

**UNIVERSIDADE PAULISTA**

**PROGRAMA DE MESTRADO EM PATOLOGIA AMBIENTAL E EXPERIMENTAL**

**NEOANGIOGÊNESE PERITONEAL E INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO TUMORAL EM  
CAMUNDONGOS PORTADORES DO TUMOR ASCÍTICO DE EHRlich TRATADOS  
COM ALBENDAZOL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP, para a obtenção do título de Mestre em Patologia Ambiental e Experimental.

**NAIANE CLARA CLEMENTO**

**SÃO PAULO  
2016**

**UNIVERSIDADE PAULISTA**

**PROGRAMA DE MESTRADO EM PATOLOGIA AMBIENTAL E EXPERIMENTAL**

**NEOANGIOGÊNESE PERITONEAL E INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO TUMORAL EM  
CAMUNDONGOS PORTADORES DO TUMOR ASCÍTICO DE EHRLICH TRATADOS  
COM ALBENDAZOL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP, para a obtenção do título de Mestre em Patologia Ambiental e Experimental, sob orientação do Prof. Dr. José Guilherme Xavier.

**NAIANE CLARA CLEMENTO**

**SÃO PAULO  
2016**

Clemento, Naiane Clara.

Neoangiogênese peritoneal e inibição do crescimento tumoral em camundongos portadores do tumor ascítico de Ehrlich tratados com albendazol / Naiane Clara Clemento. - 2016.

23 f. : il. color.

Dissertação de Mestrado Apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista, São Paulo, 2016.

Área de Concentração: Biologia da Diferenciação Celular :  
Modulação por Fatores Endógenos e Exógenos.

Orientador: Prof. Dr. José Guilherme Xavier.

1. Albendazol. 2. Angiogênese. 3. Tumor de Ehrlich. I. Xavier, José Guilherme (orientador). II. Título.

**NAIANE CLARA CLEMENTO**

**NEOANGIOGÊNESE PERITONEAL E INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO TUMORAL EM  
CAMUNDONGOS PORTADORES DO TUMOR ASCÍTICO DE EHRlich TRATADOS  
COM ALBENDAZOL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP, para a obtenção do título de Mestre em Patologia Ambiental e Experimental.

**BANCA EXAMINADORA:**

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

**ORIENTADOR:**

---

Prof. Dr. José Guilherme Xavier  
Universidade Paulista-UNIP

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Selene Dall'Acqua Coutinho  
Universidade Paulista - UNIP

---

Prof. Dr. Celso Martins Pinto  
Universidade Santo Amaro - UNISA

## **AGRADECIMENTOS**

À todos os professores e professoras do programa de Mestrado em Patologia Ambiental e Experimental, que ministraram aulas das quais pude fazer parte e aprender muito.

À amiga e aluna da UNIP, Luciane Costa Dalboni, pela paciência, colaboração e generosidade em compartilhar seu conhecimento e amizade.

À professora da graduação da UNIP, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Juliana Gimenez Amaral, pelos ensinamentos, inspiração e incentivo que me trouxeram até aqui.

Ao meu orientador Prof. Dr. José Guilherme Xavier da UNIP, por todos os ensinamentos e oportunidade de aprender tanto sobre patologia, sempre com muita dedicação e doação.

**Artigo científico a ser submetido à Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**

**NEOANGIOGÊNESE PERITONEAL E INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO TUMORAL EM  
CAMUNDONGOS PORTADORES DO TUMOR ASCÍTICO DE EHRLICH TRATADOS  
COM ALBENDAZOL**

Naiane Clara Clemento<sup>1</sup>; José Guilherme Xavier<sup>1</sup>

1. Centro de Pesquisa da Universidade Paulista (UNIP), São Paulo

## RESUMO

**Introdução:** A dependência da neovascularização para o crescimento é uma característica central da biologia tumoral. A vasculatura governa a fisiopatologia dos tumores sólidos, incluindo os processos de crescimento, invasão, metastatização e a ascite maligna. A formação da ascite em pacientes com câncer em estágio avançado é um problema de difícil manejo na clínica oncológica. Previamente foi demonstrada a supressão da efusão em camundongos nude portadores de carcinoma ovariano tratados intraperitonealmente com albendazol (ABZ). Neste estudo testou-se a eficácia do ABZ contra o desenvolvimento do tumor de Ehrlich na forma ascítica, avaliando-se o derrame cavitário, a celularidade tumoral e a angiogênese peritoneal. **Métodos:** Vinte e quatro camundongos BALB/c fêmeas com 8 semanas de idade foram inoculadas intraperitonealmente com  $5 \times 10^6$  células tumorais, e 6 animais mantidos sem manipulação. Após 7 dias, os camundongos inoculados foram aleatoriamente distribuídos em grupos SHAM, recebendo 1,0 mL hidropoxi-metil-celulose(HPMC)/ip.; e ABZ, recebendo 1,0 mL albendazol (150mg/kg) suspenso em HPMC/ip. Os animais foram eutanasiados 3 e 5 dias após o tratamento. O fluido ascítico e as células tumorais foram colhidos e quantificados. O peritônio foi fixado em formol a 10%, histologicamente processado e submetido à imunomarcção para o fator VIII, procedendo-se amplificação com o método da streptavidina-biotina-peroxidase. **Resultados:** Não houve diferença quantitativa em relação ao processo efusivo, porém, a celularidade tumoral foi significativamente reduzida em animais do grupo ABZ em comparação aos do grupo SHAM ( $p < 0,001$ , ANOVA/Tukey-Kramer). Em oposição, evidenciou-se um aumento na angiogênese em animais tratados com ABZ quando comparados aos do grupo SHAM ( $p < 0,001$ , ANOVA/Tukey-Kramer). **Conclusão:** ABZ é um carbamato



benzimidazólico anti-helmíntico largamente utilizado, atuando como uma droga ligante de microtúbulos, uma possível explicação para o efeito antiproliferativo identificado sobre o tecido tumoral. Estudos adicionais serão necessários para elucidar os mecanismos envolvidos nessa resposta.

**Palavras-chave:** albendazol, angiogênese, tumor de Ehrlich

### **ABSTRACT**

**Introduction:** The dependence of tumor growth on the development of neoangiogenesis is characteristic of cancer biology. The resulting tumor vasculature governs the pathophysiology of solid tumors and thus their growth, invasion, metastasis and malignant ascites. The formation of ascites in patients with advanced-stage cancer is a difficult problem to manage in clinical oncology. Study in OVCAR-3 tumor-bearing nude mice treated with intraperitoneal albendazole (ABZ) demonstrated the suppression of malignant ascites. In the present study we tested the efficacy of ABZ against tumor growth, ascitic development and local angiogenesis on mice bearing the ascitic Ehrlich's tumor. **Methods:** Twenty four BALB/c female mice 8 weeks old were inoculated with  $5 \times 10^6$  tumor cells, and six animals were preserved without manipulation. Seven days after, the inoculated mice were randomly distributed in groups: SHAM, receiving 1,0 mL hidroperoxi-metil-celulose(HPMC)/ip.; and ABZ, receiving 1,0 mL albendazol (150mg/kg) suspended in HPMC/ip. The animals were sacrificed 3 and 5 days after treatment. The ascitic fluid were collected and quantified, and the tumoral cells counted. The peritoneal walls were fixed in 10% formalin, histologically processed and factor VIII antibody was

applied to sections by streptavidin/biotin/HRP method. **Results:** The tumor cellularity of ABZ animals was significantly reduced compared with SHAM animals ( $p < 0,001$ , ANOVA). In contrast we identified an increased angiogenesis in ABZ treated animals when compared with SHAM group ( $p < 0,001$ , ANOVA), without effect upon malignant ascites. **Conclusion:** ABZ is a widely used benzimidazole carbamate antihelminthic, acting as a microtubule-targeted drug, a possible explanation for the antiproliferative effect observed. Further studies will be necessary to elucidate the exact mechanisms involved.

**Key-words:** albendazole, angiogenesis, Ehrlich tumor

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. MATERIAIS E MÉTODOS .....	12
3. RESULTADOS .....	13
4. DISCUSSÃO .....	16
5. CONCLUSÃO .....	19
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	20

## INTRODUÇÃO

A formação de ascite durante o crescimento neoplásico é um importante problema clínico em pacientes oncológicos, elevando a morbidade, particularmente em carcinomas de ovário, cólon, estômago, pâncreas e endométrio<sup>1</sup>. Por outro lado, a limitação do processo ascítico à região abdominal viabiliza o emprego de agentes tóxicos diretamente na cavidade, permitindo elevadas concentrações da droga no sítio de crescimento tumoral por um período prolongado, com limitada toxicidade sistêmica<sup>2</sup>. Tanto o crescimento tumoral quanto a formação de ascite estão relacionados à produção do Fator de Crescimento do Endotélio Vascular (VEGF)<sup>3,4</sup>. O mecanismo envolvido no derrame presente em pacientes com carcinomatose compreende a participação do VEGF, relacionado à indução de neovascularização local e ao aumento da permeabilidade da microvasculatura tumoral<sup>5,6</sup>. O emprego de anticorpos anti-VEGF suprime ambos os processos<sup>7</sup>. Pourgholami et al. (2006) evidenciaram a inibição da ascite maligna em modelo de carcinoma ovariano murino, associada à antagonização da produção de VEGF pelo albendazol, um carbamato benzimidazólico originariamente produzido para uso veterinário atuando como anti-helmíntico, via inibição da polimerização de microtúbulos<sup>9</sup>. Considerando a relevância desses achados e sua potencial aplicabilidade em termos clínicos, no presente estudo investigou-se a ação do albendazol sobre o desenvolvimento tumoral e a efusão maligna em um modelo clássico em oncologia experimental, o tumor de Ehrlich na forma ascítica. Em paralelo, avaliou-se a densidade microvascular na parede peritoneal durante o processo.

## MATERIAIS E MÉTODOS

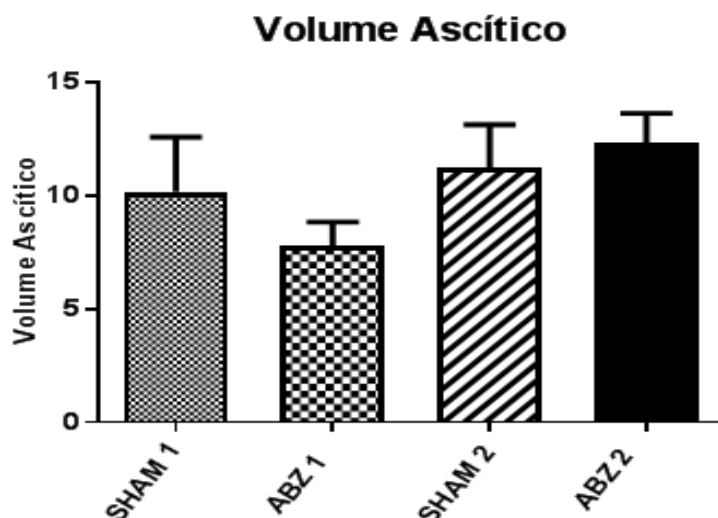
O estudo foi aprovado pelo CEP/ICS/UNIP, sob o protocolo Nº 117/12. Foram utilizados 30 camundongos BALB/c, fêmeas, pesando entre 20 e 30g., mantidos no Biotério da Universidade Paulista, com condições de iluminação, temperatura e umidade controladas, recebendo ração e água “*ad libitum*”. Inicialmente 24 camundongos receberam inóculo intraperitoneal de 0,1 mL de solução contendo  $5 \times 10^6$  células tumorais e 6 permaneceram sem manipulação (Controle). Após 7 dias de crescimento tumoral os animais foram divididos em 2 grupos para tratamento: SHAM, recebendo inóculo intraperitoneal único de 1,0 mL de 0,5% hidroperoxi-metil-celulose (HPMC); ABZ, recebendo inóculo intraperitoneal único de 1,0 mL de albendazol (150 mg/kg suspenso em HPMC). Três (SHAM1, ABZ1) e cinco (SHAM2, ABZ2) dias pós-tratamento, três animais sem manipulação, seis animais do grupo SHAM e seis animais do grupo ABZ foram eutanasiados.

Os animais foram individualmente pesados em dias alternados durante o experimento. Em sequência à eutanásia, foi procedida lavagem peritoneal com a introdução de 2,0 mL de solução salina em cavidade, seguindo-se a aspiração do conteúdo. O volume ascítico e o número total de células tumorais viáveis presentes na cavidade foram mensurados, com o emprego de câmara de Neubauer. Após a avaliação macroscópica, fragmentos peritoneais foram imersos em solução de formol a 10%, seguindo-se processamento histológico de rotina, corando-se os cortes pela hematoxilina/eosina. Em complemento, cortes de peritônio foram dispostos sobre lâminas silanizadas e submetidos a procedimento imuno-histoquímico, seguindo a metodologia descrita por Hsu et al. (1981). Como anticorpo primário, foi empregado o anticorpo policlonal de coelho anti-humano fator VIII, clone A0082, DAKO. Seguiu-se a

incubação com anticorpo secundário (ADVANCE HRP Link) e complexo peroxidase (ADVANCE HRP Enzyme), empregando-se a diaminobenzidina (DAKO), como cromógeno, contracorando-se pela hematoxilina. A vascularização foi quantificada por meio da contagem de estruturas vasculares em 10 campos de grande aumento (40x). Os resultados obtidos foram submetidos à avaliação estatística empregando-se o teste t não-pareado e ANOVA/Tukey-Kramer.

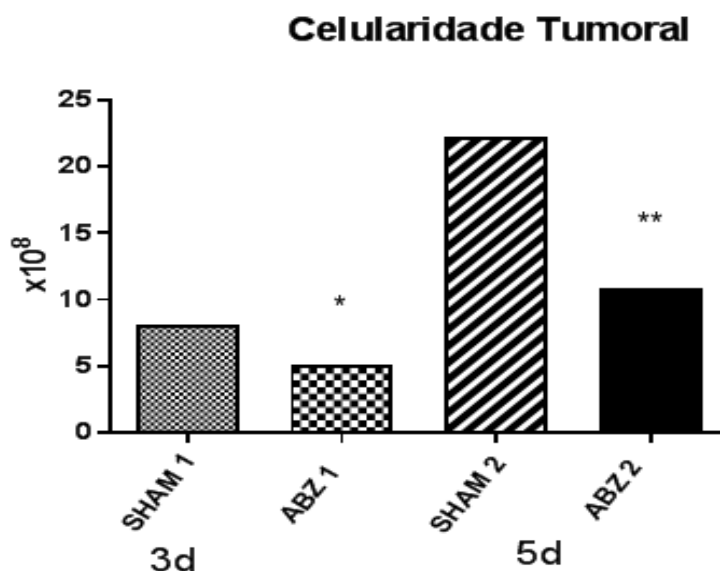
## RESULTADOS

Dos 30 camundongos fêmeas BALB/c utilizados, todos os animais do grupo controle mantiveram o peso estável durante todo o procedimento. Já os camundongos que receberam o inóculo tumoral tiveram ganho crescente de peso, sendo o incremento diário superior em animais dos grupos SHAM 1 e 2, correspondendo, respectivamente, a 0,6 g e 0,82 g, frente ao ganho de 0,43 g e 0,74 g nos animais tratados com albendazol. Após a eutanásia, o volume ascítico foi quantificado, não sendo identificada diferença estatística entre os grupos controle e ABZ em qualquer dos períodos (**figura 1**).



**Figura 1.** Volume ascítico (mL) em animais portadores do tumor ascítico de Ehrlich, que foram tratados com albendazol e eutanasiados 3 dias após o tratamento (ABZ 1) e eutanasiados 5 dias após o tratamento (ABZ 2) e que receberam apenas HPMC a 5% intraperitonealmente, eutanasiados 3 dias após o tratamento (SHAM 1) e eutanasiados 5 dias após o tratamento (SHAM 2).

Em relação à celularidade tumoral, observou-se, 3 dias após tratamento, no grupo SHAM1, celularidade total média de  $8,16 \times 10^8 \pm 2,05$  células tumorais, com contagem média de  $5,08 \times 10^8 \pm 1,64$  células tumorais nos animais tratados com albendazol, identificando-se diferença estatisticamente significativa entre os grupos, com  $p < 0,01$ . A diferença acentuou-se aos 5 dias pós-tratamento, quantificando-se celularidade total média de  $22,2 \times 10^8 \pm 5,8$  células tumorais nos animais do grupo SHAM2 contra  $10,89 \times 10^8 \pm 4,37$  nas fêmeas tratadas com ABZ2, caracterizando diferença estatisticamente significativa entre os grupos com  $p < 0,005$  no teste t não pareado (**figura 2**).



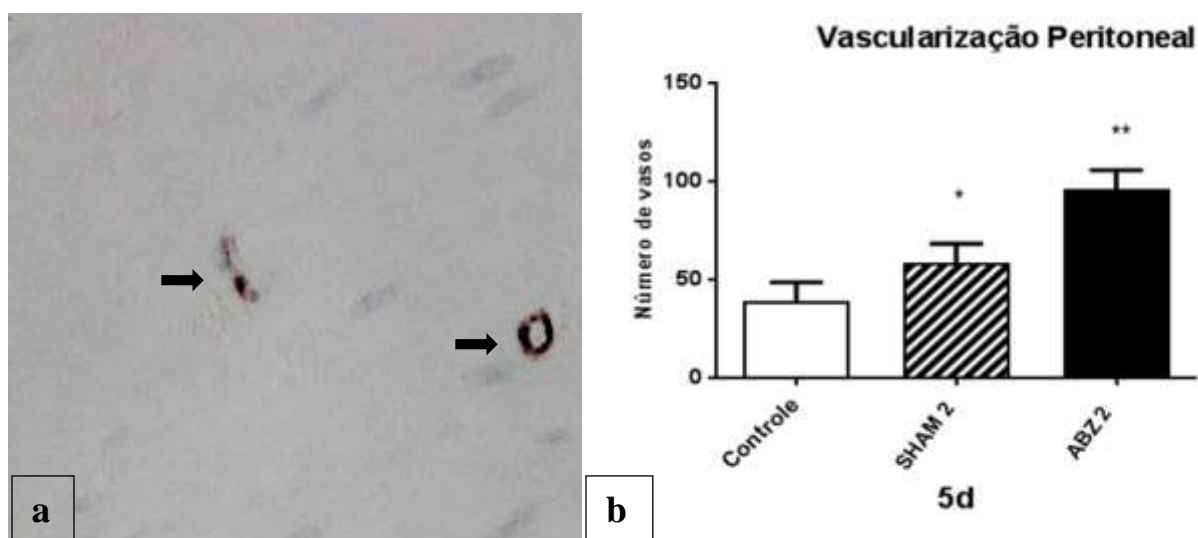
**Figura 2.** Celularidade tumoral média nos camundongos portadores de tumor ascítico de Ehrlich ( $\times 10^8$ ), recebendo albendazol (ABZ 1 e ABZ 2) ou apenas o veículo hidróxi metil celulose em dose única (SHAM 1 e SHAM 2), 3 e 5 dias pós-tratamento respectivamente.

\* diferença estatisticamente significativa, com  $p < 0,01$  no teste t não pareado entre os grupos SHAM 1 e ABZ 1.

\*\* diferença estatisticamente significativa com  $p < 0,001$  na ANOVA/ Tukey-Kramer entre os grupos SHAM 2 e ABZ 2.

Para a quantificação vascular, foram empregados cortes submetidos à imunomarcagem para o fator VIII, sendo considerados como componentes vasculares aqueles nos quais era possível a identificação da positividade citoplasmática associada à evidência de membrana basal. A densidade microvascular média foi obtida considerando-se a contagem vascular em 10 campos de grande aumento, sendo o parâmetro basal a densidade microvascular quantificada em parede peritoneal de animais controle, não-manipulados, mensurada em  $38,8 \pm 9,86$ . Os animais portadores de tumor na forma ascítica apresentaram crescimento na vascularização em parede peritoneal, sendo a densidade microvascular, em média, 3 dias pós-tratamento, de  $73 \pm 7,04$  no grupo SHAM1 e  $87,2 \pm 14,94$  no grupo ABZ1. Aos 5 dias pós-tratamento, evidenciou-se respectivamente  $58,4 \pm 9,96$  e  $95,8 \pm 10,03$  nos referidos grupos, havendo diferença estatisticamente significativa, com  $p < 0,001$  na ANOVA/Tukey-Kramer entre os grupos CONTROLE e SHAM 1, ABZ 1 e ABZ 2; e entre SHAM 2 e ABZ 2 (figura 3).





**Figura 3.** a. Fotomicrografia evidenciando imunomarcação vascular pelo fator VIII (setas), DAB contracorada com hematoxilina, 60x; b. Vascularização peritoneal, quantificada em 10 campos de grande aumento, nos camundongos do grupo controle e de portadores de tumor ascítico de Ehrlich, recebendo apenas o veículo hidropéroxido metil celulose (SHAM2) ou albendazol (ABZ2) em dose única, e eutanasiados 5 dias após o tratamento.

\* diferença estatisticamente significativa, com  $p < 0,001$  na ANOVA/Tukey-Kramer entre os grupos CONTROLE e ABZ2.

\*\* diferença estatisticamente significativa com  $p < 0,001$  na ANOVA/Tukey-Kramer entre os grupos SHAM2 e ABZ2.

## DISCUSSÃO

Embora o conhecimento acerca da biologia do câncer tenha avançado consideravelmente nas últimas décadas, a mortalidade relacionada à doença persiste elevada, sendo crescente a busca por métodos terapêuticos que contribuam para o

controle da doença<sup>11</sup>. Neste estudo empregou-se um modelo clássico em oncologia experimental, o tumor de Ehrlich em sua forma ascítica<sup>12</sup>, para uma avaliação “*in vivo*” do tratamento com o albendazol, uma droga da família dos benzimidazóis, com reconhecida atividade anti-helmíntica<sup>13</sup>. Recentemente, estudos têm postulado a atividade desse grupo de drogas sobre diversas neoplasias, como hepatocarcinomas, carcinomas adrenocorticais e pulmonares<sup>14,15,16</sup>. Pourgholami et al. (2009) identificaram, com o emprego de testes “*in vivo*” e “*in vitro*”, efeito inibitório do ABZ sobre o crescimento tumoral em linhagem de carcinoma ovariano humano OVCAR-3, por inibição à formação de VEGF, contrapondo-se à progressão da ascite. Em experimento subsequente, observou-se, com a utilização do mesmo modelo, em associação à inibição de VEGF, a supressão do Fator Transcricional Induzido por Hipoxia 1alfa (HIF-1 $\alpha$ ) no microambiente tumoral<sup>18</sup>. Neste estudo, foi empregado um modelo distinto, proveniente de carcinoma mamário murino, porém com uma característica comum ao carcinoma ovariano, representado pela indução de ascite. Embora tenha sido observada uma tendência à redução da ascite após 3 dias de tratamento, a diferença não alcançou significância estatística. Contudo, o antagonismo ao crescimento tumoral foi novamente caracterizado, reforçando o conceito de uma inespecificidade de ação, independente da histogênese tumoral, fato que potencialmente amplia sua aplicabilidade no tratamento de condições oncológicas. A principal atividade descrita para os benzimidazóis, que poderia elucidar simultaneamente os efeitos sobre o crescimento tumoral e o desenvolvimento de ascite, vincula-se à sua ação sobre os microtúbulos, componentes centrais do citoesqueleto, essenciais para a estrutura celular, o transporte intracelular e a divisão das células<sup>19</sup>. Um potencial mecanismo de ação antitumoral do ABZ seria relacionado ao comprometimento da neovascularização

por despolimerização de microtúbulos em células endoteliais<sup>20</sup>. Esse evento ganha importância em termos de processo neoplásico em razão da intrínseca necessidade de neoangiogênese para a progressão tumoral, a partir de focos de expansão tecidual com 1-2 mm. de diâmetro<sup>21</sup>. Conforme indicado por Pourgholami et al. (2010) a inibição da neovascularização também poderia dever-se à antagonização à atividade do VEGF, um fator de crescimento central na biologia tumoral, que atua sobre receptores tirosina-cinase relacionando-se ao estímulo angiogênico e proliferativo e a inibição da apoptose<sup>22</sup>. Neste estudo foi caracterizado, com o auxílio de método imuno-histoquímico para a identificação das paredes vasculares, o aumento da densidade microvascular na parede peritoneal em animais portadores do tumor na forma ascítica, evento possivelmente atrelado ao disparo de um processo inflamatório local. Dentre os portadores de tumor, contrariamente ao esperado, caracterizou-se uma maior vascularização no peritônio de camundongos que receberam o ABZ<sup>7,8</sup>. Esse efeito foi progressivo dentro do período de observação. Esses dados aparentemente conflitam com o descrito em literatura. No entanto, pode-se considerar o ABZ como um agente modulador da síntese de HIF-1 $\alpha$ , com potencial interesse como agente adjuvante no tratamento de pacientes oncológicos<sup>18</sup>. Nesse sentido, o efeito agudo de sua administração poderia ser o da inibição da neovascularização, com consequente hipóxia local. Com a progressão do experimento, dada a aplicação única, o efeito da droga seria superado em paralelo a uma potencial estabilização do fator transcricional HIF-1 $\alpha$  decorrente da hipóxia, favorecendo um perfil angiogênico, o que elucidaria a progressiva neovascularização sugerida pelos dados em animais aos 3 e 5 dias pós-tratamento. Uma estratégia plausível para a investigação desse processo seria a quantificação vascular em período precoce, como a 1 dia após inoculação da droga,

permitindo o rastreamento de uma possível atividade anti-angiogênica inicial, modulada pela inibição do eixo HIF-1 $\alpha$  VEGF. Outra alternativa seria uma segunda aplicação sucedida por nova quantificação vascular 1 dia depois. Um elemento facilitador nessa abordagem é a elevada tolerância à medicação, embora seja sugerido acompanhamento hematológico em virtude da possibilidade de desenvolvimento de neutropenia em parcela dos pacientes<sup>23</sup>.

Considerando a ação da droga sobre os microtúbulos, um alvo relevante em processos citoproliferativos seria a formação do fuso mitótico, com potencial bloqueio da transição entre metáfase a anáfase, e indução de apoptose<sup>24</sup>. Doudican et al. (2008) caracterizaram em diferentes linhagens de melanoma a atividade fosforilativa do mebendazol sobre o Bcl-2, levando à sua inativação, e, em consequência, à apoptose via Bax. Adicionalmente, estudos *in vitro* demonstraram redução da imunopositividade ao Ki67 em células de linhagem tumoral ovariana humanas OVCAR-3 frente à exposição ao ABZ<sup>17</sup>.

Assim, considerando os dados experimentais, o baixo custo e a baixa toxicidade do ABZ<sup>26</sup>, estudos adicionais são importantes para caracterizar o mecanismo de ação da droga em processos oncológicos, considerando sua interferência em atividades celulares fundamentais, como a proliferação, a apoptose e o metabolismo energético<sup>27</sup>.

## CONCLUSÃO

O fármaco albendazol, da família dos benzimidazóis, utilizado como anti-helmíntico e antiparasitário, mostrou-se efetivo na antagonização ao crescimento do tumor de Ehrlich em sua forma ascítica, associado à neovascularização peritoneal e à

manutenção da ascite maligna, apresentando potencial utilidade como droga adjuvante no tratamento de neoplasias não ressecáveis.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Smith E M; Jayson G C. The current and future management of malignant ascites, **Clinical Oncology (Royal College of Radiologists)** 2003; 15(2):59-72.
- 2- Mohamed F; Stuart O A; Sugarbaker P H. Pharmacokinetics and tissue distribution of intraperitoneal docetaxel with different carrier solutions. **Journal of Surgical Research** 2003; 113(1):114-120.
- 3- Hasumi Y; Mizukami H; Urabe M; Kohno T; Takeuchi K; Kume A; Momoeda M; Yoshikawa H; Tsuruo T; Shibuya M; Taketani Y; Ozawa K. Soluble FLT-1 expression suppresses carcinomatous ascites in nude mice bearing ovarian cancer. **Cancer Research** 2002; 62(7): 2019-2023.
- 4- Zhan N; Dong W; Wang J. The clinical significance of vascular endothelial growth factor in malignant ascites. **Tumor Biology** 2016; 37(3): 3719-3725
- 5- Nagy J A; Masse E M; Herzberg K T. Pathogenesis of ascites tumor growth: vascular permeability factor, vascular hyperpermeability, and ascites fluid accumulation. **Cancer Research** 1995; 55(2):360-368.
- 6- Kraft A; Weindel K; Ochs A. Vascular endothelial growth factor in the sera and effusions of patients with malignant and nonmalignant disease. **Cancer** 1999; 85(1):178-187.

- 7- Luo J C; Toyoda M; Shibuya M D. Differential inhibition of fluid accumulation and tumor growth in two mouse ascites tumors by an antivascular endothelial growth factor/permeability factor neutralizing antibody. **Cancer Research** 1998; 58(12):2594-2600.
  
- 8- Pourgholami M H; Cai Z Y; Lu Y; Wang L; Morris D L. Albendazole: a potent inhibitor of vascular endothelial growth factor and malignant ascites formation in OVCAR-3 tumor-bearing nude mice. **Clinical Cancer Research** 2006; 12(6):1928- 1935.
  
- 9- Lacey E. The role of the cytoskeletal protein, tubulin, in the mode of action and mechanism of drug resistance to benzimidazoles. **International Journal of Parasitology** 1989; 19(3):885-936.
  
- 10- Hsu S M; Raine L; Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry** 1981; 29(4):577-801.
  
- 11- Argyle D J; Blacking T M. From viroses to cancer stem cells: Dissecting the pathways to malignancy. **The Veterinary Journal** 2008; 171: 311-323.
  
- 12- Xavier J G; Kleeb S R. Modelos de derrames neoplásicos, In: BIBBO, M; LONGATO FILHO, A. **Aspectos Clínicos e Laboratoriais dos Derrames Cavitários** 2001; 67-72.
  
- 13- Horton J. Albendazole: a broad spectrum antihelminthic for treatment of individuals and populations. **Current Opinion in Infectious Diseases** 2002; 15(6):599-608.

- 14- Martarelli D; Pompei P; Baldi C; Mazzoni G. Mebendazole inhibits growth of human adrenocortical carcinoma cell lines both in vitro and in vivo. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology** 2008; 61(5):809-817.
- 15- Mukhopadhyay T; Sasaki J; Ramesh R; Roth J A. Mebendazole elicits a potente antitumor effect on human cancer cell lines both in vitro and in vivo. **Clinical Cancer Research** 2002; 8(9):2963-2969.
- 16- Sasaki J; Ramesh R; Chada S; Gomyo Y; Roth J A; Mukhopadhyay T. The antihelminthic drug mebendazole induces mitotic arrest and apoptosis by depolymerizing tubulin in non-small cell lung cancer cells. **Molecular Cancer Therapy** 2002; 1(13):1201-1209.
- 17- Pourgholami M H; Cai Z Y; Wang L; Badar S; Links M; Morris D L. Inhibition of cell proliferation, vascular endothelial growth factor and tumor growth by albendazole. **Cancer Investigation** 2009; 27(2): 171- 177.
- 18- Pourgholami M H; Cai Z Y; Badar S; Wangoo K; Poruchyynsky M S; Morris D L. Potent inhibition of tumoral hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  by albendazole. **BMC Cancer** 2010; 10: 143.
- 19- Nogales E. Structural insight into microtubule function. **Annual Review of biophysics and biomolecular structure** 2001; 30:397-420.
- 20- Hadfield J; Ducki S; Hirst N; McGowan A. Tubulin and microtubules as targets for anticancer drugs. **Progress in Cell Cycle and Cancer Research** 2003; 5:309-325.
- 21- Hanahan D; Weinberg RA. The hallmarks of cancer, **Cell** 2000; 100: 57-70.

- 22- Homsí J; Daud A I. Spectrum of activity and mechanism of action of VEGF/PDGF inhibitors. **Cancer Control** 2007; 14(3):285-294.
- 23- Morris D L; Jourdan J L; Pourgholami M H. Pilot study of albendazole in patients with advanced malignancy. Effect on serum tumor markers/high incidence of neutropenia. **Oncology** 2001; 61(1):42-46.
- 24- Yvon, AM; Wadsworth P; Jordan MA. Taxol suppresses dynamics of individual microtubules in living human tumor cells. **Molecular Biology of the Cell** 1999; 10: 947-959.
- 25- Doudican N; Rodriguez A; Osman I; Orlow S J. Mebendazole induces apoptosis via Bcl-2 inactivation in chemoresistant melanoma cells. **Molecular Cancer Cell Research** 2008; 6(8):1308-1315.
- 26- Choi E; Kim S; Nam E; Paek J; Yim G; Kang M; Kim Y. Differential effect of intraperitoneal albendazole and paclitaxel on ascites formation and expression. Of vascular endothelial growth factor in ovarian cancer cell bearing athymic nude mice. **Reproductive Sciences** 2011; 18(8): 763-771.
- 27- Mucaj V; Shay J E; Simon M C. Effects of hypoxia and HIFs on cancer metabolism. **International Journal of Hematology** 2012; 95(5):464-470.
- .