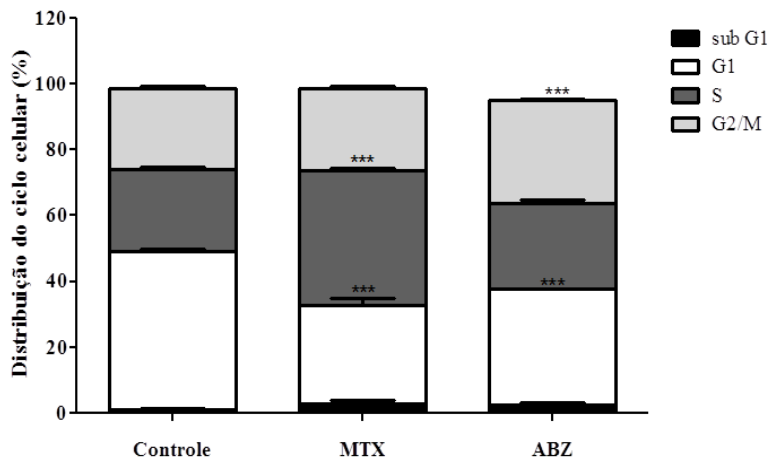
Em conjunto, os resultados obtidos sugerem que a morte celular via apoptose (Figura 32 e 33), promovida pelos tratamentos com ABZ e MTX, possivelmente ocorreu devido aos danos no DNA causados pela geração de EROs (observada pelo aumento da peroxidação lipídica e carbonilação de proteínas) induzida pelos tratamentos.

5.14 Efeito do ABZ sobre o ciclo celular

A análise do ciclo celular das células do TAE mostrou que o ABZ e o MTX modificaram o perfil deste ciclo em relação ao grupo controle (salina). Os resultados obtidos (Figura 34) mostraram que o ABZ promoveu principalmente um efeito de bloqueio na fase G₂/M das células tumorais (TAE) e um aumento da fase sub G₁, enquanto que o MTX mostrou a inibição da fase G₁, parada na fase S, e também um aumento da fase sub G₁.

Figura 34 - Perfil do ciclo celular de células do TAE submetidas ao tratamento tratamentos com ABZ (20 mg/kg) ou MTX (2,5 mg/kg, controle positivo).





Gráficos em histograma e em percentagem de distribuição das células de TAE nas fases sub G1, G1, S e G2/M após tratamento com ABZ ou MTX. Significante em *** $p < 0,001$, comparados ao grupo controle (salina). **Fonte:** Do autor.

A parada na transição G2/M das células TAE pelo tratamento com ABZ, provavelmente foi devido ao mecanismo de ação anti-helmíntica desse fármaco, relacionado com a inibição da polimerização tubulina, com consequente inibição da formação dos microtúbulos (ARORA et al., 2009). Como os microtúbulos (heterodímeros compostos por subunidades de α -tubulina e β -tubulina) são indispensáveis para a formação e desaparecimento do fuso mitótico, ou seja, são responsáveis pela separação de cromossomos duplicados durante a divisão celular, a sua inibição está relacionada com a parada do ciclo celular na fase G2/M (ARORA et al., 2009; SHIN et al., 2008). O aumento da fase sub G1, indicativa de apoptose, está de acordo com a figura 32, que mostrou um aumento de células em apoptose após o tratamento com ABZ.

Ainda, defeitos no ponto de checagem G2/M estão associados com a catástrofe mitótica, que é um processo responsável pela indução da morte celular, após o início prematuro da mitose de células com danos no DNA que não foram reparados. Além disso, a catástrofe mitótica pode ser induzida por fármacos que inibem a progressão mitótica antes da transição metáfase-anáfase, como os medicamentos que inibem os microtúbulos (CASTEDO et al., 2004; HAYASHI; KARLSEDER, 2013; RIEDER; MAIATO, 2004;

VAKIFAHMETOGLU, OLSSON, ZHIVOTOVSKY, 2008; VITALE et al., 2011).

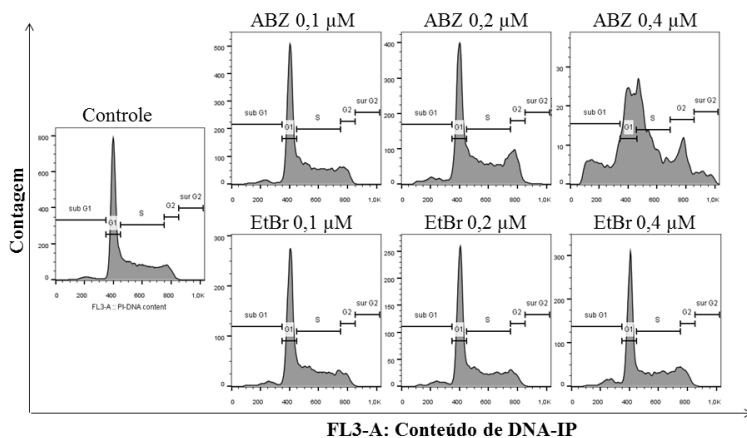
A inibição do crescimento tumoral observada em animais implantados com TAE e tratados com MTX pode estar relacionada com o bloqueio da progressão do ciclo celular pela inibição da fase S. Tsurusawa et al. (1990) relataram que a citotoxicidade do MTX estava relacionada com a inibição da fase S de forma irreversível em células leucêmicas murinas L1210. Isso está de acordo com o mecanismo de ação do MTX, que inibe a DHFR. Neste sentido, a ausência de timidina impede a síntese de DNA e, como consequência, a proliferação celular também é inibida.

Essa inibição da fase S pelo MTX está em consonância com os resultados de Joe et al. (2002), que revelaram inibição do crescimento tumoral devido à parada do ciclo celular na transição das fases S-G2 e indução da apoptose em células de leucemia promielocítica HL60. Ainda, Aranha et al., (2000) mostraram que a inibição do crescimento da linhagem celular do carcinoma da bexiga também ocorreu pela interrupção do ciclo celular nas fases S/G2-M e, como consequência, houve a indução da morte celular via apoptose.

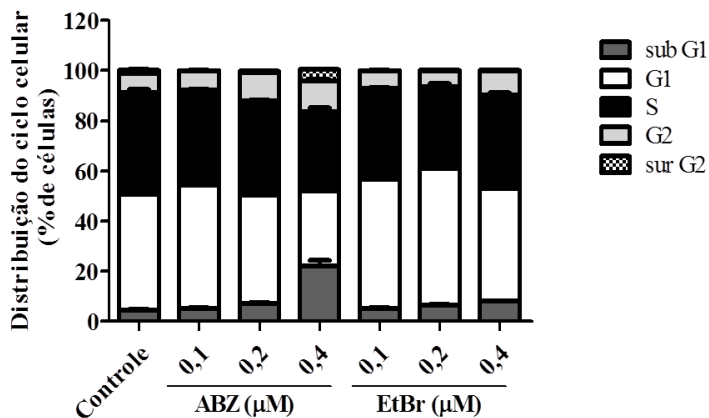
Os efeitos do tratamento com ABZ na progressão do ciclo celular e missegregação cromossômica foram avaliados nas células de linfoma murino. Os dados mostraram que o aumento das doses de ABZ resultou num acréscimo gradual das células paradas na fase G2/M. Este efeito foi associado a um aumento com perfil dose-dependente de células aneuplóides viáveis (Figura 35). Além das células em sub G1, essa aneuploidia foi caracterizada pela frequente ocorrência de células sur G2, apontando para um papel crítico do ABZ na promoção de erros de segregação cromossômica. Este fenômeno não foi observado nas células tratadas com o EtBr.

Figura 35 - O ABZ afeta a progressão do ciclo celular e causa aneuploidia cromossômica.

A.



B.



A. Análise de citometria de fluxo da progressão do ciclo celular de linfomas DDT na presença de ABZ ou EtBr (concentrações: 100, 200 e 400 nM). **B.** Distribuição relativa do ciclo celular de células de linfoma DDT na presença de ABZ ou EtBr. Dados expressos como Média \pm D.P. **Fonte:** Do autor.

No entanto, essa parada no ciclo celular foi associada a um aumento pronunciado, dependente da dose, na frequência de células viáveis com aneuploidia cromossômica. A análise dos resultados observada nas Figuras 16 e 35 (que mostraram a toxicidade e o ciclo celular) sugeriu que a preferência do ABZ para a tubulina de helmintos

como alvo predominantemente, se for o caso, é de menor relevância, uma vez que, pequenas doses de ABZ promoveram severos efeitos em células de murinos e humanos. Consistente com essa informação, os nossos resultados sugerem que a toxicidade ABZ em helmintos e células de mamíferos, segue o mesmo princípio molecular.

Outros estudos observaram o efeito do ABZ no ciclo celular de diversos tipos celulares, como células tumorais humanas e murinas (de melanoma metastático, câncer de pulmão, câncer gástrico, câncer de fígado, carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço), normais humanas (de pulmão e células epiteliais da cavidade oral) e de parasitas intestinais (*Giardia duodenalis*). Todos os tipos celulares estudados apresentaram como característica comum a parada na transição das fases G2 para M. Isto provavelmente ocorreu por consequência da citocinese, a qual foi incompleta após a exposição a este fármaco que age inibindo a dinâmica do microtúbulo (GHASEMI et al., 2017; MARIANTE et al., 2005; MARTÍNEZ-ESPINOSA et al., 2015; PATEL et al., 2011; POURGHOLAMI et al., 2001; ZHANG et al., 2017).

5.15 Efeito do tratamento com ABZ no transcriptoma de células de linfoma DDT

Devido ao ABZ e EtBr serem compostos intercalantes de DNA, foi averiguado como esses compostos afetariam a transcrição gênica. No intuito de abordar esta questão, todo o genoma foi avaliado de forma imparcial, pela análise do sequenciamento de RNA (RNA-Seq) das células de linfoma DDT expostas ao controle do veículo (DMSO), ABZ (0,4 μM) e EtBr (0,4 μM). As alterações específicas ou genéricas no transcriptoma foram definidas por comparação de bases de dados do ABZ e EtBr com o controle DMSO.

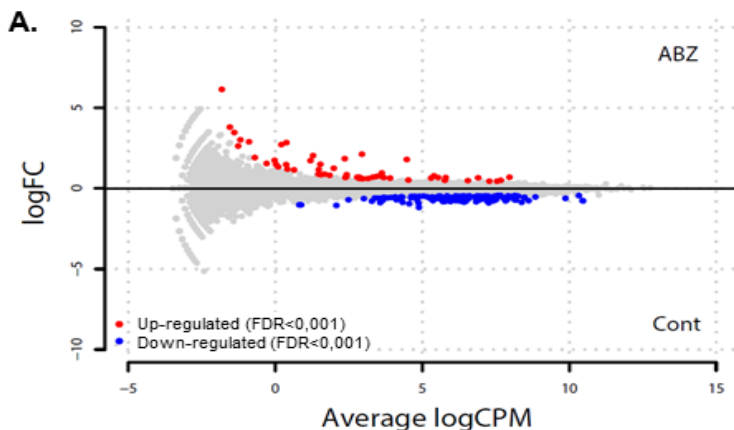
Primeiro, foi determinada a assinatura ABZ, definindo os transcritos específicos que são induzidos ou suprimidos por esse tratamento (Figura 36A). Os genes *up* regulados (54 genes) foram identificados em vermelho enquanto que os *down* regulados (124 genes) foram identificados em azul (Apêndice B).

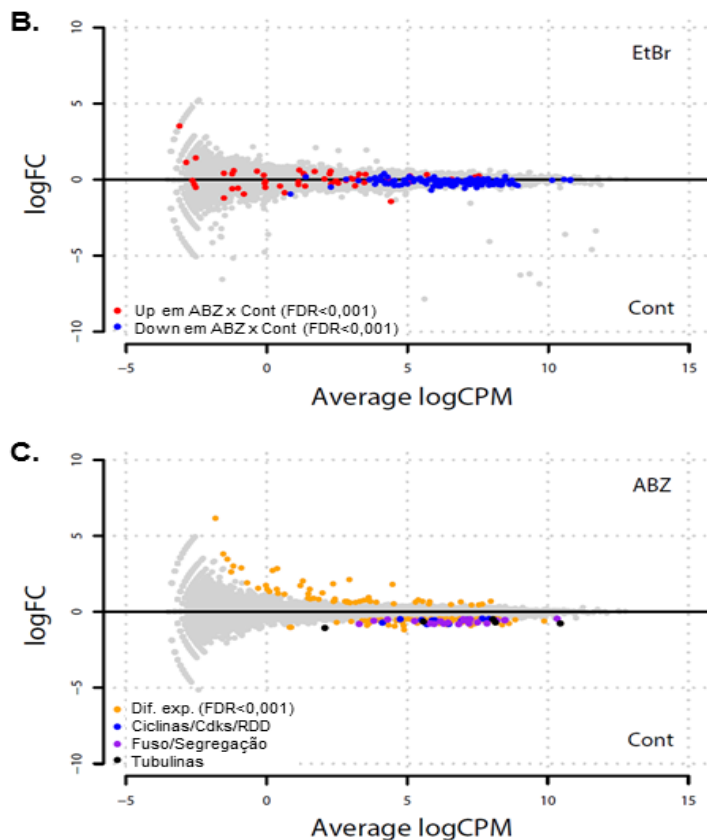
A maioria dos transcritos que foram diferencialmente expressos após a exposição das células DDT ao tratamento com ABZ, permaneceu praticamente inalterada quando comparada com o EtBr (Figura 36B). Do mesmo modo, a assinatura do tratamento com EtBr apareceu completamente diferente do tratamento com ABZ (Apêndice C). Apenas 4 genes foram diferencialmente expressos em ambos tratamentos quando comparados ao grupo controle (*TXNIP*, *ID11*, *CCNE2* e *AACS*).

Uma análise mais detalhada da assinatura do tratamento com ABZ (Figura 36C) revelou uma diminuição acentuada de genes diretamente ligados à mitose (*FOXM1*; *CCNA2*; *CDKN2D*; *PLK1*; *PKMYT1*; *BRIP1*; *CCNE2*; *CDK1*; *CCNE1*; *CCNF*; *CDKN2C*; *CBX5*; *ANLN*; *CKAP2L*; *SKA1*; *CENPF*; *STIL*; *KIF11*; *CDCA3*; *NCAPG2*; *KIFC5B*; *CENPL*; *KIF24*; *INCENP*; *MIS18BP1*; *AURKB*; *NUSAP1*; *FAM64A*; *ESCO2*; *SYNE3*; *SPC25*; *PRC1*) e de genes de tubulinas (*TUBB4B*; *TUBA1C*; *TUBA1B*; *TUBB5*; *GM5620*).

A lista dos genes diferencialmente expressos após o tratamento com ABZ relacionada com a divisão celular está representada no quadro 11, o qual indica os valores do \log_2FC (*fold change*), \log_2CPM (*counts por million*), p-value e FDR (*false discovery rate*). Os dados de RNA-seq presentes neste trabalho ainda não foram depositados em nenhum repositório de banco de dados de sequenciamento.

Figura 36 - Efeito do ABZ no transcriptoma das células de linfoma.





Plotagem-MA da linhagem DDT. **A.** Genes diferencialmente *up* ou *down*-regulados (FDR < 0,001) são mostrados em vermelho e azul, respectivamente, após o tratamento com ABZ. **B.** Exposição ao EtBr mostrou que genes *up* ou *down*-regulados por ABZ, não são afetados por EtBr. **C.** Exposição ao ABZ afetou a transcrição de genes associados a ciclinas, CDKs, DDR, fuso, segregação e tubulina. **Fonte:** Do autor.

Quadro 11 – Lista de genes relacionados com a divisão celular que foram diferencialmente expressos após o tratamento com ABZ.

(continua)

Gene	log ₂ FC	log ₂ CPM	p-value	FDR
<i>FOXMI</i>	-0,445	7,66896051	7,36E-06	0,000866
<i>CCNA2</i>	-0,459	7,9063396	3,55E-06	0,000478
<i>CDKN2D</i>	-0,486	4,74902236	8,54E-06	0,000977
<i>PLKI</i>	-0,499	7,11738293	6,02E-07	0,000110

Quadro 11 – Lista de genes relacionados com a divisão celular que foram diferencialmente expressos após o tratamento com ABZ.

(conclusão)

Gene	log₂FC	log₂CPM	p-value	FDR
<i>PKMYT1</i>	-0,535	5,51081607	3,20E-07	6,20E-05
<i>BRIP1</i>	-0,548	5,97391152	9,61E-08	2,04E-05
<i>CCNE2</i>	-0,567	5,88047651	3,97E-08	9,50E-06
<i>CDK1</i>	-0,579	6,93691212	7,98E-09	2,26E-06
<i>CCNE1</i>	-0,711	4,12016931	7,88E-10	2,67E-07
<i>CCNF</i>	-0,793	6,48190204	6,45E-15	6,91E-12
<i>CDKN2C</i>	-0,814	5,6976948	5,58E-15	6,32E-12
<i>CBX5</i>	-0,447	10,3289923	5,03E-06	0,00064428
<i>ANLN</i>	-0,477	6,99512743	1,92E-06	0,00028798
<i>CKAP2L</i>	-0,478	7,24553352	1,70E-06	0,00026657
<i>SKA1</i>	-0,506	4,2969569	7,69E-06	0,00089487
<i>CENPF</i>	-0,540	8,47749347	4,32E-08	9,99E-06
<i>STIL</i>	-0,551	7,07012876	3,77E-08	9,13E-06
<i>KIF11</i>	-0,561	8,46301463	1,35E-08	3,61E-06
<i>CDCA3</i>	-0,561	7,03567683	2,19E-08	5,43E-06
<i>NCAPG2</i>	-0,571	8,17682149	7,00E-09	2,01E-06
<i>KIFC5B</i>	-0,587	3,81455292	8,20E-07	0,00014386
<i>CENPL</i>	-0,609	5,26291635	9,24E-09	2,58E-06
<i>KIF24</i>	-0,619	6,18739104	1,40E-09	4,45E-07
<i>INCENP</i>	-0,697	7,50613349	2,71E-12	1,35E-09
<i>MIS18BP1</i>	-0,706	6,44735596	3,70E-12	1,71E-09
<i>AURKB</i>	-0,762	7,19259737	2,85E-14	2,00E-11
<i>NUSAP1</i>	-0,768	7,83441791	1,18E-14	1,00E-11
<i>FAM64A</i>	-0,768	5,81860927	1,28E-13	7,69E-11
<i>ESCO2</i>	-0,784	6,29444305	1,68E-14	1,27E-11
<i>SYNE3</i>	-0,798	3,28779	4,46E-10	1,57E-07
<i>SPC25</i>	-0,802	5,96019767	7,83E-15	6,93E-12
<i>PRC1</i>	-0,824	6,82826107	3,32E-16	4,83E-13
<i>TUBB4B</i>	-0,492	8,04318512	6,72E-07	0,0001201
<i>TUBA1C</i>	-0,639	5,5711179	9,49E-10	3,17E-07
<i>TUBA1B</i>	-0,697	8,13712573	2,03E-12	1,03E-09
<i>TUBB5</i>	-0,764	10,4425327	7,78E-15	6,93E-12
<i>GM5620</i>	-1,055	2,06547784	7,47E-11	3,10E-08

Fonte: Do autor. Nota: cor azul denota genes associados com a regulação de ciclinas/CDKs e DDR, cor roxa genes associados com a regulação da montagem do fuso e segregação, cor preta denota genes de tubulinas.

A diminuição acentuada de genes diretamente ligados à mitose e de genes de tubulinas sugeriu que os genes mitóticos são expressos antes da condensação cromossômica e a sobre-representação de células paradas na mitose após o tratamento com ABZ resulta numa sub-representação desses transcritos na condição do tratamento com ABZ. Por outro lado, que a diminuição dos genes de tubulinas poderia estar relacionada com a inibição da polimerização das tubulinas de células tratadas com ABZ.

Apesar do fato do ABZ interagir com DNA purificado e competir com EtBr, o ABZ pareceu não ter nenhum impacto direto na replicação e transcrição. No entanto, a notável sensibilidade de células humanas e murinas transformadas e não transformadas ao tratamento com ABZ, permitiu a investigação de possíveis alterações no transcriptoma de células expostas ao ABZ. Como para EtBr, os efeitos de ABZ no transcriptoma pareceram indiretos. Enquanto o EtBr apresentou efeitos bastante tóxicos para os genes mitocondriais (PIECHOTA et al., 2006; LEE et al., 2008; este estudo), o perfil transcricional do ABZ apontou para um aumento acentuado de células paradas na transição das fases G2/M.

O impacto do tratamento com ABZ no ciclo celular de linfoma DDT, os quais foram acumuladas em G2/M em um perfil dose-dependente, estão em consonância com o perfil específico do transcriptoma do ABZ, que revelou pronunciada sub-representação de genes mitóticos nas amostras expostas ao ABZ (Quadro 11).

Essas observações e resultados sobre o efeito do ABZ na progressão do ciclo celular mostraram que esse medicamento foi responsável pela inibição da transição G2/M e provável indução de aneuploidias. Este fato implicou na possível ação do ABZ como um inibidor mitótico em células murinas e humanas, capaz de interromper a formação do fuso mitótico e a progressão do ciclo celular destas linhagens e podendo também induzir a catástrofe mitótica.

A inibição da mitose (parada na fase G2/M) pelo tratamento com ABZ já foi descrita por diversos estudos realizados com diferentes linhagens de células, que incluiu células tumorais e não transformadas de humanos, camundongos, ratos e inclusive de parasitas (CASTRO et al., 2016; GHASEMI et al., 2017; MARIANTE et al., 2005; MARTÍNEZ-ESPINOSA et al., 2015; PATEL et al., 2011; POURGHOLAMI et al., 2001; ZHANG et al., 2017). Isso sugere que a preferência do ABZ para a tubulina de helmintos como alvo predominante é de menor relevância, uma vez que os dados desses estudos mostraram fortes efeitos nestes tipos celulares, sugerindo que o

mecanismo de ação principal deste fármaco envolve a inibição da dinâmica do microtúbulo.

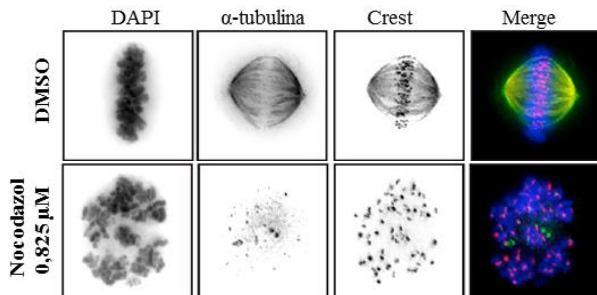
5.16 Análise do tratamento com ABZ na dinâmica dos microtúbulos de células de mamíferos

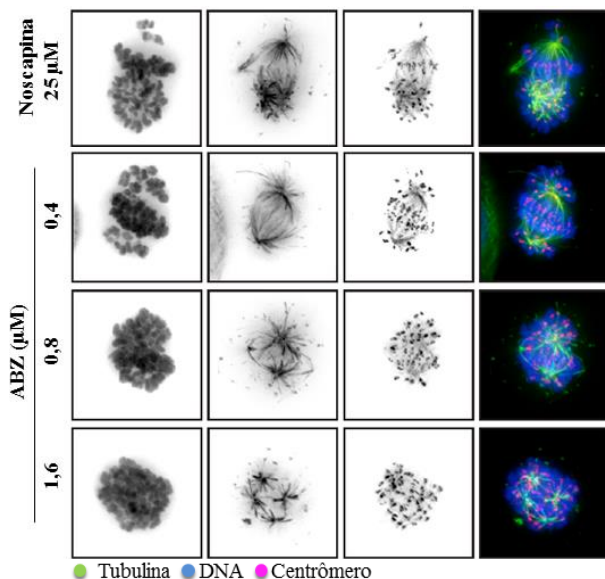
As características farmacológicas do ABZ têm sido extensamente estudadas e o mecanismo de ação deste composto como inibidor da polimerização da tubulina em helmintos já foi descrito. Entretanto, seu efeito em células de mamíferos continua pouco entendido. Para além, o tratamento com ABZ em células murinas revelou que esse fármaco atua primariamente como um inibidor mitótico com ação nos fusos. Dessa forma, o efeito direto da exposição ao tratamento com ABZ na dinâmica dos microtúbulos foi investigado.

Nessa perspectiva, para mensurar o efeito do ABZ na dinâmica dos microtúbulos, células da linhagem HeLa foram expostas ao ABZ para posterior análise do complexo do fuso mitótico.

Os efeitos de inibidores mitóticos, como o taxol, um estabilizador de microtúbulos típico, o nocodazol, um inibidor da polimerização de microtúbulos e a noscapina um inibidor mitótico que afeta a dinâmica dos microtúbulos, foram avaliados e comparados com o efeito do ABZ. Após a exposição a esses tratamentos, as células fixadas foram reveladas para verificar o complexo do fuso mitótico e a toxicidade desses compostos nesse complexo, apresentando especificidade para α -tubulina (verde), centrômeros (rosa) e DNA (azul). As células foram visualizadas por microscopia de fluorescência de campo largo e o ABZ foi identificado como um potente inibidor mitótico de células humanas, induzindo desalinhamentos e falhas na citocinese (Figura 37).

Figura 37 - Inibição do complexo do fuso mitótico após exposição ao tratamento com ABZ.





O ABZ atua como um inibidor mitótico em células de mamífero, destruindo o complexo do fuso. Células da linhagem HeLa foram expostas aos tratamentos indicados, fixadas e marcadas com anticorpo anti-alfa tubulina (verde) e anti-centrômero CREST (rosa). DAPI foi usado para marcar o DNA (azul). As imagens foram adquiridas por microscopia de fluorescência de campo amplo.
Fonte: Do autor.

Os resultados obtidos pelo tratamento com ABZ foram mais semelhantes com os observados no tratamento com noscapina (controle positivo que interrompe a dinâmica dos microtúbulos). Porém, o efeito do ABZ na inibição da dinâmica dos microtúbulos foi alcançado em concentração molar 60 vezes menor quando comparado com a concentração da noscapina. Estas observações podem explicar a alta frequência de aneuploidia em células tratadas com baixas doses de ABZ (Figura 35).

O ABZ foi capaz de interromper a dinâmica do microtúbulo, induzindo a desorganização da tubulina (com formação de fusos mitóticos com vários polos - multipolar), bem como a formação de vários núcleos (multinucleadas) na célula e de centrômeros não alinhados.

Outros estudos também mostraram o efeito do ABZ na inibição da polimerização da tubulina em células de câncer gástrico humano e carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (GHASEMI et al.,

2017; ZHANG et al., 2017). O tratamento das células SGC-7901 (câncer gástrico humano) com ABZ promoveu interrupções na dinâmica do microtúbulo, induzindo a formação de fusos mitotóticos multipolar e células multinucleadas (ZHANG et al., 2017), e esses efeitos também foram observados nesse estudo (Figura 37).

O efeito na distribuição e montagem da tubulina, observados nas células Cal33 (carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço) tratadas com ABZ, mostrou que a tubulina se aglomerou num perfil dose-dependente (GHASEMI et al., 2017). Como está representado na Figura 37, a acumulação da tubulina em células HeLa também foi observada.

Sendo assim, a parada na transição das fases G2 para M provavelmente poderia ter sido resultado da citocinese incompleta após a exposição desse composto que age inibindo a dinâmica do microtúbulo. Apesar de ser descrito que o ABZ tem como mecanismo de ação a inibição da polimerização da tubulina, o efeito desse fármaco mostrou ser completamente diferente do efeito encontrado pelo tratamento com nocodazol, que é um inibidor clássico da polimerização de microtúbulos.

O nocodazol pareceu ter efeito principal na redução do conteúdo de tubulina, que foi reduzido quase que completamente, enquanto que o ABZ pareceu ter seu efeito principal relacionado com a distribuição e organização desta proteína. O efeito do ABZ também foi distinto do taxol, que atuou na estabilização da tubulina e formou aglomerados arredondados, característicos do seu mecanismo de ação, que não foram observados no tratamento com ABZ.

Nesse contexto, sabe-se que os centrossomos (organelas incumbidas da organização dos microtúbulos que atuam como polo do fuso durante a mitose) são fundamentais para uma segregação igual dos cromossomos, pois são responsáveis por contribuírem na formação do fuso bipolar durante a mitose (DOXSEY, 2001). Entretanto, em células tumorais, os centrossomos são responsáveis por prováveis divisões multipolares que podem causar aneuploidia ou morte celular (KWON et al., 2008), uma vez que falhas no controle destas organelas estão associadas a fusos multipolares, aneuploidias, perturbação da polaridade celular e falhas na divisão celular (HENEEN, 1970; NIGG, 2002).

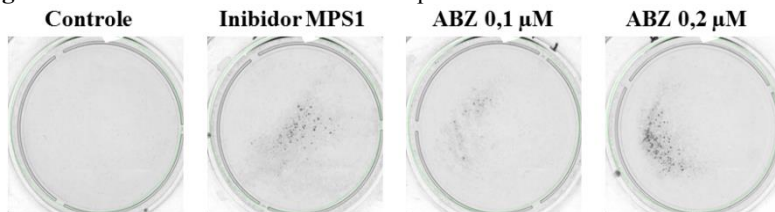
Sendo assim, os efeitos do tratamento do ABZ na dinâmica dos microtúbulos e seu efeito na inibição do fuso mitótico (Figura 37) podem explicar, não apenas a assinatura específica típica do transcriptoma deste fármaco (Figura 36), mas também a eficaz e rápida acumulação de aneuploidia *in vitro* (Figura 35 e 37).

5.17 Análise do tratamento com ABZ na perda de LOH

A LOH foi avaliada devido aos resultados do ciclo celular, do transcriptoma e da dinâmica dos microtúbulos (Figuras 35-37) indicarem, fortemente, que o tratamento com ABZ poderia promover aneuploidias em geral. Neste sentido, se o ABZ assumir a condição de promover aneuploidias, induzindo a missegregação cromossômica, é esperado que a exposição ao tratamento com ABZ estimule a LOH.

No intuito de verificar a influência do ABZ na LOH, foi usada uma abordagem *in vitro* capaz de mensurar diretamente a frequência de LOH (DE WIND, 1998). Os resultados mostraram que as células-tronco embrionárias haplosuficientes para o componente de MMR, o MLH1, tratadas com ABZ apresentaram um aumento no número de colônias resistentes à exposição ao 6-TG. Constatou-se que baixas concentrações de ABZ foram suficientes para induzir a LOH (Figura 38).

Figura 38 - Efeito do ABZ no estímulo da perda de LOH.



As células mES haploinsuficientes para o componente de MMR, o MLH1 ($MLH1^{wt/-}$), foram plaqueadas (10^6 células/placa) e tratadas com ABZ durante 24h, e após 72h, foram expostas ao 6-TG. Células que perderam a atividade de MMR por causa de LOH formaram colônias resistentes ao 6-TG. A reversina ($0,2 \mu M$, potente inibidor de MPS1) foi usada como controle positivo e o meio contendo 1% de DMSO foi usado como controle basal. **Fonte:** Do autor.

Esses resultados mostraram que o ABZ foi capaz de promover a perda alélica e que isso estaria relacionado com a transformação de células proficientes de MMR em células deficientes de MMR. Uma vez que a seleção das colônias é feita com 6-TG, as células proficientes de MMR ($MLH1^{wt/-}$), são especificamente mortas em presença dessa substância, enquanto as células deficientes de MMR ($MLH1^{-/-}$) podem resistir a baixas doses de 6-TG.

O resultado da Figura 38, além de mostrar que o ABZ induziu LOH de forma eficiente em células tronco embriárias de murinos (com apenas 100 nM), mostrou coerência com a elevada frequência de células aneuploides após a exposição ao ABZ, observada no ciclo celular e com

o efeito desse fármaco na dinâmica da tubulina. Segundo Ryland et al. (2015), a LOH é um evento genético comum no desenvolvimento do câncer e é conhecido por estar envolvido na perda somática de alelos em muitas síndromes de câncer hereditárias.

O conjunto de resultados (Figura 35-38) obtido com tratamento com ABZ implicou no questionamento sobre o risco desse fármaco na indução da missegregação cromossômica. Em conjunto, estas observações sugerem a reavaliação da segurança medicamentosa do fármaco em estudo, especialmente para o tratamento profilático anti-helminto de crianças e outros usuários livres de câncer. Essas preocupações se aplicam especialmente a portadores haploinsuficientes de genes supressores tumorais, como *APC* (polipose adenomatosa familiar, FAP), *ATR* (síndrome de Seckel), *BLM* (síndrome de Bloom), *BRCA1/BRCA2* (câncer de mama familiar ou síndrome de câncer de ovário), *MLH1/MSH2* (Síndrome de Lynch), *NF1* (neurofibromatose tipo 1), *RBI* (retinoblastoma familiar) e *TP53* (síndrome de Li-Fraumeni), que são mais suscetíveis ao desenvolvimento tumoral, uma vez que apresentam apenas um alelo de genes específicos.

Por fim, estes resultados foram organizados na forma de dois artigos. Parte desses resultados, organizada para mostrar a possibilidade da reposição do ABZ para o tratamento tumoral, já foi publicada no jornal *Redox Biology*, sob o título “Albendazole as a promising molecule for tumor control” (ANEXO A). Os resultados relacionados com a genotoxicidade deste fármaco foram organizados e submetidos ao jornal *PlosMedicine*, sob o título “Serious drug safety issues associated with the widely used anti-helminth medicine albendazole”(ANEXO B).

6 CONCLUSÃO

Considerando os resultados obtidos de que:

- ✓ O ABZ interagiu com o CT-DNA por intercalação e promoveu danos oxidativos, clivando especificamente o DNA no C-4 da pentose.
- ✓ O tratamento com ABZ induziu citotoxicidade para diversas linhagens celulares tumorais e uma normal (origem humana e murina). Os resultados indicaram que sua toxicidade pode estar relacionada à taxa de proliferação celular, uma vez que as células da linhagem HeLa se mostraram mais sensíveis que U-2 OS e RPE-1.
- ✓ O efeito antiproliferativo em células MCF-7 foi observado após o tratamento com ABZ e MTX, mas o ABZ apresentou um melhor efeito sobre a inibição do crescimento de colônias do que o MTX.
- ✓ A indução de geração de EROs pelo tratamento com ABZ *in vitro* mostrou ser um potencial mecanismo de ação responsável pela sensibilização da linhagem celular MCF-7 e de indução à morte via apoptose. Simultaneamente ao aumento de EROs, houve uma forte redução da viabilidade celular, proliferação e potencial de membrana mitocondrial após o tratamento com ABZ, que em conjunto, indica a provável ativação da morte celular via sinalização de EROs. Entretanto, existem outras vias de sinalização da morte celular, as quais podem estar relacionadas com a inibição da dinâmica de microtúbulos.
- ✓ A administração *in vivo* do ABZ e MTX inibiu o crescimento tumoral e aumentou a sobrevivência dos animais. O MTX apresentou um efeito mais significativo na inibição do crescimento tumoral que o ABZ, provavelmente devido à baixa solubilidade do ABZ. Entretanto, o prolongamento da sobrevivência por esses fármacos ocorreu de forma bastante similar.

- ✓ Os resultados mostraram uma elevação de importantes indicadores de estresse oxidativo (TBARS e PC) e da atividade de enzimas antioxidantes (SOD, CAT e GR). Comitantemente houve uma depleção dos níveis de GSH. O conjunto desses dados indicou uma possível indução do estresse oxidativo em animais tratados com ABZ e MTX. Ainda, foi atribuída uma provável indução da apoptose pelo aumento de EROs ocasionado pelo provável estresse oxidativo observado.
- ✓ O ABZ e o MTX causaram modificações epigenéticas associadas ao dano ao DNA, os quais foram observados pelo aumento no índice de dano ao DNA das células do TAE, indicativo de fragmentação no DNA. Ainda, ambos os fármacos aumentaram a expressão da proteína H2AX fosforilada (γ H2AX), revelando o seu efeito na clivagem da dupla fita de DNA.
- ✓ O ABZ aumentou o índice de morte celular por apoptose sem induzir necrose, confirmados pela maior expressão de proteínas pró-apoptóticas (p53 e Bax) e da correlação Bax/Bcl-xL, enquanto o MTX aumentou índice de morte celular por apoptose e necrose.
- ✓ O ABZ e o MTX agiram sobre o ciclo celular, uma vez que primeiro aprisionou as células em G2/M, e o segundo reduziu a fase S. Além disso, os dois fármacos aumentaram a fase sub G1. Entretanto, o MTX causou um aumento mais expressivo, provavelmente devido ao fato desse quimioterápico ativar a sinalização de morte celular por apoptose e necrose, enquanto o ABZ induziu apenas a apoptose.
- ✓ O ABZ apesar de intercalar o DNA não apresentou nenhum impacto marcante nos processos de replicação e transcrição.
- ✓ O ABZ apresentou um forte efeito na inibição mitótica, explicando a sua assinatura típica no transcriptoma de células de linfoma e o rápido acúmulo de aneuploidia *in vitro*.

- ✓ As análises de citometria de fluxo e do ensaio de LOH revelaram que pequenas concentrações farmacológicas de ABZ são muito eficazes na indução de uma missegregação cromossômica.
- ✓ Consistente com o perfil específico do transcriptoma do ABZ, células expostas a esse fármaco tiveram uma parada na transição do ciclo celular em G2/M de forma dose-dependente. A parada no ciclo celular foi associada a um marcado aumento também dose-dependente, na frequência de células viáveis com aneuploidias cromossomais.
- ✓ O ABZ é um potente inibidor do fuso mitótico em helmintos e mamíferos. Dessa forma, o ABZ inibe fortemente a polimerização de tubulina em cultivo celular murino e humano.
- ✓ O ABZ promoveu impacto na polimerização de tubulina de humanos, assim como na despolimerização e na dinâmica do fuso, apresentando toxicidade no complexo do fuso mitótico.
- ✓ O ABZ eficientemente induziu a LOH em células tronco embrionárias murinas.

Pode-se concluir que:

- I. Foi revelado um efeito antitumoral significativo do ABZ, mostrando que esse composto pode constituir uma molécula protótipo na pesquisa para o reposicionamento deste fármaco para a terapia antitumoral, em especial a do câncer de mama.
- II. O efeito genotóxico do ABZ sugere que a segurança farmacêutica deste anti-helmíntico necessita ser reavaliada.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. H.; ALITALO, K. Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 8, n. 6, p. 464-478, Jun. 2007. ISSN 1471-0072. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrm2183>>.
- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods Enzymol**, v. 105, p. 121-126, 1984. ISSN 0076-6879. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6727660>>.
- AITHAL, B. K. et al. Juglone, a naphthoquinone from walnut, exerts cytotoxic and genotoxic effects against cultured melanoma tumor cells. **Cell Biol Int**, v. 33, n. 10, p. 1039-1049, Oct. 2009. ISSN 1095-8355. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19555768>>.
- AKTIPIŞ, C. A. et al. Cancer across the tree of life: cooperation and cheating in multicellularity. **Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.**, v. 370, n. 1673, p.1-21, 2015. Disponível em: <<http://rstb.royalsocietypublishing.org/content/370/1673/20140219.abstract>>.
- ALBERTS, B. et al. *Biologia molecular da célula*. 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.
- ALTINTAS, N. et al. Karaciger kist hidatigi tedavisinde albendazol kullanan hastalarda kardes kromatid degisimi (KKD) Calismasi **Turkiye Parazitoloj Derg**, v. 29, n. 4 p. 235-237, 2005.
- AMARAL, J. D. et al. The role of p53 in apoptosis. **Discov Med.**, v. 9, n. 45, p. 145-152, 2010. Disponível em: <<http://www.discoverymedicine.com/Joana-D-Amaral/2010/02/20/the-role-of-p53-in-apoptosis/>>.
- AMATO NETO, V. et al. Tratamento da ancilostomíase, ascaridíase e tricocefatiase por meio do albendazol ou do mebendazol. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 25, n. 6, p. 294-299, 1983a.
- AMATO NETO, V. et al. Tratamento da ancilostomíase por meio do albendazol. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 25, n. 1, p. 42-46, 1983b.

AMATO NETO, V. et al. Demarcação da atividade anti-helmíntica do albendazol. Estudo referente à estrogiloidíase humana. **Rev. Inst. Med. Trop.** São Paulo, v. 27, n. 2, p. 95-98, 1985.

ARANHA, O.; WOOD, D. P.; SARKAR, F. H. Ciprofloxacin mediated cell growth inhibition, S/G2-M cell cycle arrest, and apoptosis in a human transitional cell carcinoma of the bladder cell line. **Clin Cancer Res**, v. 6, n. 3, p. 891-900, Mar. 2000. ISSN 1078-0432. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10741713>>.

ARORA, S. et al. Novel microtubule polymerization inhibitor with potent anti-proliferative and anti-tumor activity. **Cancer Research**, v. 69, n. 5, p. 1910-1915, **Fev.** 2009. ISSN 0008-5472/1538-7445. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2742177/>>.

AYALA, A.; MUÑOZ, M. F.; ARGÜELLES, S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2014, p. 1-31, 2014. ISSN 1942-0994. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24999379>>.

BABIÁK, R. M. et al. Methotrexate: pentose cycle and oxidative stress. **Cell Biochem Funct**, v. 16, n. 4, p. 283-293, Dec. 1998. ISSN 0263-6484. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9857491>>.

BAI, R. Y. et al. Antiparasitic mebendazole shows survival benefit in 2 preclinical models of glioblastoma multiforme. **Neuro Oncol**, v. 13, n. 9, p. 974-982, Sep 2011. ISSN 1523-5866. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21764822>>.

BANDYOPADHYAY, S. et al. Cytotoxicity of Senecio in macrophages is mediated via its induction of oxidative stress. **Res Vet Sci**, v. 87, n. 1, p. 85-90, Aug. 2009. ISSN 1532-2661. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19195669>>.

BARRERA, G. Oxidative stress and lipid peroxidation products in cancer progression and therapy. **ISRN Oncol**, v. 2012, p. 137289, 2012. ISSN 2090-567X. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23119185>>.

BARROWMAN, M. M.; MARRINER, S. E.; BOGAN, J. A. The fumarate reductase system as a site of anthelmintic attack in *Ascaris suum*. **Biosci Rep**, v. 4, n. 10, p. 879-883, Oct. 1984. ISSN 0144-8463. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6518278>>.

BARZILAI, A.; YAMAMOTO, K. DNA damage responses to oxidative stress. **DNA Repair (Amst)**, v. 3, n. 8-9, p. 1109-1115, 2004 Aug.-Sep. 2004. ISSN 1568-7864. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15279799>>.

BATIST, G.; TULPULÉ, A.; SINHA, B. K. Overexpression of a novel anionic glutathione transferase in multidrug-resistant human breast cancer cells. **J Biol Chem**, vol. 261, n. 33, p. 15544-15549, 1986.

BATISTA, A. P. et al. Melatonin effect on the ultrastructure of Ehrlich ascites tumor cells, lifetime and histopathology in Swiss mice. **Life Sci**, v. 93, n. 23, p. 882-888, Nov. 2013. ISSN 1879-0631. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24383083>>.

BAYNES, J. W.; DOMINICZAK, M. H. *Bioquímica Médica*. 3ª Ed. Rio de Janeiro: Editora Elsevier, 2010. ISBN: 978-85-352-3561-6

BEHL, C.; ZIEGLER, C. Cell Cycle: The Life Cycle of a Cell. In: (Ed.). *Cell Aging: Molecular Mechanisms and Implications for Disease*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2014. p.9-19. ISBN 978-3-642-45179-9.

BEN-ZVI, I. et al. Hydroxychloroquine: from malaria to autoimmunity. **Clin Rev Allergy Immunol**, v. 42, n. 2, p. 145-153, Apr. 2012. ISSN 1559-0267. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21221847>>.

BENCHIMOL, S. p53-dependent pathways of apoptosis. **Cell Death Differ**, v. 8, n. 11, p. 1049-1051, Nov. 2001. ISSN 1350-9047.
Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11687883>>.

BERNSTEIN, C. et al. "Chapter 16: DNA damage, DNA repair and cancer". New research Directions in DNA repair. Editado por Clark Chen. Licença CC BY 3.0. In tech, 2013. ISBN 978-953-51-1114-6.
Disponível em:
<<http://www.intechopen.com/books/export/citation/EndNote/new-research-directions-in-dna-repair/dna-damage-dna-repair-and-cancer>>.

BEUTLER, E.; DURON, O.; KELLY, B. M. Improved method for the determination of blood glutathione. **J Lab Clin Med**, v. 61, p. 882-888, May. 1963. ISSN 0022-2143. Disponível em:
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13967893>>.

BIRBEN, E. et al. Oxidative stress and antioxidant defense. **World Allergy Organ J**, v. 5, n. 1, p. 9-19, Jan. 2012. Disponível em:
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23268465>>.

BIRD, R. P.; DRAPER, H. H. Comparative studies on different methods of malonaldehyde determination. **Methods Enzymol**, v. 105, p. 299-305, 1984. ISSN 0076-6879. Disponível em:
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6727668>>.

BISCHOFF, G.; HOFFMANN, S. DNA-binding of drugs used in medicinal therapies. **Curr Med Chem**, v. 9, n. 3, p. 312-348, Feb. 2002. ISSN 0929-8673. Disponível em:
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11860361>>.

BOUWMAN, P.; JONKERS, J. The effects of deregulated DNA damage signalling on cancer chemotherapy response and resistance. **Nat Rev Cancer**, v. 12, n. 9, p. 587-598, Set. 2012. ISSN 1474-175X.
Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrc3342>>.

BOVERIS, A. et al. Increased chemiluminescence and superoxide production in the liver of chronically ethanol-treated rats. **Arch Biochem Biophys**, v. 227, n. 2, p. 534-541, Dec. 1983. ISSN 0003-9861. Disponível em:
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6320728>>.

BRUNE, W.; ANDONIOU, C. E. Die Another Day: Inhibition of Cell Death Pathways by Cytomegalovirus. **Viruses**, v. 9, n. 9, p.1-17, Sep. 2017. ISSN 1999-4915. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28869497>>.

BURLINSON, B. et al. Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: Results of the in vivo Comet assay workgroup. **Mutat Res Genet Toxicol and Environ Mutagen**, v. 627, n. 1, p. 31-35, 2007. ISSN 1383-5718. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1383571806003688>>.

CALDERON, P. B. et al. Potential therapeutic application of the association of vitamins C and K3 in cancer treatment. **Curr Med Chem**, v. 9, n. 24, p. 2271-2285, Dec. 2002. ISSN 0929-8673. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12470246>>.

CARLBERG, I.; SAHLMAN, L.; MANNERVIK, B. The effect of 2,4,6-trinitrobenzenesulfonate on mercuric reductase, glutathione reductase and lipoamide dehydrogenase. **FEBS Lett**, v. 180, n. 1, p. 102-106, Jan. 1985. ISSN 0014-5793. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3917936>>.

CASTEDO, M. et al. Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. **Oncogene**, v. 23, n. 16, p. 2825-2837, Apr. 2004. ISSN 0950-9232. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15077146>>.

CASTRO, L. S. et al. Albendazole as a promising molecule for tumor control. **Redox Biol**, v. 10, p. 90-99, Dec. 2016. ISSN 2213-2317. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27710854>>.

CHAKRAPANI, H. et al. Synthesis, mechanistic studies, and anti-proliferative activity of glutathione/glutathione S-transferase-activated nitric oxide prodrugs. **Bioorg Med Chem**, v. 16, n. 22, p. 9764-9771, Nov. 2008. ISSN 1464-3391. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18930407>>.

CHEN, J. et al. Morphological and genetic characterization of a cultivated *Cordyceps sinensis* fungus and its polysaccharide component possessing antioxidant property in H22 tumor-bearing mice. **Life Sci**, v. 78, n. 23, p. 2742-2748, May 2006. ISSN 0024-3205. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16492382>>.

CHEN, W. et al. Determination of thiols and disulfides via HPLC quantification of 5-thio-2-nitrobenzoic acid. **J Pharm Biomed Anal**, v. 48, n.5, p. 1375-1380, Dec. 2008. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2684446/#R13>>.

CHIANG, A. C.; MASSAGUÉ, J. Molecular Basis of Metastasis. **N Engl J Med**, v. 359, n. 26, p. 2814-2823, 2008. ISSN 0028-4793 1533-4406. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4189180/>>.

CHU, S. W. et al. Potent inhibition of tubulin polymerisation and proliferation of paclitaxel-resistant 1A9PTX22 human ovarian cancer cells by albendazole. **Anticancer Res**, v. 29, n. 10, p. 3791-3796, Oct. 2009. ISSN 1791-7530. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19846910>>.

CIRCU, M. L.; AW, T. Y. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. **Free Radic Biol Med**, v. 48, n. 6, p. 749-762, Mar. 2010. ISSN 1873-4596. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20045723>>.

CONKLIN, K. A. Chemotherapy-associated oxidative stress: impact on chemotherapeutic effectiveness. **Integr Cancer Ther**, v. 3, n. 4, p. 294-300, Dec. 2004. ISSN 1534-7354. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15523100>>.

COOPER, G. M. "Chapter 14: The eukaryotic cell cycle". The cell: a molecular approach. 2nd ed. Washington: D.C: ASM Press, 2000.

CORY, S.; HUANG, D. C.; ADAMS, J. M. The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. **Oncogene**, v. 22, n. 53, p. 8590-8607, Nov. 2003. ISSN 0950-9232. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14634621>>.

CUI, Y.; KIM, D. S.; PARK, K. C. Antioxidant effect of *Inonotus obliquus*. **J Ethnopharmacol**, v. 96, n. 1-2, p. 79-85, Jan. 2005. ISSN 0378-8741. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15588653>>.

DA SILVEIRA, V. C. et al. Binding of oxindole-Schiff base copper(II) complexes to DNA and its modulation by the ligand. **J Inorg Biochem**, v. 105, n. 12, p. 1692-1703, Dec. 2011. ISSN 1873-3344. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22099472>>.

DALLE-DONNE, I. et al. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. **Clin Chim Acta**, v. 329, n. 1-2, p. 23-38, Mar. 2003. ISSN 0009-8981. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12589963>>.

DALLEAU, S. et al. Cell death and diseases related to oxidative stress: 4-hydroxynonenal (HNE) in the balance. **Cell Death Differ**, v. 20, n. 12, p. 1615-1630, Dec. 2013. ISSN 1476-5403. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24096871>>.

DALY, O. M. et al. CEP164-null cells generated by genome editing show a ciliation defect with intact DNA repair capacity. **J Cell Sci**, v. 129, n. 9, p. 1769-1774, May 2016. ISSN 1477-9137. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26966185>>.

DAYAN, A. D. Albendazole, mebendazole and praziquantel. Review of non-clinical toxicity and pharmacokinetics. **Acta Trop**, v. 86, n. 2-3, p. 141-159, May 2003. ISSN 0001-706X. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12745134>>.

DE WIND, N. et al. Mouse models for hereditary nonpolyposis colorectal cancer. **Cancer Res**, v. 58, n. 2, p. 248-255, Jan. 1998. ISSN 0008-5472. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9443401>>.

DEEB, D. et al. Inhibition of cell proliferation and induction of apoptosis by CDDO-Me in pancreatic cancer cells is ROS-dependent. **J Exp Ther Oncol**, v. 10, n. 1, p. 51-64, 2012. ISSN 1359-4117. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22946344>>.

DENG, G.; CASSILETH, B. Complementary or alternative medicine in cancer care[mdash]myths and realities. **Nat Rev Clin Oncol**, v. 10, n. 11, p. 656-664, Nov. 2013. ISSN 1759-4774. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrclinonc.2013.125>>.

DHILLON, H.; CHIKARA, S.; REINDL, K. M. Piperlongumine induces pancreatic cancer cell death by enhancing reactive oxygen species and DNA damage. **Toxicol Rep**, v. 1, p. 309-318, 2014. ISSN 2214-7500. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25530945>>.

DIETLEIN, F.; THELEN, L.; REINHARDT, H. C. Cancer-specific defects in DNA repair pathways as targets for personalized therapeutic approaches. **Trends Genet**, v. 30, n. 8, p. 326-339, Aug. 2014. ISSN 0168-9525. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25017190>>.

DING, S. et al. Redox Regulation in Cancer Stem Cells. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2015, p. 1-11, 2015. ISSN 1942-0994. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26273424>>.

DITCH, S.; PAULL, T. T. The ATM protein kinase and cellular redox signaling: beyond the DNA damage response. **Trends Biochem Sci**, v. 37, n. 1, p. 15-22, Jan. 2012. ISSN 0968-0004. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22079189>>.

DOBROSOTSKAYA, I. Y. et al. Mebendazole monotherapy and long-term disease control in metastatic adrenocortical carcinoma. **Endocr Pract**, v. 17, n. 3, p. e59-62, 2011 May-Jun. 2011. ISSN 1934-2403. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21454232>>.

DONG, C. H.; YAO, Y. J. In vitro evaluation of antioxidant activities of aqueous extracts from natural and cultured mycelia of *Cordyceps sinensis*. **LWT - Food science and technology**, v. 41, n. 4, p. 669-677, 2008. ISSN 0023-6438. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002364380700182X>>.

DOUDICAN, N. A. et al. XIAP downregulation accompanies mebendazole growth inhibition in melanoma xenografts. **Anticancer Drugs**, v. 24, n. 2, p. 181-188, Feb. 2013. ISSN 1473-5741. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23059386>>.

DOXSEY, S. Re-evaluating centrosome function. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 2, n. 9, p. 688-698, Sep. 2001. ISSN 1471-0072. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11533726>>.

EHTEDA, A. et al. Complexation of albendazole with hydroxypropyl- β -cyclodextrin significantly improves its pharmacokinetic profile, cell cytotoxicity and antitumor efficacy in nude mice. **Anticancer Res**, v. 32, n. 9, p. 3659-3666, Sep. 2012. ISSN 1791-7530. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22993303>>.

ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicol Pathol**, v. 35, n. 4, p. 495-516, Jun. 2007. ISSN 0192-6233. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17562483>>.

FAN, G. J. et al. 4,4'-Dihydroxy-trans-stilbene, a resveratrol analogue, exhibited enhanced antioxidant activity and cytotoxicity. **Bioorg Med Chem**, v. 17, n. 6, p. 2360-2365, Mar. 2009. ISSN 1464-3391. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19251420>>.

FELIPE, K. B. et al. Antiproliferative effects of phenylaminonaphthoquinones are increased by ascorbate and associated with the appearance of a senescent phenotype in human bladder cancer cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 433, n. 4, p. 573-578, Apr. 2013. ISSN 1090-2104. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23523795>>.

FESTJENS, N.; VANDEN BERGHE, T.; VANDENABEELE, P. Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: signalling cascades, important mediators and concomitant immune response. **Biochim Biophys Acta**, v. 1757, n. 9-10, p. 1371-1387, Sep.-Oct. 2006. ISSN 0006-3002. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16950166>>.

FINK, S. L.; COOKSON, B. T. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. **Infect Immun**, v. 73, n. 4, p. 1907-1916, Apr. 2005. ISSN 0019-9567. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15784530>>.

FINKEL, T. Signal transduction by reactive oxygen species. **J Cell Biol**, v. 194, n. 1, p. 7-15, Jul. 2011. ISSN 1540-8140. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21746850>>.

FLOYD, S.; PINES, J.; LINDON, C. APC/C Cdh1 targets aurora kinase to control reorganization of the mitotic spindle at anaphase. **Curr Biol**, v. 18, n. 21, p. 1649-1658, Nov. 2008. ISSN 0960-9822. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18976910>>.

FRASIER, C. R. et al. Redox-dependent increases in glutathione reductase and exercise preconditioning: role of NADPH oxidase and mitochondria. **Cardiovasc Res**, v. 98, n. 1, p. 47-55, Apr. 2013. ISSN 1755-3245. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23341578>>.

FRIDMAN, J. S.; LOWE, S. W. Control of apoptosis by p53. **Oncogene**, v. 22, n. 56, p. 9030-9040, Dec. 2003. ISSN 0950-9232. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14663481>>.

GALDERISI, U.; JORI, F. P.; GIORDANO, A. Cell cycle regulation and neural differentiation. **Oncogene**, v. 22, n. 33, p. 5208-5219, 2003. ISSN 0950-9232. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1206558>>.

GHASEMI, F. et al. Repurposing Albendazole: new potential as a chemotherapeutic agent with preferential activity against HPV-negative head and neck squamous cell cancer. **Oncotarget**, Apr 2017. ISSN 1949-2553. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28488581>>.

GLORIEUX, C. et al. Catalase overexpression in mammary cancer cells leads to a less aggressive phenotype and an altered response to chemotherapy. **Biochem Pharmacol**, v. 82, n. 10, p. 1384-1390, Nov. 2011. ISSN 1873-2968. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21689642>>.

GOLSTEIN, P.; KROEMER, G. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. **Trends Biochem Sci**, v. 32, n. 1, p. 37-43, Jan. 2007. ISSN 0968-0004. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17141506>>.

GORRINI, C.; HARRIS, I. S.; MAK, T. W. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. **Nat Rev Drug Discov**, v. 12, n. 12, p. 931-947, Dec. 2013. ISSN 1474-1784. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24287781>>.

GRINEVICIUS, V. M. A. S. et al. Piper nigrum ethanolic extract rich in piperamides causes ROS overproduction, oxidative damage in DNA leading to cell cycle arrest and apoptosis in cancer cells. **J Ethnopharmacol**, v. 189, p. 139-147, Aug. 2016. ISSN 1872-7573. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27178634>>.

GUPTA, S. C. et al. Cancer drug discovery by repurposing: teaching new tricks to old dogs. **Trends Pharmacol Sci**, v. 34, n. 9, p. 508-517, Sep. 2013. ISSN 1873-3735. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23928289>>.

HAJDU, S. I. A note from history: landmarks in history of cancer, part 1. **Cancer**, v. 117, n. 5, p. 1097-1102, Mar. 2011. ISSN 0008-543X. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20960499>>.

HAYASHI, M. T.; KARLSEDER, J. DNA damage associated with mitosis and cytokinesis failure. **Oncogene**, v. 32, n. 39, p. 4593-4601, Sep. 2013. ISSN 1476-5594. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23318447>>.

HENEEN, W. K. In situ analysis of normal and abnormal patterns of the mitotic apparatus in cultured rat-kangaroo cells. **Chromosoma**, v. 29, n. 1, p. 88-117, 1970. ISSN 0009-5915. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4190066>>.

HESS, J. A.; KHASAWNEH, M. K. Cancer metabolism and oxidative stress: Insights into carcinogenesis and chemotherapy via the non-dihydrofolate reductase effects of methotrexate. **BBA Clin**, v. 3, p. 152-161, Jun. 2015. ISSN 2214-6474. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26674389>>.

HETTIARACHCHI, G. et al. Acyclic cucurbit[n]uril-type molecular container enables systemic delivery of effective doses of albendazole for treatment of SK-OV-3 xenograft tumors. **Mol Pharm**, v. 13, n. 3, p. 809-818, Mar. 2016. ISSN 1543-8392. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26756920>>.

HOCHEGGER, H.; TAKEDA, S.; HUNT, T. Cyclin-dependent kinases and cell-cycle transitions: does one fit all? **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 9, n. 11, p. 910-916, Nov. 2008. ISSN 1471-0072. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrm2510>>.

HOLLAND, A. J.; CLEVELAND, D. W. Boveri revisited: chromosomal instability, aneuploidy and tumorigenesis. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 10, n. 7, p. 478-487, Jul. 2009. ISSN 1471-0080. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19546858>>.

HOSOYA, N.; MIYAGAWA, K. Targeting DNA damage response in cancer therapy. **Cancer Sci**, v. 105, n. 4, p. 370-388, Apr. 2014. ISSN 1349-7006. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24484288>>.

HOU, Z. J. et al. Flubendazole, FDA-approved anthelmintic, targets breast cancer stem-like cells. **Oncotarget**, v. 6, n. 8, p. 6326-6340, Mar. 2015. ISSN 1949-2553. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25811972>>.

IMLAY, J. A.; CHIN, S. M.; LINN, S. Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction in vivo and in vitro. **Science**, v. 240, n. 4852, p. 640-642, Apr. 1988. ISSN 0036-8075. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2834821>>.

INCA. **ABC do câncer : abordagens básicas para o controle do câncer**. Rio de Janeiro 2011.

INCA. **Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil**. . VIGILÂNCIA, C. D. P. E. Rio de Janeiro 2014.

INCA. **Estimativa | 2016 Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro 2015.

ISRAELS, E. D.; ISRAELS, L. G. The cell cycle. **Stem Cells**, v. 19 n. 1, p. 88-91, 2001.

JOE, A. K. et al. Resveratrol induces growth inhibition, S-phase arrest, apoptosis, and changes in biomarker expression in several human cancer cell lines. **Clin Cancer Res**, v. 8, n. 3, p. 893-903, Mar. 2002. ISSN 1078-0432. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11895924>>.

JUN, T.; BOCHU, W.; LIANCAI, Z. Hydrolytic cleavage of DNA by quercetin manganese(II) complexes. **Colloids Surf B Biointerfaces**, v. 55, n. 2, p. 149-152, Apr. 2007. ISSN 0927-7765. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17234390>>.

KANNAN, K.; JAIN, S. K. Oxidative stress and apoptosis. **Pathophysiology**, v. 7, n. 3, p. 153-163, Sep. 2000. ISSN 0928-4680. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10996508>>.

KASTAN, M. B.; BARTEK, J. Cell-cycle checkpoints and cancer. **Nature**, v. 432, n. 7015, p. 316-323, Nov. 2004. ISSN 1476-4687. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15549093>>.

KAUFMANN, S. H.; EARNSHAW, W. C. Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. **Exp Cell Res**, v. 256, n. 1, p. 42-49, Apr. 2000. ISSN 0014-4827. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10739650>>.

KEHRER, J. P. Cause-effect of oxidative stress and apoptosis. **Teratology**, v. 62, n. 4, p. 235-236, Oct. 2000. ISSN 0040-3709. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10992267>>.

KHALIL, D. N. et al. The future of cancer treatment: immunomodulation, CARs and combination immunotherapy. **Nat Rev Clin Oncol**, v. 13, n. 5, p. 273-290, 2016. ISSN 1759-4774. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrclinonc.2016.25>>.

KHALILZADEH, A. et al. Epothilone-paclitaxel resistant leukemic cells CEM/dEpoB300 are sensitive to albendazole: Involvement of apoptotic pathways. **Biochem Pharmacol**, v. 74, n. 3, p. 407-414, Aug. 2007. ISSN 0006-2952. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17560963>>.

KIM, M. et al. Selective cytotoxicity of synthesized procyanidin 3-O-galloylepicatechin-4b, 8-3-O-galloylcatechin to human cancer cells. **Cell Cycle**, v. 7, n. 11, p. 1648-1657, Jun. 2008. ISSN 1551-4005. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18560275>>.

KIRKLAND, D. et al. Updated recommended lists of genotoxic and non-genotoxic chemicals for assessment of the performance of new or improved genotoxicity tests. **Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen**, v. 795, p. 7-30, Jan. 2016. ISSN 1879-3592. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26774663>>.

KOŽURKOVÁ, M. et al. Cytotoxic activity of proflavine diureas: Synthesis, antitumor, evaluation and DNA binding properties of 1',1''-(acridin-3,6-diyl)-3',3''-dialkyldiureas. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 7, p. 3976-3984, 2008. ISSN 0968-0896. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0968089608000436>>.

KRÁLOVÁ, V. et al. Antiproliferative effect of benzimidazole anthelmintics albendazole, ricobendazole, and flubendazole in intestinal cancer cell lines. **Anticancer Drugs**, v. 24, n. 9, p. 911-919, Oct. 2013. ISSN 1473-5741. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23884106>>.

KRÁLOVÁ, V. et al. Flubendazole induces mitotic catastrophe and senescence in colon cancer cells in vitro. **J Pharm Pharmacol**, v. 68, n. 2, p. 208-218, Feb. 2016. ISSN 2042-7158. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26730435>>.

KROEMER, G. et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. **Cell Death Differ**, v. 16, n. 1, p. 3-11, Jan. 2009. ISSN 1476-5403. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18846107>>.

KRYSKO, D. V. et al. Apoptosis and necrosis: detection, discrimination and phagocytosis. **Methods**, v. 44, n. 3, p. 205-221, Mar. 2008. ISSN 1046-2023. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18314051>>.

KVIECINSKI, M. R. et al. Study of the antitumor potential of *Bidens pilosa* (Asteraceae) used in Brazilian folk medicine. **J Ethnopharmacol**, v. 117, n. 1, p. 69-75, Apr. 2008. ISSN 0378-8741. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18342465>>.

KVIECINSKI, M. R. et al. Inhibition of cell proliferation and migration by oxidative stress from ascorbate-driven juglone redox cycling in human bladder-derived T24 cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 421, n. 2, p. 268-273, May 2012. ISSN 1090-2104. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22507983>>.

KWON, M. et al. Mechanisms to suppress multipolar divisions in cancer cells with extra centrosomes. **Genes Dev**, v. 22, n. 16, p. 2189-2203, Aug. 2008. ISSN 0890-9369. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18662975>>.

LACEY, E. The role of the cytoskeletal protein, tubulin, in the mode of action and mechanism of drug resistance to benzimidazoles. **Int J Parasitol**, v. 18, n. 7, p. 885-936, Nov. 1988. ISSN 0020-7519. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3066771>>.

LAHTZ, C.; PFEIFER, G. P. Epigenetic changes of DNA repair genes in cancer. **J Mol Cell Biol**, v. 3, n. 1, p. 51-58, Feb. 2011. ISSN 1759-4685. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21278452>>.

LANGE, S. S.; TAKATA, K.; WOOD, R. D. DNA polymerases and cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 11, n. 2, p. 96-110, Feb. 2011. ISSN 1474-1768. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21258395>>.

LANGERAK, P. et al. A/T mutagenesis in hypermutated immunoglobulin genes strongly depends on PCNA^{K164} modification. **J. Exp. Med**, v. 204, n. 8, p. 1989-1998, 2007. Disponível em: <<http://jem.rupress.org/content/204/8/1989.abstract>>.

LEE, W. et al. Depletion of mitochondrial DNA up-regulates the expression of MDR1 gene via an increase in mRNA stability. **Exp Mol Med**, v. 40, n. 1, p. 109-117, Feb. 2008. ISSN 1226-3613. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18305404>>.

LENS, S. M.; VOEST, E. E.; MEDEMA, R. H. Shared and separate functions of polo-like kinases and aurora kinases in cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 10, n. 12, p. 825-841, Dec. 2010. ISSN 1474-1768. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21102634>>.

LEVINE, R. L. et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. **Methods Enzymol**, v. 186, p. 464-478, 1990. ISSN 0076-6879. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1978225>>.

LI, Y. et al. Chemoprotective effects of Curcuma aromatica on esophageal carcinogenesis. **Ann Surg Oncol**, v. 16, n. 2, p. 515-523, Feb. 2009. ISSN 1534-4681. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19018598>>.

LIU, F. T. et al. Increase in the ratio of mitochondrial Bax/Bcl-XL induces Bax activation in human leukemic K562 cell line. **Apoptosis**, v. 9, n. 3, p. 377-384, May 2004. ISSN 1360-8185. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15258470>>.

LOCATELLI, C. et al. A comparative study of albendazole and mebendazole-induced, time-dependent oxidative stress. **Redox Rep.**, v. 9, n. 2, p. 89-95, 2004. ISSN 1351-0002. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15231063>>.

LODISH, H. F., et al. Molecular Cell Biology, 5th ed. Scientific American Press, N.Y. (2004).

LORD, C. J.; ASHWORTH, A. The DNA damage response and cancer therapy. **Nature**, v. 481, n. 7381, p. 287-294, Jan. 2012. ISSN 1476-4687. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22258607>>.

LOTAN, R.; LOTAN, D.; RAZ, A. Inhibition of tumor cell colony formation in culture by a monoclonal antibody to endogenous lectins. **Cancer Res**, v. 45, n. 9, p. 4349-4353, Sep. 1985. ISSN 0008-5472. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4028019>>.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem**, v. 193, n. 1, p. 265-275, Nov. 1951. ISSN 0021-9258. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14907713>>.

LUSHCHAK, V. I. Glutathione homeostasis and functions: potential targets for medical interventions. **J Amino Acids**, v. 2012, p. 1-26, 2012. ISSN 2090-0112. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1155/2012/736837>>.

MALUMBRES, M.; BARBACID, M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. **Nat Rev Cancer**, v. 9, n. 3, p. 153-166, Mar. 2009. ISSN 1474-1768. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19238148>>.

MANDAL, S. et al. Antioxidants: A Review. **J Chem and Pharm Res**, v. 1, n.1, p. 102-104, 2009.

MANIC, G. et al. Chloroquine and hydroxychloroquine for cancer therapy. **Mol Cell Oncol**, v. 1, n. 1, p. e29911, 2014. ISSN 2372-3556. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27308318>>.

MANJU, V.; NALINI, N. Chemopreventive efficacy of ginger, a naturally occurring anticarcinogen during the initiation, post-initiation stages of 1,2 dimethylhydrazine-induced colon cancer. **Clin Chim Acta**, v. 358, n. 1-2, p. 60-67, Aug. 2005. ISSN 0009-8981. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16018877>>.

MANTOVANI, A. The role of multigeneration studies in safety assessment of residues of veterinary drugs and additives. **Ann Ist Super Sanita**, v. 28, n. 4, p. 429-435, 1992. ISSN 0021-2571. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1303033>>.

MARIANTE, R. M. et al. Giardia lamblia: evaluation of the in vitro effects of nocodazole and colchicine on trophozoites. **Exp Parasitol**, v. 110, n. 1, p. 62-72, May 2005. ISSN 0014-4894. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15804380>>.

MARQUES, M. P.; TAKAYANAGUI, O. M.; LANCHOTE, V. L. Albendazole metabolism in patients with neurocysticercosis: antipyrine as a multifunctional marker drug of cytochrome P450. **Braz J Med Biol Res**, v. 35, n. 2, p. 261-269, Feb. 2002. ISSN 0100-879X. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11847531>>.

MARTÍNEZ-ESPINOSA, R. et al. Albendazole induces oxidative stress and DNA damage in the parasitic protozoan *Giardia duodenalis*. **Front Microbiol**, v. 6, p. 1-14, 2015. ISSN 1664-302X. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26300866>>.

MASSAGUÉ, J.; OBENAUF, A. C. Metastatic colonization by circulating tumour cells. **Nature**, v. 529, n. 7586, p. 298-306, 2016. ISSN 0028-0836. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nature17038>>.

MCFARLAND, A. J. et al. Molecular mechanisms underlying the effects of statins in the central nervous system. **Int J Mol Sci**, v. 15, n. 11, p. 20607-20637, Nov. 2014. ISSN 1422-0067. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25391045>>.

MCGAHON, A. J. et al. The end of the (cell) line: methods for the study of apoptosis in vitro. **Methods Cell Biol**, v. 46, p. 153-185, 1995. ISSN 0091-679X. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7541883>>.

MEDINDIA base de dados. Drug "Albendazole" Price list. Disponível em: <<http://www.medindia.net/drug-price/albendazole.htm>>.

MILELLA, M.; CIUFFREDA, L.; BRIA, E. Signal Transduction Pathways as therapeutic targets in cancer therapy. In: REDDY, L. H. e COUVREUR, P. (Ed.). *Macromolecular Anticancer Therapeutics*. New York, NY: Springer New York, 2010. p. 37-83. ISBN 978-1-4419-0507-9.

MILLER, D. M. et al. c-Myc and cancer metabolism. **Clin Cancer Res**, v. 18, n. 20, p. 5546-5553, Oct. 2012. ISSN 1078-0432. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23071356>>.

MISALE, S. et al. Vertical suppression of the EGFR pathway prevents onset of resistance in colorectal cancers. **Nature Communications**, v. 6, n. 8305, p.1-9, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/ncomms9305>>.

MISRA, H. P.; FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **J Biol Chem**, v. 247, n. 10, p. 3170-3175, May 1972. ISSN 0021-9258. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4623845>>.

MOLDOVAN, L.; MOLDOVAN, N. I. Oxygen free radicals and redox biology of organelles. **Histochem Cell Biol**, v. 122, n. 4, p. 395-412, Oct. 2004. ISSN 0948-6143. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15452718>>.

MOLINA, A. J. et al. Absorption and metabolism of albendazole after intestinal ischemia/reperfusion. **Eur J Pharm Sci**, v. 31, n. 1, p. 16-24, May 2007. ISSN 0928-0987. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17350811>>.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, Dec. 1983. ISSN 0022-1759. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6606682>>.

MUSA, M.; KANNAN, T. P.; MUSTAFA, S. Cell Proliferation Study of Human Osteosarcoma Cell Line (U2OS) using Alamar Blue Assay and Live Cell Imaging. **IOSR-JDMS**, v. 8, n. 2, p. 60-65, Jul.-Aug. 2013. e-ISSN 2279-0853.

NAGY, J. et al. Effect of grapefruit juice or cimetidine coadministration on albendazole bioavailability. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 66, n. 3, p. 260-263, 2002. Disponível em: <<http://www.ajtmh.org/content/journals/10.4269/ajtmh.2002.66.260>>.

NATURE EDUCATION. Cell division and cancer (2010). Disponível em: <<https://www.nature.com/scitable/topicpage/cell-division-and-cancer-14046590>>.

NICKOLOFF, J. A. DNA repair dysregulation in cancer: From Molecular Mechanisms to Synthetic Lethal Opportunities. In: WONDRAK, G. T. (Ed.). *Stress Response Pathways in Cancer: From Molecular Targets to Novel Therapeutics*. Dordrecht: Springer Netherlands, 2015. p.7-28. ISBN 978-94-017-9421-3.

NIGG, E. A. Centrosome aberrations: cause or consequence of cancer progression? **Nat Rev Cancer**, v. 2, n. 11, p. 815-825, Nov. 2002. ISSN 1474-175X. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12415252>>.

NIKOLETOPOULOU, V. et al. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. **Biochim Biophys Acta**, v. 1833, n. 12, p. 3448-3459, Dec. 2013. ISSN 0006-3002. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23770045>>.

NOORANI, L. et al. Albumin nanoparticles increase the anticancer efficacy of albendazole in ovarian cancer xenograft model. **J Nanobiotechnology**, v. 13, n. 25, p. 1-12, Mar. 2015. ISSN 1477-3155. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25890381>>.

NORDBERG, J.; ARNÉR, E. S. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radic Biol Med**, v. 31, n. 11, p. 1287-1312, Dec. 2001. ISSN 0891-5849. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11728801>>.

NOSENGO, N. Can you teach old drugs new tricks? **Nature**, v. 534, n. 7607, p. 314-316, Jun. 2016. ISSN 1476-4687. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27306171>>.

NYGREN, P. et al. Repositioning of the anthelmintic drug mebendazole for the treatment for colon cancer. **J Cancer Res Clin Oncol**, v. 139, n. 12, p. 2133-2140, Dec. 2013. ISSN 1432-1335. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24135855>>.

ONYANGO, A. N. Endogenous Generation of Singlet Oxygen and Ozone in Human and Animal Tissues: Mechanisms, Biological Significance, and Influence of Dietary Components. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2016, p. 1-22, 2016. ISSN 1942-0994. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27042259>>.

ORR, B.; GODEK, K. M.; COMPTON, D. Aneuploidy. **Curr Biol**, v. 25, n. 13, p. R538-R542, Jun. 2015. ISSN 1879-0445. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26126276>>.

ORSOLIC, N.; KOSALEC, I.; BASIC, I. Synergistic antitumor effect of polyphenolic components of water soluble derivative of propolis against Ehrlich Ascites Tumour. **Biol Pharm Bull**, v. 28, p. 694–700, 2005. DOI: 10.1248/bpb.28.694.

OURIQUE, F. et al. DNA damage and inhibition of akt pathway in mcf-7 cells and ehrlich tumor in mice treated with 1,4-naphthoquinones in combination with ascorbate. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2015, p. 1-10, 2015. ISSN 1942-0994. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25793019>>.

OURIQUE, F. et al. In vivo inhibition of tumor progression by 5 hydroxy-1,4-naphthoquinone (juglone) and 2-(4-hydroxyanilino)-1,4-naphthoquinone (Q7) in combination with ascorbate. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 477, n. 4, p. 640-646, Sep. 2016. ISSN 1090-2104. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27346131>>.

OZTAS, S. et al. Genotoxic effect of albendazole in pediatric patients with hepatic hydatid disease. **Int J Infect Dis**, v. 11, n. 5, p. 446-449, Sep. 2007. ISSN 1201-9712. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17331781>>.

PAIVA-OLIVEIRA, E. L. et al. Inflamassoma e sua repercussão clínica: revisão da literatura. **R. Ci. Med. Biol**, v. 11, n. 1, p. 96-102, Jan.-abr. 2012.

PANTZIARKA, P. et al. Repurposing Drugs in Oncology (ReDO)-mebendazole as an anti-cancer agent. **Ecancermedicalsecience**, v. 8, n. 443, p. 1-16. 2014. ISSN 1754-6605. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25075217>>.

PAPATRIANTAFYLLOU, M. Innate immunity: inflammasome triggered by cell swelling. **Nat Rev Immunol**, v. 12, n. 11, p. 742, Nov. 2012. ISSN 1474-1741. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23037555>>.

PARVEZ, S.; RAISUDDIN, S. Protein carbonyls: novel biomarkers of exposure to oxidative stress-inducing pesticides in freshwater fish *Channa punctata* (Bloch). **Environ Toxicol Pharmacol**, v. 20, n. 1, p. 112-117, Jul. 2005. ISSN 1382-6689. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21783577>>.

PAT KENNY (Ilustrador). Normal and cancer cells structure. National Cancer Institute (2001). Disponível em: <<https://visualsonline.cancer.gov/details.cfm?imageid=2512>>.

PATEL, K. et al. Albendazole sensitizes cancer cells to ionizing radiation. **Radiat Oncol**, v. 6, n. 160, p. 1-7, Nov. 2011. ISSN 1748-717X. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22094106>>.

PAYNE, S. R.; KEMP, C. J. Tumor suppressor genetics. **Carcinogenesis**, v. 26, n. 12, p. 2031-2045, 2005. Disponível em: <<http://carcin.oxfordjournals.org/content/26/12/2031.abstract>>.

PIECHOTA, J. et al. Nuclear and mitochondrial genome responses in HeLa cells treated with inhibitors of mitochondrial DNA expression. **Acta Biochim Pol**, v. 53, n. 3, p. 485-495, 2006. ISSN 0001-527X. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16951738>>.

PLOŠNIK, A.; VRAČKO, M.; DOLENC, M. S. Mutagenic and carcinogenic structural alerts and their mechanisms of action. **Arh Hig Rada Toksikol**, v. 67, n. 3, p. 169-182, Sep. 2016. ISSN 1848-6312. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27749264>>.

POLYAK, K.; WEINBERG, R. A. Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. **Nat Rev Cancer**, v. 9, n. 4, p. 265-273, Apr. 2009. ISSN 1474-1768. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19262571>>.

PORTT, L. et al. Anti-apoptosis and cell survival: a review. **Biochim Biophys Acta**, v. 1813, n. 1, p. 238-259, Jan. 2011. ISSN 0006-3002. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20969895>>.

POURGHOLAMI, M. H. et al. In vitro and in vivo suppression of growth of hepatocellular carcinoma cells by albendazole. **Cancer Lett**, v. 165, n. 1, p. 43-49, Apr. 2001. ISSN 0304-3835. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11248417>>.

POURGHOLAMI, M. H. et al. Antitumor activity of albendazole against the human colorectal cancer cell line HT-29: in vitro and in a xenograft model of peritoneal carcinomatosis. **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 55, n. 5, p. 425-432, May 2005. ISSN 0344-5704. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15565325>>.

POURGHOLAMI, M. H.; WANGOO, K. T.; MORRIS, D. L. Albendazole-cyclodextrin complex: enhanced cytotoxicity in ovarian cancer cells. **Anticancer Res**, v. 28, n. 5A, p. 2775-2779, Sep.-Oct. 2008. ISSN 0250-7005. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19035309>>.

PÉREZ-ARNAIZ, C. et al. New insights into the mechanism of the DNA/doxorubicin interaction. **J Phys Chem B**, v. 118, n. 5, p. 1288-1295, Feb. 2014. ISSN 1520-5207. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24417409>>.

RADA, B.; LETO, T. L. Oxidative innate immune defenses by Nox/Duox family NADPH oxidases. **Contrib Microbiol**, v. 15, p. 164-187, 2008. ISSN 1420-9519. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1851186>>.

RAHMAN, I.; KODE, A.; BISWAS, S. K. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. **Nat Protoc**, v. 1, n. 6, p. 3159-3165, 2006. ISSN 1750-2799. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17406579>>.

RAMPINO, N. et al. Somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype. **Science**, v. 275, n. 5302, p. 967-969, Feb. 1997. ISSN 0036-8075. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9020077>>.

RAMÍREZ, T.; EASTMOND, D. A.; HERRERA, L. A. Non-disjunction events induced by albendazole in human cells. **Mutat Res**, v. 626, n. 1-2, p. 191-195, Jan. 2007. ISSN 0027-5107. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17055335>>.

RAPIN, N. et al. Comparing cancer vs normal gene expression profiles identifies new disease entities and common transcriptional programs in AML patients. **Blood**, v. 123, n. 6, p. 894-904, Feb. 2014. ISSN 1528-0020. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24363398>>.

RAWDEN, H. C. et al. Relative contribution of cytochromes P-450 and flavin-containing monooxygenases to the metabolism of albendazole by human liver microsomes. **Br J Clin Pharmacol**, v. 49, n. 4, p. 313-322, Apr. 2000. ISSN 0306-5251. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10759686>>.

REAGAN-SHAW, S.; NIHAL, M.; AHMAD, N. Dose translation from animal to human studies revisited. **FASEB J**, v. 22, n. 3, p. 659-661, Mar. 2008. ISSN 1530-6860. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17942826>>.

RIEDER, C. L.; MAIATO, H. Stuck in division or passing through: what happens when cells cannot satisfy the spindle assembly checkpoint. **Dev Cell**, v. 7, n. 5, p. 637-651, Nov. 2004. ISSN 1534-5807. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15525526>>.

RIGTER, I. M. et al. Relative bioavailability of three newly developed albendazole formulations: a randomized crossover study with healthy volunteers. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 48, n. 3, p. 1051-1054, Mar. 2004. ISSN 0066-4804. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14982808>>.

ROBBINS, D.; ZHAO, Y. Manganese superoxide dismutase in cancer prevention. **Antioxid Redox Signal**, v. 20, n. 10, p. 1628-1645, Apr. 2014. ISSN 1557-7716. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23706068>>.

ROBINSON, M. D.; MCCARTHY, D. J.; SMYTH, G. K. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. **Bioinformatics**, v. 26, n. 1, p. 139-140, Jan. 2010. ISSN 1367-4811. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19910308>>.

RODRIGUES, L. D.; MARTIRANI, R. & BRANDÃO, J. A. - Experimentação clínica com o albendazol, novo antihelmíntico do grupo dos benzimidazólicos. Apresentado no XVI Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, realizado em Natal, Estado do Rio Grande do Norte, Brasil, em 1980.

ROSS, G. M. et al. The single cell microgel electrophoresis assay (comet assay): technical aspects and applications. **Mutation Research/DNA Repair**, v. 337, n. 1, p. 57-60, 1995. ISSN 0921-8777. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0921877795000077>>.

RYLAND, G. L. et al. Loss of heterozygosity: what is it good for? **BMC Med Genomics**, v. 8, p. 45, Aug. 2015. ISSN 1755-8794. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26231170>>.

RYTER, S. W. et al. Mechanisms of cell death in oxidative stress. **Antioxid Redox Signal**, v. 9, n. 1, p. 49-89, Jan. 2007. ISSN 1523-0864. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17115887>>.

SAIKUMAR, P.; VENKATACHALAM, M. A. Apoptosis and Cell Death. In: ALLEN, T. C. e CAGLE, P. T. (Ed.). *Basic Concepts of Molecular Pathology*. Boston, MA: Springer US, 2009. p.29-40. ISBN 978-0-387-89626-7.

SANTIAGO-ARTECHE, R. et al. Cancer chemotherapy reduces plasma total polyphenols and total antioxidants capacity in colorectal cancer patients. **Mol Biol Rep**, v. 39, n. 10, p. 9355-9360, Oct. 2012. ISSN 1573-4978. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22772457>>.

SASAKI, J. et al. The anthelmintic drug mebendazole induces mitotic arrest and apoptosis by depolymerizing tubulin in non-small cell lung cancer cells. **Mol Cancer Ther**, v. 1, n. 13, p. 1201-1209, Nov. 2002. ISSN 1535-7163. Disponível em:
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12479701>>.

SASTRY, A. S.; BHAT, S. Essentials of medical parasitology. Ed. Jaypee Brothers Medical Publishers (P) Ltd. 1ª edição. 2014. ISBN 10: 9351523292 / ISBN 13: 9789351523291

SCHAFER, F. Q.; BUETTNER, G. R. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. **Free Radic Biol Med**, v. 30, n. 11, p. 1191-1212, Jun. 2001. ISSN 0891-5849. Disponível em:
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11368918>>.

SCHUMACKER, P. T. Reactive oxygen species in cancer cells: Live by the sword, die by the sword. **Cancer Cell**, v. 10, n. 3, p. 175-176, 2006. ISSN 1535-6108. Disponível em:
<<http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2006.08.015>>.

SCHWAB, M. Loss of heterozygosity. In: SCHWAB, M. (Ed.). Encyclopedia of Cancer. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2012. p. 2075-2076. ISBN 978-3-642-16483-5.

SEYFRIED, T. N.; HUYSENTRUYT, L. C. On the origin of cancer metastasis. **Crit Rev Oncog**, v. 18, n. 1-2, p. 43-73, 2013. ISSN 0893-9675. Disponível em:
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23237552>>.

SHAHABADI, N.; MOHAMMADI, S. Synthesis characterization and DNA interaction studies of a new Zn(II) complex containing different dinitrogen aromatic ligands. **Bioinorg Chem Appl**, v. 2012, p. 1-8, 2012. ISSN 1687-479X. Disponível em:
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22956919>>.

SHILOH, Y.; ZIV, Y. The ATM protein kinase: regulating the cellular response to genotoxic stress, and more. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 14, n. 4, p. 197-210, Apr. 2013. ISSN 1471-0080. Disponível em:
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23847781>>.

SHIN, J. W. et al. Trichosanthes kirilowii tuber extract induces G2/M phase arrest via inhibition of tubulin polymerization in HepG2 cells. **J Ethnopharmacol**, v. 115, n. 2, p. 209-216, 2008. ISSN 0378-8741. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874107004977>>.

SINGH, N. P. et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Exp Cell Res**, v. 175, n. 1, p. 184-191, Mar. 1988. ISSN 0014-4827. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3345800>>.

SIRAJUDDIN, M.; ALI, S.; BADSHAH, A. Drug–DNA interactions and their study by UV–Visible, fluorescence spectroscopies and cyclic voltametry. **J. Photochem. Photobiol. B, Biol**, v. 124, p. 1-19, 2013. ISSN 1011-1344. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1011134413000717>>.

SPAGNUOLO, P. A. et al. The antihelmintic flubendazole inhibits microtubule function through a mechanism distinct from Vinca alkaloids and displays preclinical activity in leukemia and myeloma. **Blood**, v. 115, n. 23, p. 4824-4833, Jun. 2010. ISSN 1528-0020. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20348394>>.

STACKER, S. A.; BALDWIN, M. E.; ACHEN, M. G. The role of tumor lymphangiogenesis in metastatic spread. **The FASEB Journal**, v. 16, n. 9, p. 922-934, 2002. ISSN 0892-6638.

STEPIC, S. et al. Impact of oxidative stress indicated by thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and protein carbonyl levels (PC) on ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) induction in common carp (Cyprinus carpio). **Water Air Soil Pollut**, v. 223, n. 8, p. 4785-4793, 2012. ISSN 1573-2932. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s11270-012-1234-1>>.

SUZUKI, Y. J.; CARINI, M.; BUTTERFIELD, D. A. Protein carbonylation. **Antioxid Redox Signal**, v. 12, n. 3, p. 323-325, Mar. 2010. ISSN 1557-7716. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19743917>>.

THORN, C. F. et al. Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. **Pharmacogenet Genomics**, v. 21, n. 7, p. 440-446, Jul. 2011. ISSN 1744-6880. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21048526>>.

TRACHOOTHAM, D. et al. Selective killing of oncogenically transformed cells through a ROS-mediated mechanism by beta-phenylethyl isothiocyanate. **Cancer Cell**, v. 10, n. 3, p. 241-252, Sep. 2006. ISSN 1535-6108. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16959615>>.

TRACHOOTHAM, D.; ALEXANDRE, J.; HUANG, P. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? **Nat Rev Drug Discov**, v. 8, n. 7, p. 579-591, Jul. 2009. ISSN 1474-1784. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19478820>>.

TRAVERSO, N. et al. Role of glutathione in cancer progression and chemoresistance. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2013, p. 1-10, 2013. ISSN 1942-0994. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23766865>>.

TWEATS, D. J. et al. Genotoxicity of flubendazole and its metabolites in vitro and the impact of a new formulation on in vivo aneugenicity. **Mutagenesis**, v. 31, n. 3, p. 309-321, May 2016. ISSN 1464-3804. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26443851>>.

UCHIDA, D. et al. Vesnarinone downregulates CXCR4 expression via upregulation of Krüppel-like factor 2 in oral cancer cells. **Mol Cancer**, v. 8, n. 62, p. 1-11, Aug. 2009. ISSN 1476-4598. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19671192>>.

VACA, C. E.; HARMS-RINGDAHL, M. Interaction of lipid peroxidation products with nuclear macromolecules. **Biochim Biophys Acta**, v. 1001, n. 1, p. 35-43, Jan. 1989. ISSN 0006-3002. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2912492>>.

VAIRETTI, M. et al. Apoptosis vs. necrosis: glutathione-mediated cell death during rewarming of rat hepatocytes. **Biochim Biophys Acta**, v. 1740, n. 3, p. 367-374, Jun. 2005. ISSN 0006-3002. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15949704>>.

VAKIFAHMETOGLU, H.; OLSSON, M.; ZHIVOTOVSKY, B. Death through a tragedy: mitotic catastrophe. **Cell Death Differ**, v. 15, n. 7, p. 1153-1162, Jul. 2008. ISSN 1350-9047. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18404154>>.

VALKO, M. et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chem Biol Interact**, v. 160, n. 1, p. 1-40, Mar. 2006. ISSN 0009-2797. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16430879>>.

VERRAX, J.; CALDERON, P. B. Pharmacologic concentrations of ascorbate are achieved by parenteral administration and exhibit antitumoral effects. **Free Radic Biol Med**, v. 47, n. 1, p. 32-40, Jul. 2009. ISSN 1873-4596. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19254759>>.

VERRAX, J. et al. Oxidative stress by ascorbate/menadione association kills K562 human chronic myelogenous leukaemia cells and inhibits its tumour growth in nude mice. **Biochem Pharmacol**, v. 72, n. 6, p. 671-680, Sep. 2006. ISSN 0006-2952. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16828058>>.

VERRAX, J. et al. In Situ modulation of oxidative stress: a novel and efficient strategy to kill cancer cells. **Curr. Med. Chem**, v. 16, n. 15, p. 1821-1830, 2009. ISSN 0929-8673/1875-533X. Disponível em: <<http://www.eurekaselect.com/node/69184/article>>.

VERRAX, J. et al. Intracellular ATP levels determine cell death fate of cancer cells exposed to both standard and redox chemotherapeutic agents. **Biochem Pharmacol**, v. 82, n. 11, p. 1540-1548, Dec. 2011. ISSN 1873-2968. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21843513>>.

VIJAYAKURUP, V. et al. Phenethyl caffeate benzo[kl]xanthene lignan with DNA interacting properties induces DNA damage and apoptosis in colon cancer cells. **Life Sci**, v. 91, n. 25-26, p. 1336-1344, Dec. 2012. ISSN 1879-0631. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23123449>>.

VITALE, I. et al. Mitotic catastrophe: a mechanism for avoiding genomic instability. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 12, n. 6, p. 385-392, Jun. 2011. ISSN 1471-0080. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21527953>>.

WANG, J. et al. Antioxidant activity of sulfated polysaccharide fractions extracted from *Laminaria japonica*. **Int J Biol Macromol**, v. 42, n. 2, p. 127-132, Mar. 2008. ISSN 0141-8130. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18023861>>.

WATKINS, P. B. et al. Identification of glucocorticoid-inducible cytochromes P-450 in the intestinal mucosa of rats and man. **J Clin Invest**, v. 80, n. 4, p. 1029-1036, Oct. 1987. ISSN 0021-9738. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3654968>>.

WENTWORTH, P. et al. Evidence for antibody-catalyzed ozone formation in bacterial killing and inflammation. **Science**, v. 298, n. 5601, p. 2195-2199, Dec. 2002. ISSN 1095-9203. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12434011>>.

WILLYARD, C. Cancer therapy: an evolved approach. **Nature**, v. 532, n. 7598 p. 166-168, 2016.

WIRTZ, D.; KONSTANTOPOULOS, K.; SEARSON, P. C. The physics of cancer: the role of physical interactions and mechanical forces in metastasis. **Nat Rev Cancer**, v. 11, n. 7, p. 512-522, Jul. 2011. ISSN 1474-175X. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrc3080>>.

WIT, N. et al. Roles of PCNA ubiquitination and TLS polymerases κ and η in the bypass of methyl methanesulfonate-induced DNA damage. **Nucleic Acids Res**, v. 43, n. 1, p. 282-294, 2015. ISSN 0305-10481362-4962. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4288191/>>.

WHO (2015a). Soil-transmitted helminth infections. Disponível em: <<https://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs366/en/>>.

WHO (2015b). Lymphatic filariasis. Disponível em: <<https://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs102/en/>>.

WHO (2015c). Weekly epidemiological record. Global programme to eliminate lymphatic filariasis: progress report, 2014. No. 38, 2015, 90, 489–504. Disponível em: <<http://www.who.int/wer/2014/wer8938.pdf>>.

WU, C. I. et al. The Ecology and Evolution of Cancer: The Ultra-Microevolutionary Process. **Annu Rev Genet**, v. 50, p. 347-369, Nov. 2016. ISSN 1545-2948. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27686281>>.

XUE, C. et al. Chemoprotective effect of N-acetylcysteine (NAC) on cellular oxidative damages and apoptosis induced by nano titanium dioxide under UVA irradiation. **Toxicol In Vitro**, v. 25, n. 1, p. 110-116, Feb. 2011. ISSN 1879-3177. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20932892>>.

YAMASHITA, K. et al. Ozone production by amino acids contributes to killing of bacteria. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, n. 44, p. 16912-16917, Nov. 2008. ISSN 1091-6490. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18971328>>.

YANG, X. B. et al. Sulfation of a polysaccharide produced by a marine filamentous fungus *Phoma herbarum* YS4108 alters its antioxidant properties in vitro. **Biochim Biophys Acta**, v. 1725, n. 1, p. 120-127, Aug. 2005. ISSN 0006-3002. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16054758>>.

YAO, J. K.; LEONARD, S.; REDDY, R. Altered glutathione redox state in schizophrenia. **Dis Markers**, v. 22, n. 1-2, p. 83-93, 2006. ISSN 0278-0240. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16410648>>.

YOUNG, A.; LOU, D.; McCORMICK, F. Oncogenic and wild-type Ras play divergent roles in the regulation of mitogen-activated protein kinase signaling. **Cancer Discovery**, v. 3, n. 1, p. 112, 2013. Disponível em: <<http://cancerdiscovery.aacrjournals.org/content/3/1/112.abstract>>.

YOUNG, M. D. et al. Gene ontology analysis for RNA-seq: accounting for selection bias. **Genome Biol**, v. 11, n. 2, p. R14, 2010. ISSN 1474-760X. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20132535>>.

ZAFARULLAH, M. et al. Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. **Cell Mol Life Sci**, v. 60, n. 1, p. 6-20, Jan. 2003. ISSN 1420-682X. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12613655>>.

ZHANG, L. et al. Gene expression profiles in normal and cancer cells. **Science**, v. 276, n. 5316, p. 1268-1272, May 1997. ISSN 0036-8075. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9157888>>.

ZHANG, X. et al. Anthelmintic drug albendazole arrests human gastric cancer cells at the mitotic phase and induces apoptosis. **Exp Ther Med**, v. 13, n. 2, p. 595-603, Feb. 2017. ISSN 1792-0981. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28352336>>.

ZHOU, D.; SHAO, L.; SPITZ, D. R. Reactive oxygen species in normal and tumor stem cells. **Adv Cancer Res**, v. 122, p. 1-67, 2014. ISSN 0065-230X. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24974178>>.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Nomes comerciais do fármaco ABZ e laboratórios responsáveis pela sua fabricação

Planilha 1 – Lista de nomes comerciais do fármaco ABZ e do respectivo laboratório.

Nº	Nome comercial	Laboratório
1	A 1 (400mg)	Ceza Formulations Pvt.Ltd
2	A B Z (400mg)	DCI Pharmaceuticals Pvt Ltd
3	A Zole (400mg)	Elegant Drugs Pvt. Ltd
4	Abd (10ml)	Intas Pharmaceuticals Ltd
5	ABD (200mg/5mL)	Intas
6	ABD (400mg)	Intas
7	Abd (400mg)	Intas Pharmaceuticals Ltd
8	Abend (10ml)	Pharmindia
9	Abend (400mg)	Pharmindia
10	Abendaz (10ml)	Quixotic Pharma (P)Ltd
11	Abenzer (10ml)	Daniel Pasteur
12	Abenzer (400mg)	Daniel Pasteur
13	Abide (10ml)	Laborate Pharmaceuticals India Ltd
14	Abide (400mg)	Laborate Pharmaceuticals India Ltd
15	ABL (400mg)	Malar Healthcare
16	ABL (400mg) (Capri Pharma)	Capri Pharmaceuticals
17	Abtab (400mg)	Pharma Plus
18	Abworm (200mg)	Athens Labs Ltd
19	ABZ (10ml)	Pharmacia Unijohn (Willow Pharmaceuticals Pvt Ltd
20	ABZ Chw (400mg)	Indoco Remedies Ltd
21	Abzol (10ml)	Allied Chemicals & Pharmaceuticals Pvt.Ltd
22	Abzol (400mg)	Allied Chemicals & Pharmaceuticals Pvt.Ltd
23	Abzole (10ml)	Arbro Pharmaceuticals Limited
24	Abzole (400mg) (Arbro Pharma)	Arbro Pharmaceuticals Limited
25	Abzole (400mg) (Euphoric	Euphoric Pharmaceuticals

	Pharma)	Pvt.Ltd
26	Abzole DS (400mg)	Sansill Drugs Pvt Ltd
27	Acizole (400mg)	Acichem Laboratories
28	AD Dworm (10ml)	Adisan Healthcare Pvt. ltd
29	AD Dworm (400mg)	Adisan Healthcare Pvt. ltd
30	Agroben (10ml)	Agron Remedies Pvt Ltd
31	AH 1 (10ml)	Obsurge Biotech Limited
32	AH 1 (400mg)	Obsurge Biotech Limited
33	AL (10ml)	Radicura Pharmaceutical Pvt. Ltd
34	AL (400mg)	Radicura Pharmaceutical Pvt.Ltd
35	Al Worm (400mg)	Medopharm
36	Alba (10ml)	Suzikem Drugs Pvt. Ltd
37	Alba (400mg)	Nac International
38	Alba tab (400mg)	Suzikem Drugs Pvt. Ltd Tablet
39	Albacos (10ml)	Coastal (Symbiosis Pharmaceuticals Pvt Ltd)
40	Albacos (400mg)	Coastal (Symbiosis Pharmaceuticals Pvt Ltd)
41	Albamaa (10ml)	S.R. Medicare (P) Ltd
42	Albawin (400mg)	Mediwin Pharmaceuticals
43	Albax (10ml)	Vostok & Wilcure Remedies
44	Albax (400mg)	Vostok & Wilcure Remedies
45	Albazen (400mg)	Zensar Health Care
46	Albazen tab (400mg)	Kaizen Drugs (P) Ltd
47	Albazio (10ml)	Agio Pharmaceuticals Limited
48	Albazio (400mg)	Agio Pharmaceuticals Limited
49	Albazol (10ml)	Ciron Drugs & Pharmaceuticals Pvt Ltd
50	Albazole (10ml)	Wings Pharmaceuticals (P) Ltd
51	Albazole DT (400mg)	Wings Pharmaceuticals (P) Ltd
52	Albe (10ml)	Serve Pharmaceuticals
53	Albe (400mg)	Serve Pharmaceuticals
54	Albecon (400mg)	Icon Pharma & Surgicals Pvt. Ltd
55	Albeder (10ml)	Wonder Healthcare
56	Albeder (200mg)	Wonder (Wonder HC)

57	Albeder (400mg)	Wonder (Wonder HC)
58	Albeder (400mg)	Wonder Healthcare
59	Albeges (10ml)	Sumages Pharma Pvt. Ltd
60	Albeges (400mg)	Sumages Pharma Pvt. Ltd
61	Albekon (10ml)	Briskon Laboratories
62	Albekon (400mg)	Briskon Laboratories
63	Albela (10ml)	Lapo Pharma
64	Albela (400mg)	Lapo Pharma
65	Alben (10ml)	Ar-Ex Laboratories Pvt.Ltd.
66	Alben (200mg)	Ar-Ex Laboratories Pvt.Ltd.
67	Albena (10ml)	Biochemix Healthcare Pvt Ltd
68	Albend (400mg)	Ceza Formulations Pvt.Ltd
69	Albenda (10ml)	Alpha Lab
70	Albenda (400mg)	Alpha Lab
71	Albendazole (10ml)	Generic (Cadila PharmaceuticalsLtd)
72	Albendazole (400mg)	Smith Stanistreet Pharmaceuticals Ltd
73	Albendazole (400mg) (Acichem)	Acichem Laboratories
74	Albendazole (400mg) (Generic)	Generic (Cadila PharmaceuticalsLtd)
75	Albendazole (400mg) (LOCOST)	Low Cost Standard Therapeutics (LOCOST)
76	Albendex (150mg)	Western Remedies (India)
77	Albendol (10ml)	Micro Labs Ltd
78	Albendol (400mg)	Micro Labs Ltd
79	Albendz (400mg)	Wintech Pharmaceuticals
80	Albengel (400mg)	Angel Laboratories Private Ltd
81	Albenic (400mg)	Tunic Healthcare
82	Albens (400mg)	Sparkles Exim Pvt Ltd
83	Albent (10ml)	Acto Pharmaceuticals Laboratories
84	Albent (400mg)	Acto Pharmaceuticals Laboratories
85	Albenzole (10ml)	Khandelwal Laboratories Pvt Ltd
86	Albesan (400mg)	Syntonic (Sanify Healthcare Pvt Ltd)
87	Albest (10ml)	Lifeon Paediatrics Limited

88	Albest (400mg)	Nestor Pharmaceuticals Ltd
89	Albest susp (10ml)	Ethix Health Care
90	Albest tab(400mg)	Ethix Health Care
91	Albestar (10ml)	Minova Life Sciences Pvt Ltd
92	Albestar (200mg/5mL)	Minova
93	Albestar (400mg)	Minova
94	Albestar (400mg)	Minova Life Sciences Pvt Ltd
95	Albex (10ml)	Saga Laboratories
96	Albex (400mg)	Saga Laboratories
97	Albezole (10ml)	Khandelwal Laboratories Pvt Ltd
98	Albezole (400mg)	Khandelwal Laboratories Pvt Ltd
99	Albino (400mg)	Multilax Pharmaceuticals Pvt Ltd
100	Albins (400mg)	Kentreck Labs Pvt Ltd
101	Albitif (400mg)	Positif Lifesciences
102	Albitos (400mg)	Tosc International Pvt Ltd
103	Albiz (400mg)	Jarson Pharmaceuticals
104	Albol (10ml)	East West Pharma
105	Albol (400mg)	East West
106	Albol (400mg)	East West
107	Albol (400mg)	East West Pharma
108	Albom (10ml)	Om Biotec
109	Albom (400mg)	Om Biotec
110	Albond (400mg)	Lancer Pharmaceuticals (P)Ltd
111	Albonzol (400mg)	Glories Pharmaceuticals Pvt Ltd
112	Albosym (400mg)	Materkin Formulation (Symbiosis Pharmaceuticals Pvt Ltd)
113	Alboven (10ml)	Vencare Formulations Pvt Ltd
114	Alboven (400mg)	Vencare Formulations Pvt Ltd
115	Albrodo (10ml)	Shalaks Pharmaceuticals Pvt.Ltd
116	Albrodo (400mg)	Shalaks Pharmaceuticals Pvt.Ltd
117	Albstat (10ml)	APT Cure Laboratories
118	Albstat (400mg)	APT Cure Laboratories
119	Alby (10ml)	Medicot Lifesciences

120	Aldazole (10ml)	Mediways Pharmaceuticals Pvt. Ltd
121	Aldazole (400mg)	Mediways Pharmaceuticals Pvt. Ltd
122	Alden (400mg)	Eden Healthcare
123	Aldezole (10ml)	Alde Medi Impex Ltd
124	Aldezole (400mg)	Alde Medi Impex Ltd
125	Aldo (10ml)	Hosta Labs
126	Aldo (400mg)	Hosta Labs
127	Aldor (400mg)	Adore Healthcare
128	Aldosh (10ml)	Osho Pharma Pvt.Ltd
129	Aldosh (400mg)	Osho Pharma Pvt.Ltd
130	Alect (10ml)	Safetech Formulation
131	Alenda (400mg)	Prompt Cure Pharma Pvt Ltd
132	Alged (400mg)	Wel n Drugs (Zee Laboratories Ltd)
133	Alinda (400mg)	Indamed Pharmaceuticals Pvt. Ltd
134	Alio (400mg)	Osmed Formulations (P) Ltd
135	Aliza (10ml)	Ascent Laboratories
136	Aliza (400mg)	Ascent Laboratories
137	Allen Z (400mg)	Medi Products Pvt.Ltd
138	Almet (400mg)	Symet Labs. Pvt. Ltd
139	Alminth (10ml)	Torrent Pharmaceuticals Ltd
140	Alminth (200mg)	Torrent Pharmaceuticals Ltd
141	Alminth (400mg)	Torrent Pharmaceuticals Ltd
142	Almix (10ml)	Biotropics Formulations (Elfin Pharma Pvt Ltd)
143	Almix (400mg)	Merril Pharma Pvt. Ltd
144	Alnet (400mg)	Bionext Pharma Pvt Ltd
145	Alone (400mg)	Acron Laboratories Pvt. Ltd
146	Alrose (400mg)	Medi Rose
147	Alson (10ml)	Redson Pharmaceuticals
148	Alson (400mg)	Redson Pharmaceuticals
149	Altec (400mg)	Zee Laboratories Ltd
150	Alto (200mg)	Leben Laboratories Pvt Ltd
151	Alto (400mg)	Leben Laboratories Pvt Ltd
152	Alvela (400mg)	Shrinivas (Gujarat) Laboratories Pvt. Ltd
153	Alwa (10ml)	Leben Laboratories Pvt Ltd
154	Alwa (400mg)	Leben Laboratories Pvt Ltd

155	Alwin (10ml)	Winmac Laboratories Limited
156	Alwo (10ml)	Leben Laboratories Pvt. Ltd
157	Alwo (400mg)	Leben Laboratories Pvt. Ltd
158	Alworm (10ml)	Elite Pharma Pvt Ltd
159	Alworm (10ml) (Medopharma)	Medopharm
160	Alworm (15ml)	Pramukh Swami Pharma Ltd
161	Alworm (400mg)	Pramukh Swami Pharma Ltd
162	Alworm (400mg) (Elite Pharma)	Elite Pharma Pvt Ltd
163	Alworm (400mg) (Medopharm)	Medopharm
164	Alzad (10ml)	Merind Ltd (Wockhardt Ltd)
165	Alzad (400mg)	Merind Ltd (Wockhardt Ltd)
166	Alzokan (400mg)	Kansas Laboratories Pvt. Ltd
167	Alzol (400mg)	Bal Pharma Limited
168	Alzole (400mg)	Syskem Pharmacrats
169	Andazole (400mg)	B.L. Pharma Ltd
170	Anoworm (10ml)	Anoco Pharmaceuticals (India) Pvt.Ltd
171	Anoworm (400mg)	Anoco Pharmaceuticals (India) Pvt.Ltd
172	Anthel (10ml)	Lincoln Pharmaceuticals Ltd
173	Anthel (400mg)	Lincoln Pharmaceuticals Ltd
174	Anthel (400mg) (Sanshis Pharma)	Sanshis Pharmaceuticals
175	Antiworm (10ml)	Hi-Tec Laboratories Pvt. Ltd
176	Antiworm (400mg)	Hi-Tec Laboratories Pvt. Ltd
177	Arezole 400	Events Pharmaceuticals Pvt Ltd
178	Ariban (10ml)	Arika Healthcare
179	Ariban (400mg)	Arika Healthcare
180	Arodac (400mg)	Medicamen Biotech Ltd
181	Askabend (10ml)	Asklepios Remedies (P) Ltd
182	Askabend (400mg)	Asklepios Remedies (P) Ltd
183	Askaworm (10ml)	Asklepios Remedies (P) Ltd
184	Askaworm (400mg)	Asklepios Remedies (P) Ltd
185	Atbend (10ml)	Atoz Pharmaceuticals (Zota Healthcare Pvt Ltd)
186	Atbend (400mg)	Atoz Pharmaceuticals (Zota Healthcare Pvt Ltd)

187	Aviband (10ml)	Avalanche Pharmaceuticals
188	Aviband (400mg)	Avalanche Pharmaceuticals
189	Aviben (400mg)	Bhavishya Pharmaceuticals Pvt Ltd
190	Avizole (15ml)	Adley Formulation
191	AX Worm (10ml)	Axis Life Science Pvt Ltd
192	AX Worm (400mg)	Axis Life Science Pvt Ltd
193	B Zed (400mg)	Mits Healthcare
194	Banazole (10ml)	Biosearch Organics (Ultramark Healthcare Pvt Ltd)
195	Banazole (400mg)	Ultramark Healthcare Pvt Ltd
196	Band (400mg)	Vensat
197	Band (400mg)	Vensat Bio
198	Bandy (10ml)	Mankind Pharmaceuticals Pvt. Ltd
199	Bandy (200mg/5mL)	Mankind
200	Bandy (400mg)	Mankind
201	Bandy (400mg)	Mankind Pharmaceuticals Pvt. Ltd
202	Banex (400mg)	Zephyr Medicare Pvt.Ltd
203	Banworm (10ml)	Iscon Lifesciences
204	Banworm (400mg)	Iscon Lifesciences
205	Ben (10ml)	Bennet Pharmaceuticals Ltd
206	Ben (400mg)	Bennet Pharmaceuticals Ltd
207	Bencare (400mg)	Kind Care Pharmaceuticals
208	Bend (100ml)	Osho Laboratories (P) Ltd
209	Bend (400mg)	Osho Laboratories (P) Ltd
210	Bendacid (10ml)	SAF Fermion Ltd
211	Bendacid (400mg)	SAF Fermion Ltd
212	Bendal (10ml)	Axyzen Life Sciences
213	Bendal (400mg)	Axyzen Life Sciences
214	Bendaz (10ml)	Brussels Laboratories Pvt. Ltd
215	Bendex (10ml)	Cipla Limited
216	Bendex (200mg/5mL)	Cipla
217	Bendex (400mg)	Cipla
218	Bendex (400mg)	Cipla Limited
219	Bendup (10ml)	UPS Healthcare
220	Bendup (400mg)	UPS Healthcare
221	Benil (1500mg)	Ben Pharmaceuticals
222	Benkem (10ml)	Anikem Laboratories
223	Benkem (400mg)	Anikem Laboratories

224	Benle (400mg)	Blue Star Laboratories Pvt Ltd
225	Benmax (10ml)	Biomax Laboratories
226	Benmax (400mg)	Biomax Laboratories
227	Benrik (400mg)	Lanark Laboratories Pvt Ltd
228	Benrod (10ml)	Invision Medi Sciences
229	Benrod (200mg/5mL)	Invision
230	Benrod (400mg)	Invision
231	Benrod (400mg)	Invision Medi Sciences
232	Benty (400mg)	Healing Touch Pharmaceuticals
233	Benzo (10ml)	BMW Pharmaco India Pvt Ltd
234	Benzo (400mg)	BMW Pharmaco India Pvt Ltd
235	Benzol (10ml)	Diamond Drugs Pvt Ltd
236	Benzola (10ml)	Devbhoomi Pharmaceuticals
237	Benzola (400mg)	Devbhoomi Pharmaceuticals
238	Benzys (10ml)	Zytras Life Sciences
239	Benzys (400mg)	Zytras Life Sciences
240	Beworm (10ml)	Surmount Labs Pvt Ltd (Sterkem Pharma Pvt Ltd)
241	Bewormex (10ml)	Indoco Remedies Ltd
242	Bewormex (400mg)	Agron Remedies Pvt Ltd
243	Bigben (400mg)	Terrace Pharmaceuticals (P) Ltd
244	Biwom (10ml)	Zydus Vaccicare (Zydus Cadila Healthcare Ltd)
245	Biwom (200mg/5mL)	Zydus (Vaccicare)
246	Biwom (400mg)	Zydus (Vaccicare)
247	Biwom (400mg)	Zydus Vaccicare (Zydus Cadila Healthcare Ltd)
248	Biz (400mg)	SBP Health Care Pvt.Ltd
249	Brosa (400mg)	Esma Formulations
250	Byeworm (400mg)	Aden Healthcare
251	C Bend (10ml)	Elfin Drugs Pvt.Ltd (Elfin Pharma Pvt Ltd)
252	C Bend (400mg)	Elfin Drugs Pvt.Ltd (Elfin Pharma Pvt Ltd)
253	C Trop (10ml)	Oyster Labs Limited
254	C Trop (400mg)	Elfin Drugs Pvt.Ltd (Elfin Pharma Pvt Ltd)
255	Captiva (400mg)	Apids Pharmaceuticals
256	Cidazole (10ml)	Juggat Pharma

257	Cidazole (200mg/5mL)	Juggat
258	Cidazole (400mg)	Juggat
259	Cidazole (400mg)	Juggat Pharma
260	Cinel (10ml)	Biocin Healthcare
261	Cinel (400mg)	Biocin Healthcare
262	Clearworm (10ml)	Infalife (Invision Medi Sciences)
263	Clearworm (200mg)	Invision (Infalife)
264	Combantrin A (10ml)	Pfizer Limited (Pharmacia India Pvt Ltd)
265	Combantrin A (400mg)	Pfizer Limited (Pharmacia India Pvt Ltd)
266	Combiworm (400mg)	Swastik Formulations (P) Ltd
267	Cosaben (400mg)	Cosma Biotech
268	Curezole (400mg)	Unicure (India) Pvt.Ltd
269	D Worm (10ml)	Hauz Pharma Pvt Ltd
270	Dabdesyre (400mg)	B B Remedies (P) Ltd
271	Dandesure (400mg)	B B Remedies (P) Ltd
272	Daz (400mg)	Total Healthcare
273	Dazo (400mg)	Osper Pharmaceuticals Pvt. Ltd
274	Dazole (400mg)	Swisskem Healthcare
275	Debar (400mg)	Zeus Pharmaceuticals
276	Dispel (10ml)	Ind-Chemie Health Specialities Pvt Ltd
277	Dispel (200mg/5mL)	Indchemie
278	Dispel (400mg)	Indchemie
279	Dispel Chewable (400mg)	Ind-Chemie Health Specialities Pvt Ltd
280	Diworm (400mg)	Mascot Lifesciences Pvt. Ltd
281	Dworm (400mg)	Times Drugs & Pharmaceuticals (P) Ltd
282	E Warm (400mg)	Jeen Healthcare
283	E Worm (400mg)	Alpha Aromatic Pvt. Ltd
284	Easworm (400mg)	Kylsans Laboratories Ltd
285	Ebend (400mg)	Elixir Formulations
286	Ebex (10ml)	Madhav Biotech Pvt. Ltd
287	Ebex (200mg)	Madhav Biotech
288	Ebex (400mg)	Madhav Biotech
289	Ebex (400mg)	Madhav Biotech Pvt. Ltd
290	Ejec Worm (10ml)	Pink Health
291	Ejec Worm (400mg)	Pink Health

292	Ejectil (400mg)	Profic Organic Ltd
293	Ejectil P (200mg)	Profic Organic Ltd
294	Elbazol (10ml)	Elikem Pharmaceuticals Pvt. Ltd
295	Elbend (10ml)	Overseas Health Care Pvt. Ltd
296	Elbend (400mg)	Overseas Health Care Pvt. Ltd
297	Elbenol (10ml)	Ind-Swift Limited
298	Eleben (10ml)	Ind-Swift Limited
299	Eleben (400mg)	Ind-Swift Limited
300	Elminex (10ml)	Cachet Pharmaceuticals Ltd
301	Elminex (400mg)	Cachet Pharmaceuticals Ltd
302	Elminova (10ml)	Yash Pharma Laboratories Limited
303	Elminova (400mg)	Yash Pharma Laboratories Limited
304	Emanthal (10ml)	M.M.Labs
305	Emanthal (400mg)	M.M.Labs
306	Emiben (10ml)	Plenteous Pharmaceuticals Ltd
307	Emiben (400mg)	Plenteous Pharmaceuticals Ltd
308	Emzole (10ml)	Malcom Pharmaceuticals
309	Enbenol (400mg)	Ind-Swift Limited
310	Encenil (10ml)	Ortin Laboratories Ltd
311	Encenil (400mg)	Ortin Laboratories Ltd
312	Endazole (400mg)	Ben Pharmaceuticals
313	Endy (400mg)	Bio-Swiss Pharma
314	Eraworm (10ml)	Marc Laboratories Pvt. Ltd
315	Eraworm (400mg)	Marc Laboratories Pvt. Ltd
316	Exporm (10ml)	Ravian Pharmaceuticals (P) Ltd
317	Exporm (400mg)	Ravian Pharmaceuticals (P) Ltd
318	Exzol (400mg)	Vantage Biotech Pvt Limited
319	Fentel (400mg)	Faith Pharmaceuticals Ltd
320	Foben (10ml)	Forgo Pharmaceuticals (P) Ltd
321	Foben (400mg)	Forgo Pharmaceuticals (P) Ltd
322	Foxnill (400mg)	Fox & Wolf Healthcare
323	Fozy (400mg)	Regardia
324	Fozy Chew Tab (400mg)	Regardia Pharmaceuticals
325	Gallab (400mg)	New Gayzel Pharmaceuticals
326	Gekare (10ml)	Glaxo Smithkline Pharmaceuticals Ltd

327	Gekare (200mg/5mL)	GSK
328	Gekare (400mg)	Glaxo Smithkline Pharmaceuticals Ltd
329	Gekare (400mg)	GSK
330	Gibend (400mg)	Prayas Pharmaceuticals
331	Gloworm (400mg)	Gloss Pharmaceuticals Pvt. Ltd
332	Halb (400mg)	Medihands Pharmaceuticals
333	Helben (100ml)	Merit Organics Ltd
334	Helben (400mg)	Merit Organics Ltd
335	Helmanil (400mg)	Galpha Laboratories Ltd
336	Helmapax (400mg)	Baxter (India) Pvt. Ltd
337	Helmax (400mg)	Unimax Laboratories
338	Helmex (400mg)	Mars Therapeutics & Chemicals Ltd
339	Helnil (10ml)	Biogenetic Pharmaceuticals
340	HG ZOLE	Health Guard (India) Pvt. Ltd
341	Hibend (10ml)	Hiral Labs Ltd
342	Hibend (400mg)	Hiral Labs Ltd
343	Himobendazole (10ml)	Hindustan Pharmaceuticals
344	Hizol (10ml)	The Pharmed Research Lab Pvt Ltd
345	Hizol (400mg)	Hinglaj Laboratories of India
346	Hymin (10ml)	Intra Labs India Pvt Ltd
347	Hymin (400mg)	Intra Labs
348	Hymin (400mg)	Intra Labs India Pvt Ltd
349	Hymin (400mg/5mL)	Intra Labs
350	Hyzole (400mg)	Trio Remedies Pvt.Ltd
351	K Bex (400mg)	Kumayun Drugs Private Limited
352	Kealworm (400mg)	Sandoz (Novartis India Ltd)
353	Kexorm (10ml)	Cadex Laboratories
354	Kidazol (10ml)	Amwell Pharmaceuticals Pvt. Ltd
355	Kidazol (400mg)	Amwell Pharmaceuticals Pvt. Ltd
356	Kidi (10ml)	Alpha Aromatic Pvt. Ltd
357	Kidi (400mg)	Alpha Aromatic Pvt. Ltd
358	Kil (400mg)	Vision Medilink
359	Kinzol (400mg)	Materkin Formulation (Symbiosis Pharmaceuticals)

		Pvt Ltd)
360	Kiraja (400mg)	Medizone
361	Kiraza (10ml)	Medizone
362	Kiraza (400mg)	Medizone
363	Kitnil (400mg)	Modern Pharmaceuticals
364	Lezole (400mg)	Good Luck Pharma Pvt. Ltd
365	Low (200mg)	Satven And Mer
366	Low (400mg)	Satven And Mer
367	Lupibend (10ml)	Lupin Laboratories Ltd
368	Lupibend (400mg)	Lupin Laboratories Ltd
369	Lupiworm (10mL)	Lupin
370	M Benda (10ml)	Maa Formulations Pvt Ltd
371	Mbend (10ml)	Mittal Remedies
372	Mbend (400mg)	Mittal Remedies
373	Meban (10ml)	Health Biomed Pharma
374	Meban (400mg)	Health Biomed Pharma
375	Mebzol (400mg)	Esskay Bee Pharma
376	Meczol (400mg)	Mccoys Biotech
377	Merimin (400mg)	Merion Care
378	Metalben (10ml)	Cosmopack Pvt Ltd
379	Milibend (10ml)	Milieus (Glenmark Pharmaceuticals Ltd)
380	Milibend (400mg)	Milieus (Glenmark Pharmaceuticals Ltd)
381	Monoworm (400mg)	Zee Cure Pharmaceuticals Pvt Ltd
382	Morband (10ml)	Moraceae Pharmaceuticals (P) Ltd
383	Morband (400mg)	Moraceae Pharmaceuticals (P) Ltd
384	Morezole (400mg)	Morepen LaboratoriesLtd
385	N Ford (400mg)	N.B. Pharma
386	Nbworm (10ml)	N.B. Healthcare
387	Nbworm (400mg)	N.B. Healthcare
388	Nemaban (10ml)	Yacca Pharmaceuticals Pvt Ltd
389	Nemaban (400mg)	Yacca Pharmaceuticals Pvt Ltd
390	Nemacys (10ml)	East African (I) Remedies Pvt Ltd
391	Nemofex (10ml)	Pharma Synth Formulations

		Ltd
392	Nemofex (chewable) (400mg)	Pharma Synth Formulations Ltd
393	Nemazole (10ml)	IPCA Laboratories Ltd
394	Nemazole (200mg/5mL)	IPCA
395	Nemazole (400mg)	IPCA
396	Nemazole (400mg)	IPCA Laboratories Ltd
397	Nemtel (400mg)	Kaleon Laboratory
398	Neurozole (400mg)	Thurs Pharmaceuticals
399	Nibend (400mg)	Aknil Biotech
400	Nikal (10ml)	Abyss Pharma Pvt. Ltd
401	Nikal (400mg)	Abyss Pharma Pvt. Ltd
402	Nilbye (10ml)	Ramose Laboratories Pvt. Ltd
403	Nilbye (400mg)	Ramose Laboratories Pvt. Ltd
404	Nilworm (400mg)	Allure Remedies Pvt Ltd
405	No Entry (400mg)	Remedies Pharmaceuticals (India) Ltd
406	Noentry (10ml)	Redson Pharmaceuticals
407	Noentry (400mg)	Redson Pharmaceuticals
408	Notel (10ml)	Embiotic Laboratories (P) Ltd
409	Notel (400mg)	Embiotic Laboratories (P) Ltd
410	Noworm (10ml)	Ulticare (Alkem Laboratories Ltd)
411	Noworm (200mg/5mL)	Alkem (Ulticare)
412	Noworm (400mg)	Alkem (Ulticare)
413	Noworm (400mg)	Ulticare (Alkem Laboratories Ltd)
414	Nubend (10ml)	Kopran Pharma Ltd
415	Nubend (400mg)	Kopran Pharma Ltd
416	Odal (10ml)	Klar Sehen Pvt. Limited
417	Odal (400mg)	Klar Sehen Pharmaceuticals Pvt Ltd
418	Ofbend (10ml)	Obzone Pharmaceuticals Pvt. Ltd
419	Ofbend (400mg)	Obzone Pharmaceuticals Pvt. Ltd
420	Olban (10ml)	Indoco Remedies Ltd
421	Olban (400mg)	Indoco Remedies Ltd
422	Olpar (400mg)	Altar Sri Labs Pvt Ltd
423	Olworm (10ml)	Biochem Pharmaceutical Industrial Ltd

424	Olworm (400mg)	Biochem Pharmaceutical Industrial Ltd
425	Omnitel (10ml)	Pharmed Limited
426	Omnitel (400mg)	Pharmed Limited
427	One T (400mg)	Smilax Pharmaceuticals
428	Orbil (200mg)	Neon Laboratories Ltd
429	Orbil (400mg)	Neon Laboratories Ltd
430	Ornabend (400mg)	Alicon Pharmaceuticals Pvt. Ltd
431	Ortel (10ml)	Orison Pharmaceuticals
432	Oseben (10ml)	Roselabs Healthcare Pvt. Ltd
433	Oseben (400mg)	Roselabs Healthcare Pvt. Ltd
434	Out (10ml)	Udik Pharmaceuticals Pvt. Ltd
435	Out (400mg)	Udik Pharmaceuticals Pvt. Ltd
436	P Worm (10ml)	Pure Win Labs Pvt. Ltd
437	P Worm (400mg)	Pax Healthcare
438	Panamint (10ml)	Seagull Labs (I) Pvt Ltd
439	Panamint (400mg)	Seagull Labs (I) Pvt Ltd
440	Papa A (10ml)	Euphoric Pharmaceuticals Pvt.Ltd
441	Pedazole (400mg)	Affy Pharma Pvt. Ltd
442	Pentanil (400mg)	Biocare Remedies
443	Priworm (10ml)	Prisma Healthcare
444	Priworm (400mg)	Prisma Healthcare
445	Q Anzol (10ml)	Que Pharma Pvt.Ltd
446	Q Anzol (400mg)	Que Pharma Pvt.Ltd
447	Quitiz (400mg)	Mefro Pharmaceuticals Pvt Ltd
448	R Ben (10ml)	Renascent
449	Rambend (10ml)	Om Hare Ram Healthcare Pvt. Ltd
450	Rambend (400mg)	Om Hare Ram Healthcare Pvt. Ltd
451	Raxban (10ml)	Rax Health Care Pvt. Ltd
452	Rayband (10ml)	Greenray Pharmaceuticals (P) Ltd
453	Rayband (400mg)	Greenray Pharmaceuticals (P) Ltd
454	Reben (400mg)	Rhydburg Pharmaceuticals Ltd
455	Rebend (400mg)	Redix Life Care Pvt. Ltd

456	Rediout (10ml)	Dr Reddy Laboratories Ltd
457	Rediout (400mg)	Dr Reddy Laboratories Ltd
458	Rediout (400mg)	Dr. Reddy`s
459	Rediout (400mg/5mL)	Dr. Reddy`s
460	Reliben (400mg)	Medico Health Care
461	Rezol (400mg)	Chemo Drugs
462	Rid (10ml)	Egis Healthcare
463	Rid (400mg)	Egis Healthcare
464	SAF A (400mg)	Ar-Ex Laboratories Pvt.Ltd
465	Salben (10ml)	Satya Kalindi Remedies Pvt. Ltd
466	Salben (400mg)	Satya Kalindi Remedies Pvt. Ltd
467	Santil (15ml)	Arvincare
468	Santil (400mg)	Arvincare
469	Sanzol (400mg)	Shilar Pharmaceuticals
470	Sarazol (10ml)	Normak Laboratories
471	Sarazol (400mg)	Normak Laboratories
472	Sayobend (10ml)	Zota Healthcare Pvt. Ltd
473	Sebend (400mg)	Smaco Biocon
474	Sennazole (400mg)	Perk Pharmaceuticals Ltd
475	Seriworm (10ml)	Adcco Limited
476	Seriworm (400mg)	S.R. Medicare (P)Ltd
477	Shazole (10ml)	Shantam Pharmaceuticals Pvt. Ltd
478	Shazole (400mg)	Shantam Pharmaceuticals Pvt. Ltd
479	Siabend (10ml)	Nestor Pharmaceuticals Ltd
480	Sidose (400mg)	Emcee Pharmaceuticals Pvt.Ltd
481	Single A (400mg)	Adcco Limited
482	Single P (10ml)	Pax Healthcare
483	Sioban (10ml)	Albert David Limited
484	Sioban (400mg)	Albert David Limited
485	SL (10ml)	Fine Kind Drugs & Pharmaceuticals
486	SL 400 (400mg)	Fine Kind Drugs & Pharmaceuticals
487	Sona (400mg)	Ceza Formulations Pvt.Ltd
488	Sovibend (400mg)	Gopal Life Sciences (Sovia Altis)

489	Sozibendal (400mg)	Sozin Flora Pharma
490	Sumuth (400mg)	Pfiscar India Limited
491	Sworm (400mg)	Eocare
492	Symbend (10ml)	Symbiosis Labs (P) Ltd
493	Symbend (400mg)	Symbiosis Labs (P) Ltd
494	Tagazole (10ml)	Stadmed Pvt Ltd
495	Tagazole (400mg)	Stadmed Pvt Ltd
496	Taur Worm (10ml)	Taurus Laboratories Pvt. Ltd
497	Taurworm (10ml)	Taurus Laboratories Pvt. Ltd
498	Taurworm (400mg)	Taurus Laboratories Pvt. Ltd
499	Taworm (400mg)	Maya Drugs & Antibiotics
500	Teezbend (10ml)	Amyteez Healthcare Pvt Ltd
501	Teezbend (400mg)	Amyteez Healthcare Pvt Ltd
502	Tel (400mg)	Artel Laboratories
503	Thelmin (10ml)	Moxy Laboratories Pvt. Ltd
504	Thelmin (400mg)	Moxy Laboratories Pvt. Ltd
505	Tikworm (10ml)	Shreeji Healthcare Impex
506	Tikworm (400mg)	Shreeji Healthcare Impex
507	Tiobend (10ml)	Cipla Limited
508	Tiobend (400mg)	Cipla Limited
509	Tiveable (400mg)	Sanative Remedies (Sanify Healthcare Pvt.Ltd)
510	Toko Forte (10ml)	Lark Laboratories (India) Ltd
511	Toko Forte (400mg)	Lark Laboratories (India) Ltd
512	Trualba (400mg)	Trugen Pharmaceuticals Pvt. Ltd
513	Tuff (5ml)	Lancer Health Care Pvt. Ltd
514	Tybend (400mg)	Amity Health Care Pvt. Ltd
515	Ulben (400mg)	Jasco Lab (P)Ltd
516	Valbason (400mg)	Adison Laboratories
517	Varbend (400mg)	Zota
518	Varbend (400mg)	Zota Healthcare Pvt. Ltd
519	Vdworm (400mg)	Jian Pharmaceuticals
520	Verben (400mg)	Vermilion Healthcare Pvt Ltd
521	Vermin (10ml)	Corvin Pharmaceuticals
522	Vermitel (10ml)	Astra Zeneca Pharma India Limited
523	Vermitel (400mg)	Astra Zeneca Pharma India Limited
524	Vikbend (400mg)	Anvik Biotech
525	Vinole (400mg)	Shreeyam Health Care

526	VJ Bend (10ml)	Springer Bio-Tech (Zota Healthcare Pvt Ltd)
527	VJ Bend (400mg)	Springer Bio-Tech (Zota Healthcare Pvt Ltd)
528	Vormout (10ml)	Genvista (Cadila PharmaceuticalsLtd)
529	Vormout (200mg)	Cadila (Genvista)
530	Vormout (400mg)	Cadila (Genvista)
531	Vormout (400mg)	Genvista (Cadila PharmaceuticalsLtd)
532	War (400mg)	Suzikem Drugs Pvt. Ltd
533	Warmy A (400mg)	Esquire Drug House
534	Wenkill (10ml)	Wens Drugs (India) Pvt Ltd
535	Wenkill (400mg)	Wens Drugs (India) Pvt Ltd
536	Winkill (400mg)	Wens Pharma Pvt Ltd
537	Winworm (400mg)	Oyster Labs Limited
538	Winworm Chewable (400mg)	Adonis Labs. (Pvt.) Ltd
539	Wocid (10ml)	Ratchet Biotech Pvt. Ltd
540	Wocid (400mg)	Ratchet Biotech Pvt. Ltd
541	Womgo (400mg)	Welbe Life Sciences
542	Womi (400mg)	Ideal Healthcare Pvt. Ltd
543	Womiban (10ml)	Gold Cross (Blue Cross LaboratoriesLtd)
544	Womiban (200mg/5mL)	Blue Cross (Excel)
545	Womiban (400mg)	Blue Cross (Excel)
546	Womiban (400mg)	Gold Cross (Blue Cross LaboratoriesLtd)
547	Woodband (400mg)	Woodrock Healthcare Pvt. Ltd
548	Woriv (10ml)	East African (I) Remedies (P) Ltd
549	Woriv (400mg)	East African (I) Remedies (P) Ltd
550	Worm Hunt (10ml)	Bindlysh Biotech Ltd
551	Worm Hunt (400mg)	Bindlysh Biotech Ltd
552	Worm X (400mg)	Erma Life Sciences
553	Wormcure (400mg)	Patson Laboratories Pvt.Ltd
554	Wormicare (10ml)	Azine Healthcare Pvt. Ltd
555	Wormicare (200mg/5mL)	Azine
556	Wormicare (400mg)	Azine
557	Wormicare (400mg)	Azine Healthcare Pvt. Ltd

558	Wormicid (10ml)	Oirpil Biotech
559	Wormikin (400mg)	Kinson Pharma
560	Wormin A (10ml)	Cadila Pharmaceuticals Ltd
561	Wormin A (400mg)	Cadila Pharmaceuticals Ltd
562	Wormivon (400mg)	Von Remedies
563	Wormix (10ml)	Hamax Pharmaceuticals
564	Wormix (400mg)	Hamax Pharmaceuticals
565	Wormizole (10ml)	Merril Pharma Pvt.Ltd
566	Wormizole (400mg)	Pure Win Labs Pvt. Ltd
567	Wormja (10ml)	Scott-Edil Pharmacia Ltd
568	Wormja (400mg)	Scott-Edil Pharmacia Ltd
569	Wormkut (10ml)	Alpic Remedies Ltd
570	Wormol (30ml)	Esquire Drug House
571	Wormonil (10ml)	PDC Healthcare
572	Wormonil (400mg)	PDC Healthcare
573	Wormorid (10ml)	Finecure Pharmaceuticals Ltd
574	Wormorid (200mg/5mL)	Finecure
575	Wormorid (400mg)	Finecure
576	Wormorid (400mg)	Finecure Pharmaceuticals Ltd
577	Wormpel (10ml)	Aglowmed Ltd
578	Wormpel (200mg/5mL)	Aglowmed
579	Wormpel (400mg)	Aglowmed
580	Wormpel (400mg)	Aglowmed Ltd
581	Wormtec (400mg)	Aztec Life Sciences
582	Wormtel (10ml)	Petrosolv India Limited
583	Wormtel (10ml) (Vista Healthcare)	Vista Healthcare
584	Wormtel (400mg)	Petrosolv India Limited
585	Wormy (10ml)	Cosmas Pharmacls
586	Wornil (10ml)	Mount Mettur Pharmaceuticals Ltd
587	Wornil (400mg)	Mount Mettur Pharmaceuticals Ltd
588	Worreen (10ml)	Agrawal Pharmaceuticals
589	Worzole (10ml)	Gracure Pharmaceuticals Ltd
590	Wox (10ml)	Multicure (Laborate Pharmaceuticals IndiaLtd)
591	Wox (400mg)	Multicure (Laborate Pharmaceuticals IndiaLtd)
592	X Worm (10ml)	Cipla Limited
593	X Worm (400mg)	Cipla Limited

594	Xenda (10ml)	Eros Pharma Ltd (Micro Labs Ltd)
595	Xenda (200mg/5mL)	Micro Eros
596	Xenda (400mg)	Eros Pharma Ltd (Micro Labs Ltd)
597	Xenda (400mg)	Micro Eros
598	Xenith (10ml)	Mapra Laboratories Pvt Ltd
599	Xenith (400mg)	Mapra Laboratories Pvt Ltd
600	Xeroworm AD (400mg)	Alpha Drugs & Pharmaceuticals
601	YBZ (15ml)	Nuclear Pharmaceuticals
602	YBZ (400mg)	Nuclear Pharmaceuticals
603	Zaa (400mg)	Daffohils Pharma Pvt. Ltd
604	Zalvon (400mg)	ST Sharda Lifesciences
605	Zantol (10ml)	Shalina Laboratories Ltd
606	Zantol (400mg)	Shalina Laboratories Ltd
607	Zeben (10ml)	Libra Drugs (India)
608	Zeben (400mg)	Libra Drugs (India)
609	Zelbend (400mg)	German Remedies (Zydus Cadila HealthcareLtd)
610	Zelbend (400mg)	Zydus (G. Rem)
611	Zenben (400mg)	Zenlabs India
612	Zencid (10ml)	Helax Health Care
613	Zencid (400mg)	Helax Health Care
614	Zend (400mg)	Zenon Healthcare
615	Zenda (400mg)	Glosun Pharmaceuticals (P)Ltd
616	Zenoa (400mg)	Glosun Pharmaceuticals (P)Ltd
617	Zentel (10ml)	Glaxo Smithkline Pharmaceuticals Ltd
618	Zentel (200mg/5mL)	GSK
619	Zentel (400mg)	Glaxo Smithkline Pharmaceuticals Ltd
620	Zentel (400mg)	GSK
621	Zentic (200mg)	Taj Pharmaceuticals Ltd
622	Zentic (400mg)	Taj Pharmaceuticals Ltd
623	Zentic Syr (10ml)	Taj Pharmaceuticals Ltd
624	Zentic Tab (400mg)	Taj Pharmaceuticals Ltd
625	Zentir (400mg)	Welkind Pharma
626	Zeroworm (400mg)	Talent Laboratories

627	Zeworm (10ml)	Beckcem Drugs International (P) Ltd
628	Zeworm (400mg)	Beckcem Drugs International (P) Ltd
629	Zobend (10ml)	Zota Pharmaceuticals (Zota Healthcare Pvt Ltd)
630	Zobend (400mg)	Zota Pharmaceuticals (Zota Healthcare Pvt Ltd)
631	Zobenda (400mg)	Zorex Pharma Pvt. Ltd
632	Zolben (10ml)	Dynamic Laboratories Pvt. Ltd
633	Zolben (400mg)	Dynamic Laboratories Pvt. Ltd
634	Zolox (400mg)	Retec Formulations Pvt. Ltd
635	Zondal (10ml)	Aan Pharma Pvt Ltd
636	Zondal (400mg)	Aan Pharma Pvt Ltd

Fonte: Elaborada pelo autor (2017) com base nas informações extraídas do banco de dados Medindia (disponível em: www.medindia.net/drug-price/albendazole.htm).

APÊNDICE B – Lista de genes diferencialmente expressos após o tratamento com ABZ e comparados com o grupo controle.

Planilha 2 – Lista de genes *up* e *down* regulados na linhagem DDT após 12h de exposição ao ABZ.

	Gene	log₂FC	log₂CPM	PValue	FDR
	GM11223	6,156941	-1,81618	4,27E-08	9,99E-06
	GM13578	3,806308	-1,54202	1,12E-07	2,31E-05
	GM14857	3,467413	-1,3907	6,45E-08	1,44E-05
	NPC1L1	3,017058	-1,18474	5,08E-08	1,16E-05
	PCDH17	2,895047	-0,89574	1,38E-09	4,45E-07
	GM9531	2,845287	0,379979	1,66E-21	5,65E-18
	NR4A3	2,724189	0,213453	1,8E-18	4,58E-15
	COL12A1	2,627268	-1,25799	1,63E-06	0,000261
	GM4204	2,125057	2,948777	1,04E-47	1,06E-43
	HIST1H2BC	2,03287	1,287383	2,5E-22	1,02E-18
	NLRX1	1,913361	-0,69067	1,65E-06	0,000262
	NR4A1	1,84563	2,366315	6,81E-31	4,62E-27
	SGIP1	1,798398	4,474202	2,19E-53	4,45E-49
	MYH3	1,743457	-0,02321	9,87E-09	2,72E-06
	HHIPL2	1,725907	1,201118	1,35E-16	2,11E-13
	PPFIA4	1,550716	-0,29828	4,18E-06	0,000556
	ACER2	1,496777	1,535119	3,33E-15	4,52E-12
	AA986860	1,490871	0,020588	3,96E-07	7,47E-05
	LRRN4CL	1,487581	0,369177	1,78E-08	4,64E-06
	GIMAP4	1,339266	0,104416	2,48E-06	0,000353
	GPR171	1,2492	1,989086	6,93E-14	4,7E-11
	TIRAP	1,208264	0,406988	2,65E-06	0,000364
	INSL5	1,175898	1,483902	3,22E-10	1,24E-07
	RPL5-PS1	1,152724	0,640255	1,35E-06	0,000219
	SPSB1	0,951661	3,625163	7,62E-15	6,93E-12
	IMPG2	0,892515	1,474667	2,13E-06	0,000312
	EGR1	0,88798	1,671275	5,24E-07	9,8E-05
	TCTEX1D1	0,846603	2,427183	1,44E-08	3,81E-06
	PLK2	0,846302	1,552754	2,63E-06	0,000364
	ACOXL	0,826335	1,853598	7,91E-07	0,00014
	TXNIP	0,782671	5,391841	1,26E-13	7,69E-11
	ESRP1	0,771619	3,614232	3,82E-10	1,39E-07
	DUSP5	0,752471	3,450402	1,84E-09	5,58E-07
	NESPAS	0,729851	2,41615	9,84E-07	0,000167
	CCR9	0,693244	7,969003	2,87E-12	1,39E-09
	MAP3K19	0,691613	2,788599	6,12E-07	0,000111
	ICOS	0,690454	3,314547	6,96E-08	1,51E-05

AHNAK	0,6888	2,868521	5,56E-07	0,000103
WDR78	0,685122	5,540505	6,28E-11	2,72E-08
ITGAM	0,684059	3,688887	1,8E-08	4,64E-06
TCP11L2	0,676595	2,382248	6,46E-06	0,000787
SELL	0,673772	5,793243	7,22E-11	3,06E-08
IKZF2	0,654061	6,902708	7,78E-11	3,11E-08
B3GALT5	0,638381	3,901215	6,54E-08	1,45E-05
RNF125	0,636652	5,29401	1,76E-09	5,43E-07
GIMAP7	0,632094	2,850635	4,29E-06	0,000567
MCOLN3	0,616344	3,160213	2,15E-06	0,000312
NUP210L	0,601588	2,968144	8,26E-06	0,000956
GRAMD3	0,527726	4,523339	2,06E-06	0,000306
PDE4D	0,507389	5,769349	9,64E-07	0,000165
PPP1R16B	0,503798	7,666349	3,94E-07	7,47E-05
PLCXD2	0,479804	6,552853	2,1E-06	0,00031
NABP1	0,456546	7,544999	4,41E-06	0,000576
EIF2AK3	0,449467	7,282252	6,66E-06	0,000802
FOXM1	-0,44503	7,668961	7,36E-06	0,000866
CBX5	-0,44694	10,32899	5,03E-06	0,000644
CDC6	-0,44962	7,562383	6,07E-06	0,000745
HNRNPD	-0,44975	8,146903	5,34E-06	0,000672
SC5D	-0,4517	6,588676	7,68E-06	0,000895
SLBP	-0,4531	7,564966	5,15E-06	0,000655
E2F2	-0,45397	7,152546	5,54E-06	0,000684
STARD4	-0,4562	6,875137	5,52E-06	0,000684
CCNA2	-0,4592	7,90634	3,55E-06	0,000478
HSD17B7	-0,46021	6,139604	6,66E-06	0,000802
HERPUD1	-0,46317	5,846968	7,22E-06	0,000855
PASK	-0,46326	6,400536	4,99E-06	0,000644
VEGFA	-0,46948	5,563059	6,83E-06	0,000818
PCNA	-0,47212	8,255248	1,75E-06	0,00027
ANLN	-0,4772	6,995127	1,92E-06	0,000288
CKAP2L	-0,47772	7,245534	1,7E-06	0,000267
TBC1D10B	-0,47794	5,035725	8,32E-06	0,000957
PIF1	-0,48194	5,611877	3,73E-06	0,0005
NCAPH	-0,48201	7,452213	1,29E-06	0,000214
CDKN2D	-0,48585	4,749022	8,54E-06	0,000977
RAD51AP1	-0,48781	6,255359	1,68E-06	0,000265
TUBB4B	-0,49174	8,043185	6,72E-07	0,00012
MVK	-0,49232	4,892063	5,41E-06	0,000676
ASF1B	-0,49267	6,268991	1,32E-06	0,000217
CDCA2	-0,49446	6,856572	8,64E-07	0,00015
DPYSL2	-0,49718	6,527724	8,95E-07	0,000154

DEPDC1A	-0,49803	5,560616	1,81E-06	0,000273
PLK1	-0,49938	7,117383	6,02E-07	0,00011
NRM	-0,50113	4,627311	5,29E-06	0,00067
SKA1	-0,50643	4,296957	7,69E-06	0,000895
CDC45	-0,51371	6,548869	3,8E-07	7,3E-05
CCHCR1	-0,51451	4,696903	2,62E-06	0,000364
H2AFX	-0,51596	5,156884	1,29E-06	0,000214
TMEM55B	-0,51711	4,744931	2,19E-06	0,000314
POLA1	-0,52114	6,75394	2,29E-07	4,57E-05
HMGCR	-0,52352	8,842017	1,06E-07	2,19E-05
CHTF18	-0,52417	5,334582	6,72E-07	0,00012
KPNA2	-0,52417	8,07179	1,18E-07	2,4E-05
MID1IP1	-0,52765	4,075659	4,99E-06	0,000644
GM14391	-0,5327	4,274537	2,57E-06	0,000361
PMVK	-0,53446	4,664807	1,12E-06	0,000189
PKMYT1	-0,53469	5,510816	3,2E-07	6,2E-05
ID11	-0,53707	7,442381	6,97E-08	1,51E-05
MEAF6	-0,53799	5,814629	1,97E-07	3,97E-05
MYBL1	-0,53947	4,313447	1,78E-06	0,000271
ARHGAP33	-0,54046	4,067166	2,81E-06	0,000384
PCYT2	-0,54046	7,29094	6,14E-08	1,39E-05
CENPF	-0,54049	8,477493	4,32E-08	9,99E-06
PCNA-PS2	-0,54089	6,481682	9,42E-08	2,02E-05
UBE2T	-0,54172	5,474973	2,36E-07	4,66E-05
LIG1	-0,54236	8,199651	4,12E-08	9,76E-06
NEURL1B	-0,54318	3,68328	6,93E-06	0,000825
BRIP1	-0,54822	5,973912	9,61E-08	2,04E-05
STIL	-0,55099	7,070129	3,77E-08	9,13E-06
SLC9A5	-0,55762	3,942992	1,78E-06	0,000271
CLSPN	-0,56009	7,515716	1,84E-08	4,67E-06
KIF11	-0,56065	8,463015	1,35E-08	3,61E-06
CDCA3	-0,56095	7,035677	2,19E-08	5,43E-06
CCNE2	-0,56654	5,880477	3,97E-08	9,5E-06
NCAPG2	-0,57283	8,176821	7E-09	2,01E-06
INSIG1	-0,5767	7,533808	6,85E-09	1,99E-06
CDK1	-0,5794	6,936912	7,98E-09	2,26E-06
SQLE	-0,58143	8,112823	4,25E-09	1,25E-06
NELFE	-0,58619	5,878161	1,34E-08	3,61E-06
KIFC5B	-0,58659	3,814553	8,2E-07	0,000144
LIPG	-0,58688	5,587732	1,88E-08	4,73E-06
HYLS1	-0,58734	4,611616	9,97E-08	2,09E-05
PCK2	-0,59204	3,38276	2,56E-06	0,000361
GM20667	-0,59386	3,503579	1,72E-06	0,000268

CENPL	-0,60863	5,262916	9,24E-09	2,58E-06
MKI67	-0,61372	9,868876	4,11E-10	1,47E-07
HMMR	-0,61639	7,122851	7,55E-10	2,6E-07
KIF24	-0,6187	6,187391	1,4E-09	4,45E-07
SAMD1	-0,62318	5,887901	1,56E-09	4,89E-07
LDLR	-0,62373	7,767351	3,41E-10	1,28E-07
FGF21	-0,62461	3,654966	2,76E-07	5,4E-05
TRIB3	-0,62945	5,436885	2,18E-09	6,52E-07
SMTN	-0,63115	4,273363	2,62E-08	6,43E-06
FSBP	-0,63163	3,007955	2,17E-06	0,000313
TUBA1C	-0,63947	5,571118	9,49E-10	3,17E-07
ACAT2	-0,6458	5,978306	3,5E-10	1,3E-07
FADS2	-0,64608	6,563688	1,75E-10	6,86E-08
TYMS	-0,65506	6,869206	7,62E-11	3,1E-08
CYP51	-0,67995	7,887073	7,5E-12	3,39E-09
TUBA1B	-0,69699	8,137126	2,03E-12	1,03E-09
INCENP	-0,69728	7,506133	2,71E-12	1,35E-09
AACS	-0,7	6,962254	3,34E-12	1,58E-09
LRFN1	-0,70151	2,487797	1,62E-06	0,000261
MIS18BP1	-0,70589	6,447356	3,7E-12	1,71E-09
CCNE1	-0,71076	4,120169	7,88E-10	2,67E-07
STC2	-0,71659	7,352753	7,54E-13	4,15E-10
2810417H13RIK	-0,71898	8,185174	4,01E-13	2,33E-10
MSMO1	-0,72913	6,857912	4,55E-13	2,57E-10
DEPDC1B	-0,73522	4,832632	1,43E-11	6,33E-09
SCD1	-0,74022	3,657132	1E-09	3,29E-07
TCF19	-0,74993	5,359929	1,23E-12	6,44E-10
RRM2	-0,76076	8,617044	1,42E-14	1,16E-11
TK1	-0,76202	6,324304	8,02E-14	5,27E-11
AURKB	-0,76239	7,192597	2,85E-14	2E-11
FBXO5	-0,76313	6,144645	9,79E-14	6,23E-11
TUBB5	-0,76381	10,44253	7,78E-15	6,93E-12
NUSAP1	-0,76768	7,834418	1,18E-14	1E-11
FAM64A	-0,76782	5,818609	1,28E-13	7,69E-11
TOP2A	-0,76857	10,46373	5,32E-15	6,32E-12
FDFT1	-0,77802	7,405564	7,08E-15	6,93E-12
ESCO2	-0,78364	6,294443	1,68E-14	1,27E-11
CCNF	-0,79253	6,481902	6,45E-15	6,91E-12
NSDHL	-0,79351	5,940209	1,51E-14	1,18E-11
SYNE3	-0,79783	3,28779	4,46E-10	1,57E-07
SPC25	-0,80188	5,960198	7,83E-15	6,93E-12
CDKN2C	-0,81416	5,697695	5,58E-15	6,32E-12
MVD	-0,81579	5,754706	4,26E-15	5,42E-12

	PRC1	-0,82392	6,828261	3,32E-16	4,83E-13
	E2F8	-0,85076	6,416486	6,96E-17	1,18E-13
	HMGCS1	-0,85564	8,378654	6,2E-18	1,4E-14
	MXD3	-0,86463	4,330312	2,25E-14	1,64E-11
	ANKLE1	-0,88346	3,568258	9,58E-13	5,14E-10
	LSS	-0,90279	7,260949	2,36E-19	6,86E-16
	NEIL3	-0,92664	4,872531	1,62E-17	3,3E-14
	SLC25A1	-0,9443	4,555553	2,18E-17	4,04E-14
	GM20721	-1,01807	0,838989	3,01E-06	0,000408
	CLDN12	-1,01925	0,869465	4,34E-06	0,00057
	GM5620	-1,05457	2,065478	7,47E-11	3,1E-08
	CHAC1	-1,18336	4,885758	2,78E-27	1,41E-23

Fonte: Elaborada pelo autor (2017). Nota: Vermelho denota genes *up* regulados e azul denota genes *down* regulados.

APÊNDICE C – Lista de genes diferencialmente expressos após o tratamento com EtBr e comparados com o grupo controle.

Planilha 2 – Lista de genes *up* e *down* regulados na linhagem DDT após 12h de exposição ao EtBr.

	Gene	log₂FC	log₂CPM	p-value	FDR
	TLE2	2,155	-0,513	9,81E-09	4,54E-06
	IRAK2	2,106	1,726	1,91E-28	2,77E-25
	D730001G18RIK	1,940	3,528	2,20E-47	4,48E-44
	MAPRE2	1,914	2,530	8,20E-34	1,39E-30
	OMP	1,579	-0,258	7,51E-07	0,000174
	PVRL3	1,207	3,895	1,63E-22	1,95E-19
	RGS9BP	1,160	1,243	1,24E-08	5,38E-06
	RAB13	1,138	1,163	2,96E-08	1,18E-05
	GM15832	1,128	1,421	4,73E-09	2,47E-06
	CCR7	0,996	1,956	1,92E-09	1,12E-06
	SLC22A17	0,995	1,878	9,47E-09	4,49E-06
	KIFC2	0,942	2,579	2,09E-10	1,52E-07
	SYNM	0,898	1,274	3,53E-06	0,000636
	GIMAPIOS	0,831	1,564	5,54E-06	0,000924
	UAPIL1	0,825	1,657	4,69E-06	0,000796
	SMAD7	0,805	2,172	3,30E-07	9,08E-05
	SCCPDH	0,804	1,924	2,02E-06	0,000407
	GM10762	0,751	2,166	1,79E-06	0,000364
	TMEM241	0,745	3,641	2,48E-09	1,40E-06
	FUZ	0,739	2,253	2,44E-06	0,000469
	RASGRP4	0,690	4,047	6,68E-09	3,32E-06
	FURIN	0,677	2,584	4,00E-06	0,000702
	TUBB3	0,674	3,408	1,21E-07	4,11E-05
	MILR1	0,662	3,997	2,78E-08	1,13E-05
	SNAI3	0,657	4,999	3,15E-09	1,69E-06
	CD37	0,635	4,458	3,50E-08	1,37E-05
	GRIA3	0,624	5,088	1,74E-08	7,40E-06
	P4HA2	0,6167	4,069	2,15E-07	6,40E-05
	MT-RNR1	0,613	7,922	2,79E-09	1,54E-06
	CIART	0,599	3,344	2,80E-06	0,000517
	HEY1	0,597	5,167	5,79E-08	2,15E-05
	CNTD1	0,583	4,292	6,14E-07	0,000151
	HIF0	0,581	3,983	1,79E-06	0,000364
	RAB19	0,568	4,614	5,09E-07	0,00013
	KCTD12	0,559	4,678	7,64E-07	0,000175
	TLR12	0,547	5,128	7,11E-07	0,000168

	PPM1E	0,544	7,327	1,59E-07	5,14E-05
	ADAMTSL2	0,536	4,346	3,84E-06	0,00068
	LY75	0,534	5,113	1,37E-06	0,000297
	CD28	0,519	7,197	6,01E-07	0,000149
	GRHPR	0,517	5,630	1,64E-06	0,000345
	2010107G12RIK	0,516	5,121	2,80E-06	0,000517
	MT-RNR2	0,514	8,448	5,52E-07	0,000139
	FUBP1	0,484	9,331	2,17E-06	0,000422
	DNTT	0,464	9,309	5,72E-06	0,000947
	TFRC	-0,472	8,152	4,39E-06	0,000759
	NFYA	-0,476	7,031	4,78E-06	0,000805
	POLE	-0,479	8,346	3,03E-06	0,00055
	TIA1	-0,493	7,664	1,77E-06	0,000364
	GTF2A1	-0,519	5,878	1,21E-06	0,000269
	IDI1	-0,528	7,455	3,30E-07	9,08E-05
	FAM193B	-0,529	6,044	6,66E-07	0,000161
	HSPA8	-0,534	10,415	1,67E-07	5,31E-05
	H2-T10	-0,536	5,900	5,06E-07	0,00013
	CCDC34	-0,537	4,670	2,17E-06	0,000422
	H2-T3	-0,539	6,639	2,68E-07	7,80E-05
	HSPA5	-0,542	8,700	1,26E-07	4,20E-05
	AHI1	-0,546	5,100	7,43E-07	0,000174
	CNNM1	-0,554	4,195	2,59E-06	0,000489
	SLC5A3	-0,551	6,338	1,70E-07	5,31E-05
	AACS	-0,560	7,026	7,53E-08	2,74E-05
	GM29666	-0,570	3,844	2,56E-06	0,000487
	FBXW4	-0,578	4,041	1,26E-06	0,000276
	4931406C07RIK	-0,584	4,017	1,14E-06	0,000256
	KCNA2	-0,594	3,648	1,54E-06	0,000331
	TMEM260	-0,615	5,745	1,03E-08	4,57E-06
	IAH1	-0,618	4,412	8,34E-08	2,98E-05
	OAZ2	-0,621	4,607	4,63E-08	1,78E-05
	ZFP668	-0,624	4,210	1,13E-07	3,89E-05
	OAZ1	-0,628	6,988	1,69E-09	1,03E-06
	SERAC1	-0,633	3,794	2,17E-07	6,40E-05
	SNX5	-0,641	8,292	4,58E-10	3,11E-07
	PGPEP1L	-0,645	2,695	4,44E-06	0,00076
	ZBTB20	-0,654	4,507	1,03E-08	4,57E-06
	TDRD3	-0,660	4,719	5,75E-09	2,93E-06
	COL20A1	-0,666	2,566	4,40E-06	0,000759
	2810402E24RIK	-0,668	3,563	1,44E-07	4,73E-05
	USP28	-0,676	4,896	1,28E-09	8,16E-07
	CCNE2	-0,695	5,839	8,53E-11	6,43E-08

IRAK4	-0,715	2,852	2,81E-07	7,95E-05
P2RX1	-0,717	3,320	1,94E-08	8,06E-06
BSCL2	-0,747	3,362	7,91E-09	3,84E-06
PROB1	-0,758	3,856342	5,43E-10	3,56E-07
GM28942	-0,762	2,307572	7,82E-07	0,000177
ARHGEF10L	-0,790	4,394695	6,63E-12	5,19E-09
ABCG4	-0,813	2,148284	3,81E-07	0,000102
CROCC	-0,874	4,025569	4,01E-13	3,40E-10
DHODH	-0,888	4,358176	1,82E-14	1,69E-11
MIPEP	-0,919	4,938404	2,12E-16	2,16E-13
ZC3H6	-0,944	3,513867	1,27E-13	1,13E-10
XYLB	-0,969	1,36408	3,52E-07	9,57E-05
MRPS10	-0,996	4,925902	6,23E-19	7,05E-16
PTCRA	-1,023	4,274958	2,68E-18	2,88E-15
PERM1	-1,102	1,002269	9,82E-08	3,45E-05
TIMP3	-1,145	2,660834	4,83E-15	4,68E-12
GM5466	-1,186	0,592088	6,95E-07	0,000167
GM26899	-1,326	0,061552	1,65E-06	0,000345
GM11427	-1,333	4,572621	4,31E-31	6,75E-28
ASAHI	-1,402	0,298362	1,82E-07	5,61E-05
TXNIP	-1,444	4,412095	6,07E-34	1,12E-30
CDC42BPB	-1,536	-0,092	2,81E-07	7,95E-05
PFAS	-1,547	7,230694	2,09E-48	4,73E-45
DBX2	-1,655	-0,13657	5,34E-08	2,02E-05
GM12743	-1,722	-0,64628	3,77E-06	0,000673
CCDC150	-1,905	-0,09655	1,72E-09	1,03E-06
SYK	-3,222	-1,61853	2,13E-06	0,000422
MT-CO1	-3,376	11,68368	1,22E-201	3,12E-198
GM13340	-3,590	0,051872	1,57E-22	1,95E-19
MT-ND1	-3,599	10,5975	8,87E-224	2,58E-220
MT-ATP6	-3,727	-1,65133	3,87E-07	0,000102
SLC2A13	-3,773	-1,61618	2,12E-07	6,40E-05
MT-ATP8	-4,068	7,90428	1,50E-267	5,10E-264
MT-CO2	-4,139	-1,92908	2,10E-06	0,00042
MT-CYTB	-4,592	11,54454	0	0
GM13341	-4,761	-0,07493	1,83E-26	2,48E-23
MT-ND3	-5,158	-1,18738	6,28E-13	5,11E-10
MT-ND4	-6,193	9,332774	0	0
MT-ND2	-6,268	9,006032	0	0
MT-TL1	-6,546	-1,58027	2,27E-10	1,59E-07

	MT-ND5	-6,844	9,677434	0	0
	MT-ND6	-7,850	5,598905	0	0

Fonte: Elaborada pelo autor (2017). Nota: Vermelho denota genes *up* regulados e azul denota genes *down* regulados.

ANEXOS

ANEXO A – Artigo publicado como primeiro autor

Redox Biology 10 (2016) 90–99



Contents lists available at ScienceDirect

Redox Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/redox

Albendazole as a promising molecule for tumor control



L.S.E.P.W. Castro^a, M.R. Kwiecinski^b, F. Ourique^a, E.B. Parisotto^a, V.M.A.S. Grinevicius^a,
J.F.G. Correia^a, D. Wilhelm Filho^c, R.C. Pedrosa^{a,c,*}

^a Department of Biochemistry, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC, Brazil

^b Postgraduate Program of Health Science, Universidade do Sul de Santa Catarina (UNISUL), Palhoça, SC, Brazil

^c Department of Ecology and Zoology, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Albendazole
Antitumor
Apoptosis
Cell cycle arrest
DNA fragmentation
Oxidative stress

ABSTRACT

This work evaluated the antitumor effects of albendazole (ABZ) and its relationship with modulation of oxidative stress and induction of DNA damage. The present results showed that ABZ causes oxidative cleavage on calf-thymus DNA suggesting that this compound can break DNA. ABZ treatment decreased MCF-7 cell viability ($EC_{50}=44.9$ for 24 h) and inhibited MCF-7 colony formation (-67.5% at $5 \mu\text{M}$). Intracellular ROS levels increased with ABZ treatment (-123%). The antioxidant NAC is able to revert the cytotoxic effects, ROS generation and loss of mitochondrial membrane potential of MCF-7 cells treated with ABZ. Ehrlich carcinoma growth was inhibited (-32%) and survival time was elongated (-50%) in animals treated with ABZ. Oxidative biomarkers (TBARS and protein carbonyl levels) and activity of antioxidant enzymes (CAT, SOD and GR) increased, and reduced glutathione (GSH) was depleted in animals treated with ABZ, indicating an oxidative stress condition, leading to a DNA damage causing phosphorylation of histone H2A variant, H2AX, and triggering apoptosis signaling, which was confirmed by increasing Bax/Bcl-xL rate, p53 and Bax expression. We propose that ABZ induces oxidative stress promoting DNA fragmentation and triggering apoptosis and inducing cell death, making this drug a promising leader molecule for development of new antitumor drugs.

ANEXO B – Artigo submetido como primeiro autor

PLOS Medicine <em@editorialmanager.com>
 Reply-To: PLOS Medicine <plosmedicine@plos.org>
 To: "Luiza S.E.P. Will Castro" <lsepwill@gmail.com>

Wed, Jan 11, 2017 at 2:50 PM

*****PLEASE RESPOND TO THIS EMAIL AS SOON AS POSSIBLE*****

Dear Will Castro,

On Jan 11 2017 12:50PM Dr. Heinz Jacobs submitted a manuscript entitled "Serious Drug Safety Issues Associated with the Widely Used Anti-Helminth Medicine Albendazole" to PLOS Medicine. You are listed as a contributing author on this Research Article.

PLOS Medicine

Serious Drug Safety Issues Associated with the Widely Used Anti-Helminth Medicine Albendazole --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Full Title:	Serious Drug Safety Issues Associated with the Widely Used Anti-Helminth Medicine Albendazole
Short Title:	Spindle Poison ABZ Causes Chromosome Missegregation
Article Type:	Research Article
Keywords:	Albendazole (ABZ); tubulin; spindle poison; DNA intercalation; chromosomal missegregation; loss of heterozygosity (LOH)
Corresponding Author:	Heinz Jacobs The Netherlands Cancer Institute Amsterdam, NETHERLANDS
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	The Netherlands Cancer Institute
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Luiza S.E.P. Will Castro