

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica

**NANOEMULSÃO ORAL CONTENDO FLUBENDAZOL PARA O TRATAMENTO DE
CÂNCER DE PULMÃO**

Beatriz Rabelo Folchini

Trabalho de Conclusão do Curso de
Farmácia-Bioquímica da Faculdade de
Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo.

Orientadora:

Prof^a. Dr^a. Nádia Araci Bou-Chacra

São Paulo

2022

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	1
RESUMO	2
1. INTRODUÇÃO	3
2. OBJETIVO	5
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	5
3.1 Cultura de células de câncer de pulmão	5
3.2 Formação de tumoresferas	6
3.3 Xenotransplantes a longo prazo nos animais BalbC/Nude.....	6
4. RESULTADOS.....	8
4.1 Efeito do tratamento no peso do animal	8
4.2 Efeito do tratamento no tamanho do tumor	12
4.3 Aspectos físicos dos tumores	16
5. DISCUSSÃO	18
6. CONCLUSÃO	21
7. REFERÊNCIAS	21
8. ANEXOS	25
8.1 Aprovação CEUA	25

LISTA DE ABREVIATURAS

FDA: Food and Drug Administration

EUA: Estados Unidos da América

AIDS: Acquired Immune Deficiency Syndrome

FLZ: Flubendazol

USP: Universidade de São Paulo

CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais

MAF: Maisine CC

CMF: Capmul MCM e Maisine CC

FNM: Feridas Neoplásicas Malignas

DP: Desvio Padrão

RESUMO

FOLCHINI, B R. **Nanoemulsão Oral Contendo Flubendazol Para O Tratamento De Câncer De Pulmão**. 2022. Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia-Bioquímica – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

Palavras-chave: nanoemulsão, flubendazol, câncer.

INTRODUÇÃO: O reposicionamento do FLZ, aumentando sua biodisponibilidade oral e segurança, a partir da associação do mesmo a uma nanoemulsão, pode gerar nova alternativa para tratamento de câncer que demanda urgentemente de novas opções acessíveis. Além disso, o medicamento apresenta potencial para aprovação mais rápida por utilizar fármaco seguro e conhecido no mercado. **OBJETIVO:** O presente estudo tem como objetivo a avaliação da eficácia anticâncer *in vivo* de nanoemulsões contendo flubendazol (FLZ) por via de administração oral. **MATERIAL E MÉTODOS:** Neste estudo foram injetadas tumoresferas de células de câncer A-549 na região subcutânea do dorso de camundongos machos BalbC/Nude para o monitoramento do crescimento do tumor e comparação entre os diferentes tratamentos. As amostras foram administradas três vezes por semana via gavagem, e o peso dos animais, o tamanho dos tumores e seu aspecto físico monitorados duas vezes na semana. **RESULTADOS:** Não houve diferenças significativas entre o peso dos animais e o desenvolvimento do tamanho do tumor entre os grupos testados. Contudo, foi observado uma redução significativa das feridas neoplásicas malignas (FNMs) em animais tratados com nanoemulsão contendo FLZ e fase oleosa derivada de ácido linoleico. **CONCLUSÃO:** Apesar do presente estudo demonstrar a não eficácia terapêutica das formulações apresentadas de nanoemulsões contendo flubendazol contra o desenvolvimento de tumores A-549 de câncer de pulmão, uma atividade anti-FNMs eficaz foi identificada em nanoemulsão composta por FLZ e derivado de ácido linoleico. Esta invenção oferece uma nova alternativa para a prevenção e tratamento de FNMs e maior adesão dos pacientes devido à não necessidade de pessoas especialmente treinadas para sua administração.

1. INTRODUÇÃO

O estudo e o desenvolvimento de novas moléculas, visando alternativa inovadora de tratamento no mercado, exigem tempo de projeto que varia de 10 a 17 anos (MORGAN et al., 2011), além de elevado custo, aproximadamente de US\$ 1,3 bilhão (DIMASI; GRABOWSKI; HANSEN, 2016). Ademais, relatórios de desenvolvimento de novas entidades moleculares apontaram que 56% dos novos compostos apresentam desafios relacionados à eficácia e 28%, à segurança. Desses, aproximadamente 30% são candidatos a fármacos para as áreas oncológica (ARROWSMITH; MILLER, 2013). Devido a essas dificuldades, não houve aumento significativo no índice de aprovação de novas alternativas entre 1976 e 2013 (SHIM; LIU, 2014).

Considerando esse panorama, novas soluções são de grande interesse para governos, organizações não-governamentais e acadêmicos (LOTFI SHAHREZA et al., 2017). Dentre as possibilidades existentes, a estratégia do reposicionamento de fármacos permite a aplicação desses em pesquisas tendo em vista sua atividade terapêutica para o combate a diferentes doenças. As vantagens desse processo consistem na minimização de custos (aproximadamente US \$ 300 milhões comparado a cerca de US \$ 3 bilhões para uma nova entidade molecular) (NOSENGO, 2016) e na rápida validação de novo medicamento (redução de 5 a 7 anos no tempo de desenvolvimento) (ASHBURN THOR, 2004).

Assim, essa estratégia já é responsável por cerca de 30% de novos medicamentos aprovados pela Food and Drug Administration (FDA) (JIN; WONG, 2014) e vem sendo incentivada pelos EUA e Europa por meio de programas de exclusividade de mercado e de aceleração no processo de registro para fármacos reposicionados com patentes vencidas (CHA et al., 2018). Exemplos no mercado referem-se à sildenafil (Viagra, Pfizer), inicialmente indicado para redução da hipertensão arterial pulmonar e, posteriormente para disfunção erétil e a Zidovudina, indicado para câncer e posteriormente indicado para tratamento da AIDS (CHA et al., 2018; PUSHPAKOM et al, 2019).

Dentre as áreas que podem ser altamente beneficiadas pelo reposicionamento de fármacos estão as diversas áreas dentro da oncologia. Com referência aos produtos

oncológicos, a indústria tem interesse no seu investimento, especialmente em novas abordagens de tratamento incluindo novos compostos. Contudo, a demanda é crescente por consequência de fatores como a resistência a esses fármacos. (LOTFI SHAHREZA et al., 2017).

De acordo com a *American Cancer Society*, o câncer de pulmão é uma das formas mais letais dessa doença, de forma que aproximadamente metade dos pacientes que sofrem com essa enfermidade morrem no primeiro ano. Atualmente, 86% desses pacientes não tem sobrevida superior a 5 anos (CORTÉS-FUNES, 2002).

O flubendazol (FLZ) age na estrutura dos microtúbulos das células impedindo a formação da tubulina e, conseqüentemente, induz a apoptose. Esse fármaco apresenta potencial para o tratamento de doenças negligenciadas (O'NEILL et al., 2015) e câncer (KRÁLOVÁ et al., 2013; HOU et al., 2015). Recentemente, testes *in vitro* demonstraram que o FLZ inibiu de forma dose-dependente a proliferação da linhagem celular A549 (célula de adenocarcinoma de pulmão humano), destacando sua potencial ação para inibir a progressão do câncer de pulmão (DONG, 2020). Tal potencial consiste em importante oportunidade para superar as barreiras apresentadas e introduzir um medicamento inovador no mercado.

Contudo, o FLZ possui baixa solubilidade em água (0,034 mg /ml) sendo classificado como classe II no sistema de classificação biofarmacêutica (VIALPANDO et al., 2016; AMIDOM, 1995). Essa propriedade limita a sua absorção e biodisponibilidade (NOBILIS et al., 2007; VIALPANDO et al., 2016) reduzindo a eficácia das formulações orais presentes no mercado. Dentre as estratégias para superar tal desafio, as nanotecnologias são consideradas promissoras. Essas abrangem diferentes abordagens incluindo os sistemas lipídicos nanoestruturados, como por exemplo as nanoemulsões. As vantagens da aplicação dessas referem-se ao aumento da biodisponibilidade do fármaco, a redução da sua toxicidade, o aumento da sua estabilidade e o seu possível direcionamento ao sistema linfático (PEREIRA et al., 2015; RYAN; KAMINSKAS; PORTER, 2014).

Pesquisa conduzida no laboratório da Professora Nádia Bou-Chacra, em parceria com o Instituto de Química, demonstrou a atividade anticâncer de nanocristais de FLZ em camundongos BalbC/Nude. Esse nanocristal foi administrado por via subcutânea, contra células de linhagem de câncer de pulmão humano A-549. Com esse resultado

promissor, espera-se que o flubendazol encapsulado em nanoemulsão, administrado por via oral, permita aumentar essa atividade.

Assim, o estudo de reposicionamento do FLZ apresenta potencial para gerar alternativa para tratamento de câncer que demanda urgentemente de novas opções acessíveis. Além disso, essa abordagem apresenta potencial para aprovação mais rápida por utilizar fármaco com segurança previamente estabelecida.

2. OBJETIVO

O presente estudo tem como objetivo a avaliação da eficácia anticâncer *in vivo* de nanoemulsões contendo flubendazol (FLZ) por via de administração oral.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Para etapa de ensaio de atividade antitumoral em modelo xenográfico de câncer de pulmão humano houve a colaboração da Profa. Dra. Claudiana Lameu, do Laboratório de Estudos dos Mecanismos Moleculares da Metástase, do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, com a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Química da USP conforme metodologia descrita a seguir (CEUA 164/2020).

3.1 Cultura de células de câncer de pulmão

Foi utilizado, neste estudo, a linhagem de câncer de pulmão humano A-549. A linhagem A-549 foi cultivada em garrafas apropriadas cellplus (Sarstedt) no tamanho T-25 a 37 °C em estufa com atmosfera composta por 5% de CO₂ em meio de manutenção constituído de DMEM high glucose (LGC-Biotecnologia), suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB -LGC-Biotecnologia) e penicilina/estreptomicina (1%). O meio de cultura foi trocado a cada dois dias.

3.2 Formação de tumoresferas

No momento em que as células atingiram a confluência de 80% de preenchimento na garrafa, foi adicionado aproximadamente 1mL de TrypleTM Express (Gibco). A garrafa, então, foi mantida em estufa por volta de 37 °C por 5 minutos. A contagem de células foi realizada utilizando-se a câmara de Neubauer. Em seguida, as células foram transferidas para garrafas não aderentes (Sarstedt®), para a formação das tumoresferas. Foram utilizadas 2×10^6 de células, para as garrafas hidrofóbicas de 75cm² (T-75), com meio definido, contendo RPMI, penicilina e estreptomicina (1%), fatores de crescimento epidermal EGF (Sigma-Aldrich - 20 ng/mL) e de crescimento de fibroblasto básico-b FGF (Sigma-Aldrich - 20 ng/mL) e um conjunto de suplementos N2 (1x - Life Technologies). As células foram mantidas por 4 dias sem a troca do meio, para a formação das tumoresferas, e foram monitoradas no microscópio EVOS (ThermoFisher Scientific) diariamente.

3.3 Xenotransplantes a longo prazo nos animais BalbC/Nude

Os camundongos BalbC/Nude foram mantidos em ambiente controlado, com sistema de ar-condicionado central, para ventilação e exaustão, iluminação controlada 12 horas claro/12 horas escuro, temperatura mantida em 22 °C, com ração e água. Neste estudo, foram utilizados camundongos BalbC/Nude machos, pois são modelos biológicos que apresentam deficiência imunológica. As tumoresferas foram centrifugadas em baixa rotação, em 1100 rpm por 10 minutos, e dissociadas mecanicamente. Em seguida, o meio foi descartado e o pellet ressuspensionado em 1mL de tampão fosfato salino (TBS) 1X para a contagem de células na câmara de Neubauer. Essas células foram ressuspensionadas em 50µL de PBS e 50µL de Matrigel®, e foram injetadas cerca de 2×10^6 células na região subcutânea do dorso, por animal, para o monitoramento do crescimento do tumor e comparação entre os diferentes tratamentos.

Para o tratamento, após 48 horas da injeção de células tumorais, foi realizada a primeira administração das amostras via gavagem nos animais. A partir de então, as amostras foram administradas três vezes por semana na dose de 0,8mg de FLZ por quilograma do animal por 80 dias, e o peso dos animais e o tamanho dos tumores foram monitorados duas vezes na semana. Os camundongos foram divididos em 6 grupos de 5 animais, conforme abaixo:

- (1) Controle (sem xenotransplante) sem tratamento
- (2) Xenotransplante de células tumorais – A-549 sem tratamento
- (3) Xenotransplante de células tumorais – A-549 tratados com nanoemulsão MAF com FLZ
- (4) Xenotransplante de células tumorais – A-549 tratados com nanoemulsão CMF com FLZ
- (5) Xenotransplante de células tumorais – A-549 tratados com FLZ micronizado
- (6) Xenotransplante de células tumorais – A-549 tratados com nanoemulsão CMF sem FLZ

Os animais do grupo 6 foram submetidos apenas à avaliação do aspecto físico do tumor.

As nanoemulsões foram previamente diluídas com água Mili-Q para facilitar o escoamento pela agulha de gavagem, sendo que, a concentração final de FLZ nas nanoemulsões foi cerca de 0,1 mg FLZ/mL da amostra diluída. A suspensão de FLZ (FLZ micronizado) foi administrada em concentração 10 vezes superior à das nanoemulsões, portanto, 1,0 mg FLZ/mL de suspensão.

Os efeitos observados neste estudo para a análise da resposta antitumoral causada pelas nanoemulsões contendo FLZ, em comparação com a resposta causada pelo flubendazol micronizado, foram a variação do peso do animal e o volume e aspecto físico do tumor.

Os dados foram avaliados usando o software GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA) com nível de confiança de 95 % considerado significativo para as análises. Para o teste de comparação entre os grupos foi utilizada ANOVA.

4. RESULTADOS

4.1 Efeito do tratamento no peso do animal

As Tabelas 1, 2, 3, 4 e 5, assim como, a Figura 1 apresentam a variação do peso dos animais no período de 80 dias.

Tabela 1: Efeito do tratamento no peso dos animais do **Grupo 1** por período de 80 dias (Grupo 1: animais sem xenotransplante e sem tratamento).

Tempo (dias)	Grupo 1 (Peso em gramas)					Média G1	DP G1
	1	2	3	4	5		
4	27,14	22,90	27,49	26,48	25,57	25,92	1,84
11	28,18	23,20	27,69	26,32	26,23	26,32	1,94
13	28,76	23,79	27,40	27,40	26,67	26,80	1,85
17	29,42	24,19	28,13	27,69	26,82	27,25	1,95
20	29,68	24,38	28,75	28,23	27,10	27,63	2,04
24	29,51	24,73	29,40	28,03	26,77	27,69	2,00
27	30,20	25,35	29,35	28,13	26,80	27,97	1,95
31	29,98	25,59	29,15	28,24	27,36	28,06	1,70
34	30,74	25,59	28,88	28,92	27,50	28,33	1,91
38	31,21	26,25	29,60	29,37	27,80	28,85	1,89
41	31,55	26,55	29,11	29,05	27,51	28,75	1,90
45	30,88	26,34	29,48	29,08	27,88	28,73	1,71
48	31,00	26,53	24,07	28,62	27,55	28,42	1,92
52	30,07	26,40	22,65	28,82	27,46	28,19	1,60
55	28,99	26,24	21,86	28,84	27,67	27,93	1,27
59	28,04	26,53	21,47	28,91	27,77	27,81	0,98
62	27,62	27,07	21,52	28,88	27,87	27,86	0,76
66	28,81	26,72	21,33	28,86	28,13	28,13	1,00
69	29,32	26,77	23,05	28,65	28,44	28,29	1,08
73	29,48	26,46	23,76	28,97	28,29	28,30	1,32
76	29,43	26,72	26,03	28,82	27,80	28,19	1,19
80	27,71	26,19	26,90	27,18	27,64	27,18	0,70

Fonte: de autoria própria

Tabela 2: Efeito do tratamento no peso dos animais do **Grupo 2** por período de 80 dias (Grupo 2: animais com xenotransplante e sem tratamento).

Tempo (dias)	Grupo 2 (Peso em gramas)					Média G2	DP G2
	1	2	3	4	5		
4	28,55	26,38	26,72	26,22	25,70	26,71	1,09
11	28,75	27,30	26,72	26,20	26,15	27,02	1,07
13	28,59	26,96	26,40	25,72	26,26	26,79	1,10
17	29,21	27,38	27,00	25,30	26,56	26,56	0,90
20	29,13	27,89	27,09	25,99	27,11	27,33	1,31
24	29,93	27,59	27,65	26,74	26,96	27,77	1,27
27	30,01	27,60	27,64	26,74	27,20	27,84	1,27
31	30,39	27,90	27,84	27,00	27,40	28,11	1,33
34	29,93	27,71	27,68	27,04	27,24	27,92	1,16
38	30,79	28,25	28,55	28,00	26,86	28,49	1,44
41	30,12	28,42	28,51	27,67	25,69	28,08	1,61
45	30,02	28,52	28,65	27,27	24,89	27,87	1,93
48	29,52	28,50	28,62	26,57	24,47	27,54	2,02
52	29,45	28,36	28,70	25,67	25,62	27,56	1,79
55	29,00	27,90	28,87	25,62	24,86	27,25	1,90
59	29,52	27,19	29,25	27,28	24,68	27,58	1,95
62	28,82	26,47	29,27	27,63	23,99	27,24	2,12
66	27,00	26,43	28,80	27,49	23,00	26,54	2,17
69	24,99	27,43	29,12	27,44	22,94	26,38	2,42
73	24,04	27,64	29,42	27,45	22,35	26,18	2,89
76	24,45	28,73	29,19	27,35	21,61	26,27	3,19
80	24,95	27,37	29,20	27,19	20,28	25,80	3,43

Fonte: de autoria própria

Tabela 3: Efeito do tratamento no peso dos animais do **Grupo 3** por período de 80 dias (Grupo 3: animais com xenotransplante e tratados com nanoemulsão MAF com FLZ).

Tempo (dias)	Grupo 3 (Peso em gramas)					Média G3	DP G3
	1	2	3	4	5		
4	21,20	28,87	27,10	23,79	24,30	25,05	2,99
11	21,50	29,43	27,39	24,19	24,80	25,46	3,05
13	21,35	29,20	27,07	24,40	25,02	25,41	2,95
17	21,78	29,81	27,04	24,38	25,29	25,66	3,00
20	22,32	30,49	27,81	25,02	25,56	26,24	3,08
24	23,15	30,20	28,32	25,19	25,43	26,46	2,79
27	23,69	30,74	28,40	25,02	25,99	26,77	2,81

31	23,64	30,64	28,89	25,58	26,12	26,97	2,78
34	23,41	31,26	29,02	25,68	26,43	27,16	3,04
38	23,85	31,13	29,67	25,90	27,27	27,56	2,91
41	24,19	30,88	29,63	25,27	27,23	27,44	2,83
45	24,94	31,07	29,01	25,48	27,26	27,55	2,53
48	25,66	31,30	29,31	26,19	26,98	27,89	2,36
52	25,46	31,40	29,18	26,74	26,12	27,78	2,46
55	25,39	31,19	29,13	26,88	25,29	27,58	2,55
59	25,37	31,18	30,04	26,47	26,48	27,91	2,54
62	24,99	31,53	29,73	26,06	27,21	27,90	2,69
66	24,78	31,93	29,54	26,26	27,85	28,07	2,79
69	25,19	32,31	29,91	26,73	27,55	28,34	2,80
73	25,05	32,12	29,76	25,61	26,87	27,88	2,99
76	25,31	32,25	30,05	25,88	27,57	28,21	2,91
80	23,41	31,62	29,13	24,36	26,95	27,09	3,38

Fonte: de autoria própria

Tabela 4: Efeito do tratamento no peso dos animais do **Grupo 4** por período de 80 dias (Grupo 4: animais com xenotransplante e tratados com nanoemulsão CMF com FLZ).

Tempo (dias)	Grupo 4 (Peso em gramas)					Média G4	DP G4
	1	2	3	4	5		
4	27,55	25,78	25,05	26,40	25,04	25,96	1,05
11	28,07	26,71	25,58	27,44	25,22	26,60	1,21
13	28,52	25,96	26,05	27,65	25,25	26,69	1,35
17	28,68	26,92	26,28	28,22	25,70	27,16	1,26
20	28,57	26,85	26,66	27,74	25,26	27,02	1,24
24	28,62	27,36	26,15	28,85	25,77	27,35	1,40
27	29,00	23,94	25,97	29,40	26,39	26,94	2,27
31	29,30	25,39	25,86	29,46	24,49	26,90	2,32
34	29,46	25,47	25,73	28,91	25,20	26,95	2,05
38	29,89	25,49	26,46	28,62	26,36	27,36	1,82
41	29,56	25,84	26,46	28,53	26,61	27,40	1,57
45	29,67	26,14	26,92	28,91	27,58	27,84	1,44
48	29,89	26,58	26,74	28,78	27,77	27,95	1,40
52	29,27	27,89	26,84	29,24	28,42	28,33	1,02
55	28,16	27,18	26,65	29,02	27,63	27,73	0,91
59	27,06	27,04	26,92	29,48	27,17	27,53	1,09
62	26,61	27,03	27,01	28,63	26,66	27,19	0,83
66	27,97	26,33	25,74	28,43	25,28	26,75	1,38
69	28,87	27,18	24,37	27,55	24,62	26,52	1,95
73	28,20	26,53	22,21	25,37	24,14	25,29	2,28
76	28,90	26,94	22,32	25,17	25,19	25,70	2,44

80	27,90	26,49	23,56	26,07	26,11	26,03	1,57
----	-------	-------	-------	-------	-------	-------	------

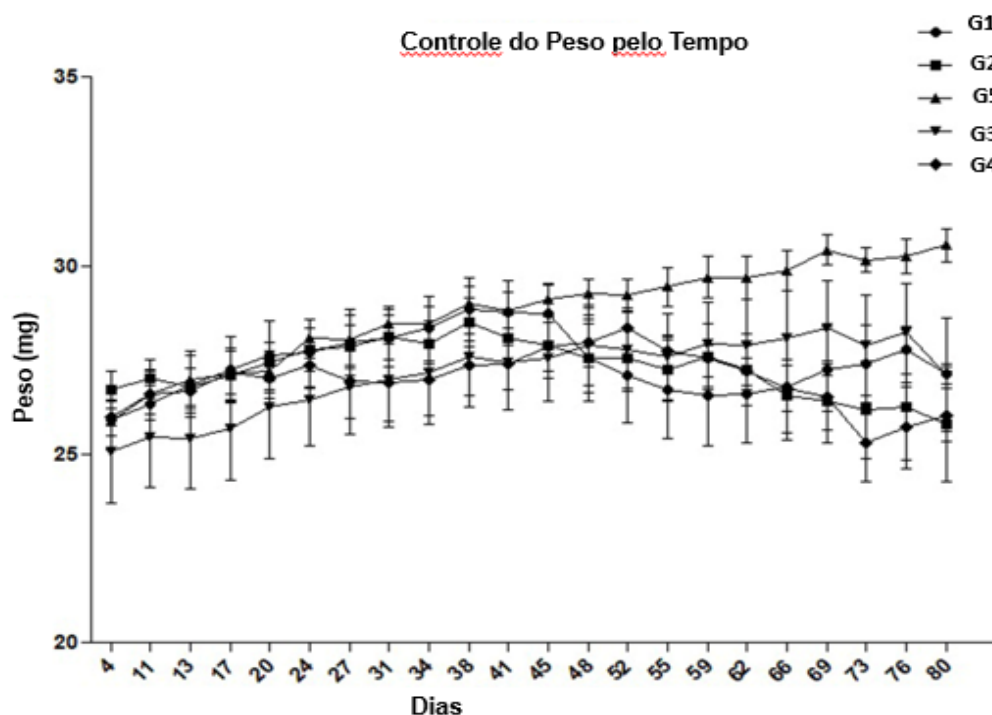
Fonte: de autoria própria

Tabela 5: Efeito do tratamento no peso dos animais do **Grupo 5** por período de 80 dias (Grupo 5: animais com xenotransplante e tratados com flubendazol micronizado).

Grupo 5 (Peso em gramas)							
Tempo (dias)	Animal					Média G5	DP G5
	1	2	3	4	5		
4	24,24	25,58	27,99	24,62	26,98	25,88	1,58
11	24,95	25,97	28,60	25,69	27,68	26,58	1,51
13	25,74	26,09	29,30	25,39	28,33	26,97	1,74
17	26,17	26,32	29,29	25,56	28,26	27,12	1,58
20	26,70	26,69	29,07	25,80	27,66	27,18	1,24
24	27,25	27,44	29,74	27,04	28,83	28,06	1,17
27	27,58	27,69	29,92	25,94	29,00	28,03	1,52
31	28,23	27,89	29,86	27,31	29,00	28,46	0,99
34	28,28	27,88	29,86	27,19	29,08	28,46	1,04
38	28,77	28,62	30,40	27,54	29,57	28,98	1,07
41	28,45	28,58	29,98	27,40	29,67	28,82	1,03
45	28,85	28,81	30,38	27,80	29,64	29,10	0,97
48	29,60	28,88	30,08	27,92	29,74	29,24	0,86
52	28,63	28,88	30,30	28,04	30,17	29,20	0,99
55	28,94	29,00	30,38	28,05	30,80	29,43	1,13
59	29,08	28,79	31,22	28,58	30,81	29,70	1,23
62	29,53	28,83	30,97	28,15	30,93	29,68	1,26
66	29,76	29,33	30,89	28,23	31,17	29,88	1,20
69	30,64	29,90	31,02	29,18	31,36	30,42	0,88
73	30,39	29,79	31,00	29,08	30,48	30,15	0,74
76	30,80	29,77	30,70	28,67	31,28	30,24	1,04
80	30,84	30,01	30,99	29,12	31,73	30,54	1,00

Fonte: de autoria própria

Figura 1: Efeito do tratamento no peso dos animais por período de 80 dias: **G1** = animais sem xenotransplante e sem tratamento; **G2** = animais com xenotransplante e sem tratamento; **G3** = animais com xenotransplante e tratados com nanoemulsão MAF com FLZ; **G4** = animais com xenotransplante e tratados com nanoemulsão CMF com FLZ; **G5** = animais com xenotransplante e tratados com flubendazol micronizado.



Fonte: de autoria própria

A **Figura 1** indica que houve aumento de peso dos camundongos até aproximadamente trigésimo oitavo dia, e posterior redução, sem alterações significativas entre os grupos.

4.2 Efeito do tratamento no tamanho do tumor

As Tabelas 7, 8, 9 e 10, assim como, a Figura 2 apresentam o efeito do tratamento no tamanho do tumor nos diferentes Grupos avaliados por período de 80 dias.

Tabela 7: Efeito do tratamento no tamanho do tumor dos animais do **Grupo 2** por período de 80 dias (Grupo 2: animais com xenotransplante e sem tratamento).

Grupo 2 (Volume do tumor em mm³)							
Tempo (dias)	Animal					Média G2	DP G2
	1	2	3	4	5		
0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	0
11	0	0	0	0	0	0	0
13	36,00	13,50	32,00	30,60	42,90	31,00	10,89
17	40,00	31,50	40,00	31,50	27,00	34,00	5,78
20	40,00	38,00	48,00	80,00	31,50	47,50	19,10
24	62,50	41,40	48,00	88,00	68,00	61,58	18,25
27	75,00	41,40	98,30	92,00	68,00	74,94	22,42
31	55,70	67,50	147,90	189,10	101,30	112,30	55,90
34	81,30	95,80	126,00	245,90	125,00	134,80	65,00
38	98,30	121,00	100,00	271,90	125,00	143,24	72,92
41	100,00	133,80	144,00	283,50	131,30	158,52	71,78
45	126,00	130,00	144,00	411,60	137,50	189,82	124,17
48	121,00	200,90	208,30	457,00	216,00	240,64	126,84
52	153,00	166,30	272,00	453,25	189,10	246,73	124,36
55	162,00	232,80	232,80	445,50	225,00	259,62	108,07
59	153,00	197,25	288,00	407,25	189,06	246,91	102,50
62	211,30	254,80	343,20	496,31	274,63	316,05	111,44
66	245,00	258,10	288,00	343,00	189,06	264,63	56,63
69	200,70	252,60	364,50	292,50	225,00	267,06	64,27
73	245,00	243,70	500,00	292,50	181,50	292,54	122,49
76	232,80	335,80	500,00	292,50	125,00	297,22	138,24
80	232,80	381,50	465,80	292,50	198,00	314,12	109,67

Fonte: de autoria própria

Tabela 8: Efeito do tratamento no tamanho do tumor dos animais do **Grupo 3** por período de 80 dias (Grupo 3: animais com xenotransplante e tratados com nanoemulsão MAF com FLZ).

Grupo 3 (Volume do tumor em mm³)							
Tempo (dias)	Animal					Média G3	DP G3
	1	2	3	4	5		
0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	0
11	0	0	0	0	0	0	0
13	36,00	48,00	48,00	40,00	65,80	47,56	11,44

17	18,00	48,00	48,00	40,00	18,00	34,40	15,32
20	75,00	40,00	56,00	40,00	27,00	47,60	18,45
24	40,00	48,00	56,00	48,00	56,00	49,60	6,69
27	75,00	87,50	64,00	56,00	81,00	72,70	12,73
31	113,40	113,40	70,90	135,00	162,00	118,94	33,47
34	87,50	87,50	225,00	135,00	86,10	124,22	60,05
38	147,90	93,80	93,80	144,00	143,70	124,64	28,20
41	144,00	144,00	121,00	128,60	151,30	137,78	12,51
45	144,00	144,00	112,50	220,50	189,00	162,00	42,57
48	179,60	162,00	180,00	281,30	180,00	196,58	47,99
52	323,40	245,00	180,00	245,00	198,00	238,28	55,58
55	309,38	180,00	136,10	281,75	232,38	227,92	71,20
59	232,38	245,00	143,69	245,00	232,38	219,69	42,95
62	232,38	295,31	189,00	397,38	352,00	293,21	84,96
66	486,00	379,31	166,38	294,00	253,50	315,84	122,15
69	486,00	232,38	189,00	384,00	351,56	328,59	119,50
73	650,00	269,50	198,00	433,50	416,00	393,40	174,28
76	700,00	465,75	143,75	416,00	384,00	421,90	198,81
80	700,00	506,25	181,50	526,50	700,00	522,85	211,88

Fonte: de autoria própria

Tabela 9: Efeito do tratamento no tamanho do tumor dos animais do **Grupo 4** por período de 80 dias (Grupo 4: animais com xenotransplante e tratados com nanoemulsão CMF com FLZ).

Grupo 4 (Volume do tumor em mm³)							
Tempo (dias)	Animal					Média G4	DP G4
	1	2	3	4	5		
0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	0
11	0	0	0	0	0	0	0
13	48,00	40,00	48,00	48,00	65,80	49,96	9,51
17	22,50	22,50	75,00	56,00	18,00	38,80	25,35
20	22,50	64,00	75,00	56,00	52,00	53,90	19,63
24	40,00	48,00	90,80	153,00	27,00	71,76	51,33
27	93,80	75,00	87,50	144,00	18,80	83,82	44,83
31	93,80	87,50	126,00	200,70	60,80	113,76	53,85
34	81,00	117,00	93,80	190,10	48,00	105,98	53,23
38	144,00	108,00	144,00	180,00	56,00	126,40	46,87
41	136,10	147,90	153,00	200,70	64,00	140,34	49,26
45	245,00	183,80	126,00	232,40	100,00	177,44	63,77
48	221,80	256,00	208,30	198,00	101,30	197,08	57,84
52	232,40	364,50	112,50	216,00	91,10	203,30	109,35
55	232,38	253,13	162,00	269,50	200,69	223,54	42,94

59	281,75	525,00	180,00	295,31	180,00	292,41	140,97
62	281,75	578,81	245,00	211,25	180,00	299,36	160,76
66	294,00	550,00	171,00	269,50	198,00	296,50	150,37
69	253,50	550,00	171,00	267,19	166,38	281,61	156,96
73	400,00	695,75	171,00	281,25	232,38	356,08	207,64
76	400,00	633,94	211,25	269,50	180,00	338,94	185,16
80	400,00	786,50	162,00	162,00	368,00	375,70	255,31

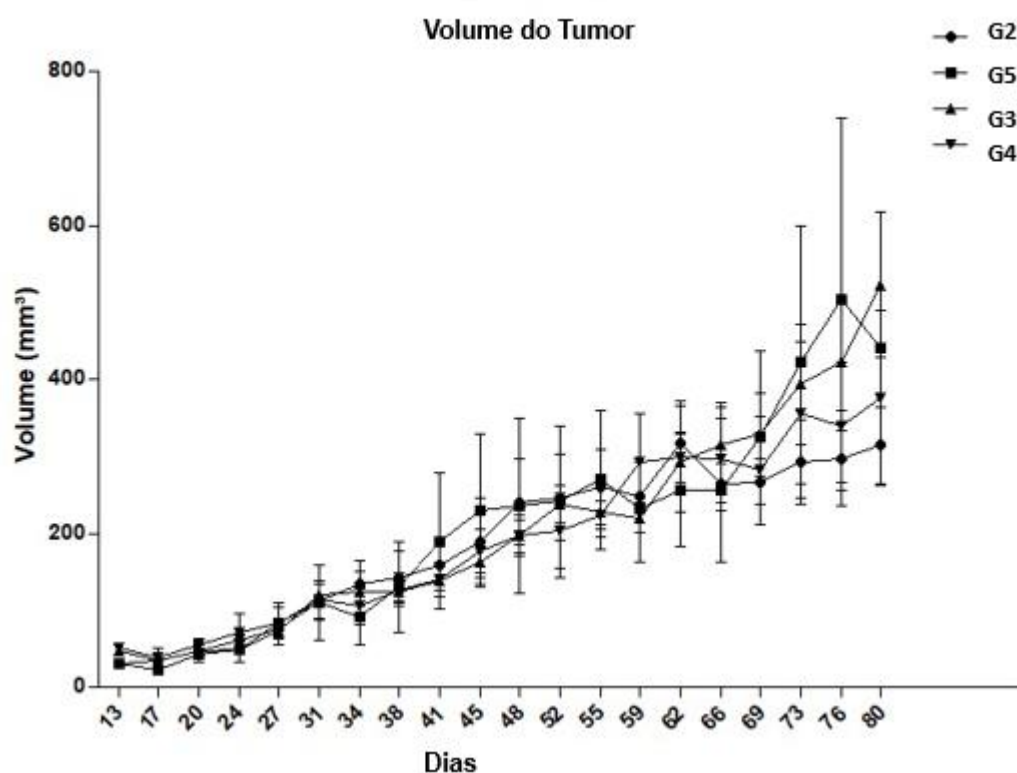
Fonte: de autoria própria

Tabela 10: Efeito do tratamento no tamanho do tumor dos animais do **Grupo 5** por período de 80 dias (Grupo 5: animais com xenotransplante e tratados com flubendazol micronizado).

Grupo 5 (Volume do tumor em mm³)							
Tempo (dias)	Animal					Média G5	DP G5
	1	2	3	4	5		
0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	0
11	0	0	0	0	0	0	0
13	27,60	45,60	32,00	18,00	30,60	30,76	9,93
17	18,00	32,00	18,00	21,40	27,00	23,28	6,11
20	62,50	32,00	36,00	18,00	60,80	41,86	19,27
24	108,00	24,50	36,00	15,80	64,00	49,66	37,33
27	169,00	32,00	62,50	30,60	118,80	82,58	60,09
31	288,00	36,00	108,00	15,80	101,30	109,82	107,37
34	220,50	44,00	62,50	13,50	118,80	91,86	81,50
38	352,00	55,70	83,20	18,00	137,50	129,28	131,90
41	518,90	60,80	137,30	21,40	207,00	189,08	197,71
45	600,00	93,80	210,90	24,50	216,00	229,04	222,62
48	661,50	93,80	147,90	13,50	264,10	236,16	254,62
52	600,00	144,00	196,00	13,50	252,00	241,10	219,20
55	550,00	190,13	210,94	15,75	379,69	269,30	203,06
59	425,25	162,00	225,00	24,50	318,50	231,05	152,34
62	496,38	221,82	256,00	32,00	274,63	256,16	165,43
66	575,00	189,00	179,56	15,75	318,50	255,56	208,40
69	689,06	245,00	211,25	30,38	448,00	324,74	251,90
73	1054,69	211,25	304,00	32,00	512,00	422,79	393,33
76	1372,00	269,50	245,00	22,50	607,50	503,30	528,69
80	1093,75	384,00	269,50	36,00	421,88	441,03	394,69

Fonte: de autoria própria

Figura 2: Efeito do tratamento no tamanho do tumor dos animais por período de 80 dias: **G2** = animais com xenotransplante e sem tratamento; **G3** = animais com xenotransplante e tratados com nanoemulsão MAF com FLZ; **G4** = animais com xenotransplante e tratados com nanoemulsão CMF com FLZ; **G5** = animais com xenotransplante e tratados com flubendazol micronizado;



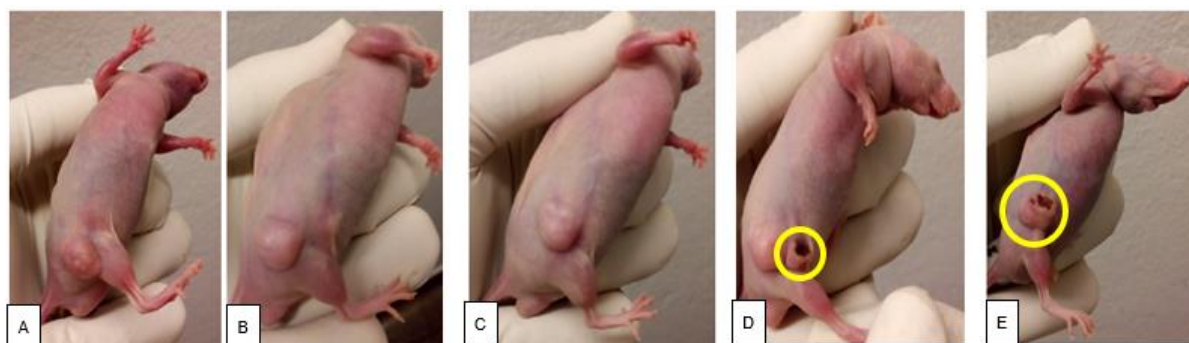
Fonte: de autoria própria

Durante o período foi possível observar desfechos similares entre os grupos. Até o octogésimo dia de tratamento, todos os grupos apresentaram tamanhos similares de tumor.

4.3 Aspectos físicos dos tumores

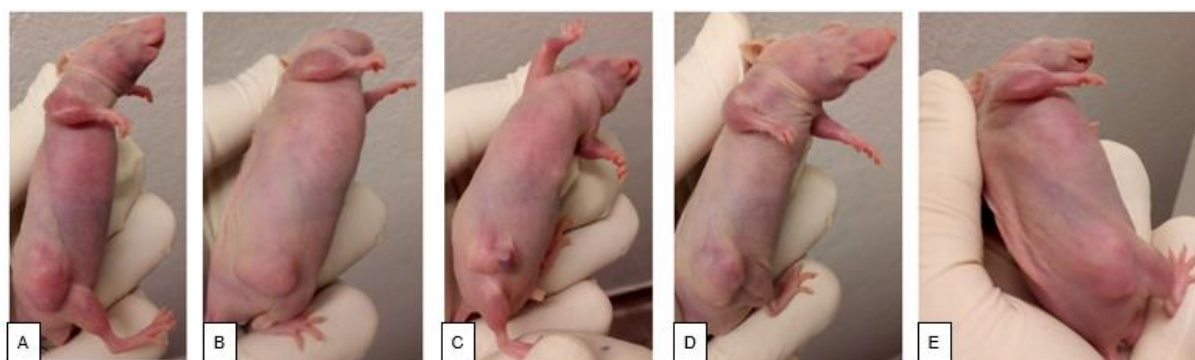
As Figuras 3, 4, 5, 6 e 7 apresentam o aspecto físico dos tumores nos diferentes grupos tratados.

Figura 3: Tumores A-549 em camundongos sem tratamento (**Grupo 2**) após 80 dias. (A) (B) e (C) ausência de ferida (D) e (E) presença de ferida.



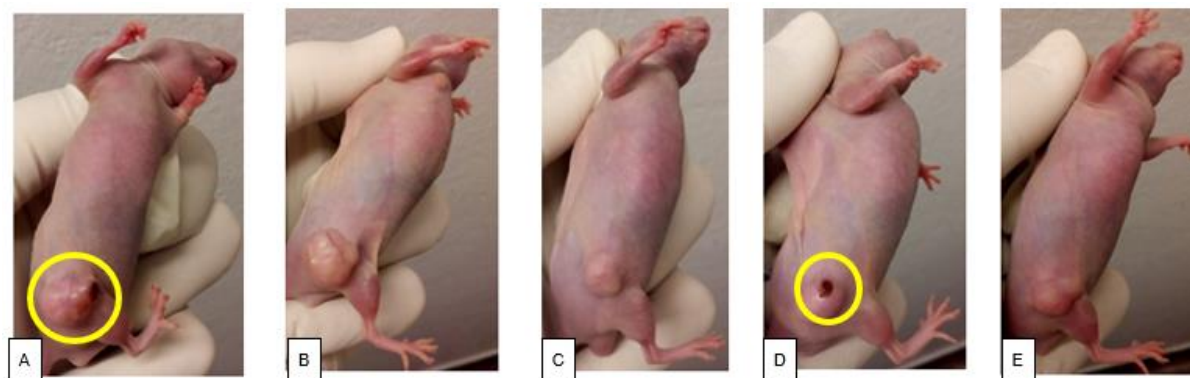
Fonte: de autoria própria

Figura 4: Tumores A-549 em camundongos com xenotransplante e tratados com nanoemulsão MAF com FLZ (**Grupo 3**) depois de 80 dias de tratamento. (A) (B) (C) (D) e (E) ausência de ferida.



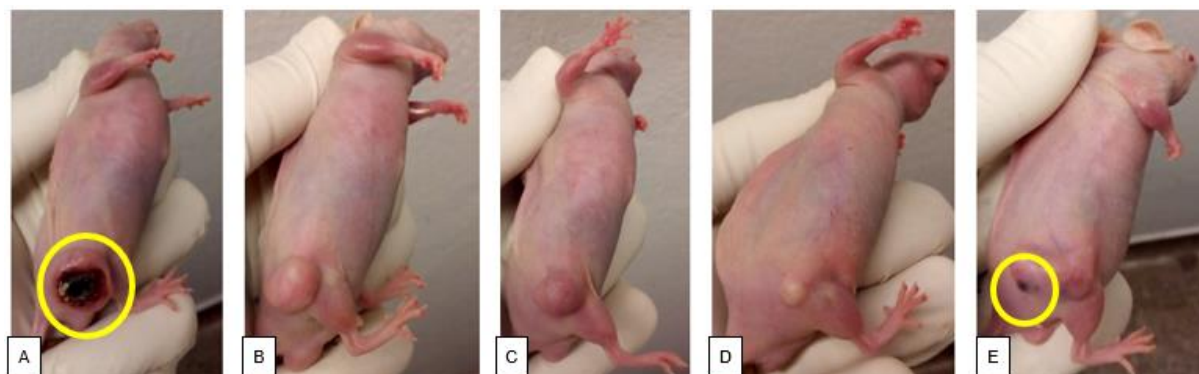
Fonte: de autoria própria

Figura 5: Tumores A-549 em camundongos com xenotransplante e tratados com nanoemulsão CMF com FLZ (**Grupo 4**) depois de 80 dias de tratamento. (A) e (D) presença de feridas (B) (C) e (E) ausência de ferida.



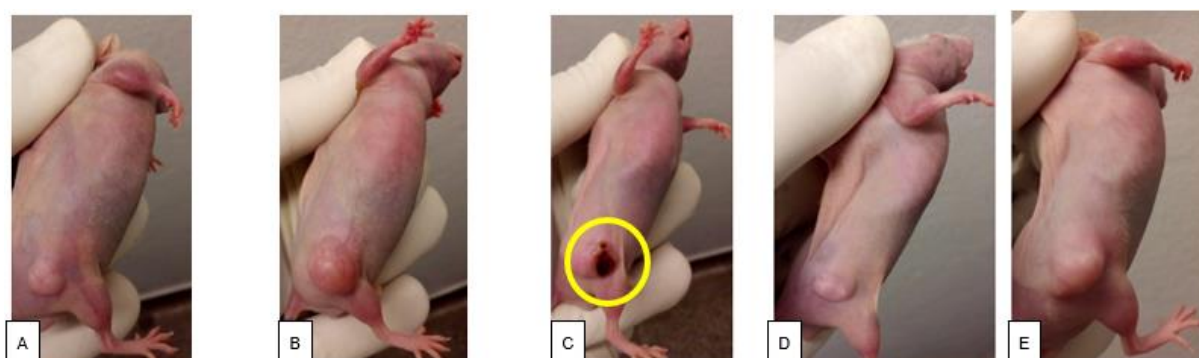
Fonte: de autoria própria

Figura 6: Tumores A-549 em camundongos com xenotransplante e tratados com flubendazol micronizado (**Grupo 5**) depois de 80 dias de tratamento. (A) e (E) presença de feridas (B) (C) e (D) ausência de ferida.



Fonte: de autoria própria

Figura 7: Tumores A-549 em camundongos com xenotransplante e tratados com nanoemulsão CMF sem flubendazol (**Grupo 6**) depois de 80 dias de tratamento. (C) presença de ferida (A) (B) (D) e (E) ausência de ferida.



Fonte: de autoria própria

5. DISCUSSÃO

Após os 80 dias de tratamento, a ausência de alterações significativas no peso do animal e no tamanho do tumor entre os diferentes grupos de camundongos comprovou que as preparações e o fármaco não possuem o efeito anticâncer esperado.

Em um estudo realizado pelo mesmo grupo, empregando nanocristal de flubendazol esse apresentou atividade no período de 80 dias (DE SOUZA GONÇALVES et al., 2022). Para o ensaio, foram utilizados nanocristais de flubendazol na concentração de 14 mg FLZ/kg do animal administrados via intraperitoneal uma vez por semana, diferente das nanoemulsões, de concentração de 0,8 mg FLZ/kg do animal e administradas via gavagem três vezes por semana (2,4 mg FLZ/kg do animal por semana) (DE SOUZA GONÇALVES et al., 2022). Os demais métodos como: linhagem de camundongo utilizada e acondicionamento dos animais permaneceram os mesmos. Portanto, a divergência dos resultados pode ser devido à diferente via de administração empregada, assim como, ao tipo de nanoestrutura utilizada.

Ademais, o resultado obtido no presente trabalho pode ser decorrente de concentração inferior de fármaco necessária para efeito terapêutico. (14 mg FLZ/kg vs 2,4 mg FLZ/kg). Adicionalmente o intervalo entre as doses da preparação pode não ter sido adequado para a prevenção do surgimento do tumor. Assim, são necessários estudos complementares visando o aumento e a frequência da dose. Outra possibilidade seria administrar as nanoemulsões contendo FLZ em associação a outro fármaco buscando possível sinergismo entre esses.

No entanto, apesar do efeito anticâncer não ter sido alcançado, foi possível observar efeito positivo das nanoemulsões contendo FLZ nas feridas neoplásicas malignas (FNMs). Essas são causadas pela morte do tecido com a perda de vascularização após a infiltração das células malignas na pele e nos vasos sanguíneos e linfáticos (SEAMAN et al., 2015).

Em 38 dias, em um dos animais tratados com o FLZ micronizado (**Grupo 5**), houve o surgimento de eritema na região do tumor. Após esse período, demais grupos começaram a apresentar a mesma alteração indicando presença de feridas neoplásicas malignas (FNMs).

Dentre os camundongos sem tratamento (**Grupo 2**), 40% apresentaram FNMs com fissuras expostas e exsudação que acometeram aproximadamente metade da área total do tumor (**Figura 3**). Camundongos com xenotransplante e tratados com nanoemulsão MAF com flubendazol (**Grupo 3**) não apresentaram FNMs em todos os 80 dias de tratamento (**Figura 4**). Já, camundongos com xenotransplante e tratados com nanoemulsão CMF com flubendazol (**Grupo 4**) apresentaram FNMs em 40% dos

casos. Contudo, todas as feridas surgiram em menos da metade da área do tumor e apareceram apenas após 52 dias de tratamento. Em contrapartida, os demais grupos apresentaram FNMs nos primeiros 38 dias (**Figura 5**). Animais com xenotransplante tratados com flubendazol micronizado (**Grupo 5**) também apresentaram tumores com FNM, fissuras expostas e exsudação em 40% dos casos. Porém, em um dos camundongos, o acometimento do tumor pela ferida foi de quase 100% (**Figura 6**). Por fim, camundongos com xenotransplante e tratados com nanoemulsão CMF sem flubendazol (**Grupo 6**) apresentaram tumores com FMNs, fissuras expostas e exsudação em 20% dos casos. A ferida acometeu aproximadamente metade da área do tumor (**Figura 7**).

Isso demonstra não só redução da frequência e da gravidade do tamanho das feridas como também atraso significativo na emergência de FNMs quando tratados com nanoemulsões contendo flubendazol.

Duas teorias foram levantadas para explicar esse efeito anti FNM causado pela administração de nanoemulsões contendo FLZ.

A primeira consiste na natureza do óleo Maisine CC[®] utilizado na preparação de ambas as emulsões. Este óleo é derivado do ácido linoleico que é fundamental para a eficiência do processo inflamatório. A partir dele, é possível produzir o ácido araquidônico, que é um gerador de prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos, que são mediadores inflamatórios. Assim, esses componentes podem reduzir o tempo de cicatrização de feridas pelo aumento da migração celular, da vascularização e da diferenciação fibroblástica (BARDAA, BEN HALIMA, et al., 2016).

A segunda teoria está no papel do FLZ como regulador do eixo STAT3 e do eixo NF- κ B. A STAT3 é uma proteína que pode tanto estimular o processo inflamatório (regulada positivamente), quanto o processo anti-inflamatório (regulada negativamente) (HAN et al., 2017). Uma breve ativação da STAT3 pode ser crucial para eficiência de cicatrização, contudo, sua ativação a longo prazo é frequentemente observada em pacientes com tumores epiteliais (HUYNH et al., 2019). Estudo comprova que o FLZ pode inibir a atividade STAT3 (LIN et al., 2019). Por sua vez, o NF- κ B é fundamental na progressão das doenças oncológicas. Pacientes com câncer de pulmão com elevados níveis de NF- κ B têm um desenvolvimento pior da doença do que pacientes com níveis reduzidos deste fator de transcrição (JIN et al., 2008; KARIN

and GRETEN, 2005). A supressão do NF- κ B auxilia na interdição da replicação e da sobrevivência das células do tumor (WANG et al., 2007, 2006). Tao e colaboradores (2019) revelou que o flubendazol tem a capacidade de suprimir a sinalização de NF- κ B em células de tumores malignos de esôfago (Tao et al., 2019).

Apesar do resultado positivo da modulação do FLZ solubilizado e encapsulado em nanoemulsão contendo Maisine CC[®] nas FNMs, testes adicionais são necessários para o melhor entendimento do mecanismo do FLZ na cicatrização dessas feridas. Contudo, a preparação é potencial candidato a terapia adjuvante para o tratamento de pacientes com câncer de pulmão.

6. CONCLUSÃO

Não foi observada a eficácia terapêutica das nanoemulsões contendo flubendazol contra o desenvolvimento de tumores A-549 de câncer de pulmão. Porém, efeito interessante dessas preparações foi observado durante os testes. Esse efeito refere-se à modulação positiva do FLZ no processo de prevenção ou cicatrização de feridas neoplásicas maligna quando solubilizado em derivados de ácido linoleico e carregado em uma nanoemulsão. Dessa forma, o presente trabalho apresenta nanoemulsão de FLZ como um potencial candidato a medicamento adjuvante no tratamento de pacientes com câncer de pulmão.

7. REFERÊNCIAS

MORGAN, S. et al. The cost of drug development: A systematic review. **Health Policy**, v. 100, n. 1, p. 4–17, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.healthpol.2010.12.002>>.

DIMASI, J. A.; GRABOWSKI, H. G.; HANSEN, R. W. Innovation in the pharmaceutical industry: New estimates of R&D costs. **Journal of Health Economics**, v. 47, p. 20–33, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jhealeco.2016.01.012>>.

ARROWSMITH, J.; MILLER, P. Trial Watch: Phase II and Phase III attrition rates 2011-

2012. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 12, n. 8, p. 569, 2013.

SHIM, J. S.; LIU, J. O. Recent advances in drug repositioning for the discovery of new anticancer drugs. **International Journal of Biological Sciences**, v. 10, n. 7, p. 654–663, 2014.

LOTFI SHAHREZA, M. et al. A review of network-based approaches to drug repositioning. **Briefings in bioinformatics**, v. 19, n. 5, p. 878–892, 2017.

NOSENGO N. Can you teach old drugs new tricks? **Nature** 534:314–316, 2016. <https://doi.org/10.1038/534314a>

ASHBURN TT, THOR KB. Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. **Nat. Rev. Drug Discov.** 3:673-683, 2004. <https://doi.org/10.1038/nrd1468>

JIN, G.; WONG, S. T. C. Toward better drug repositioning: Prioritizing and integrating existing methods into efficient pipelines. **Drug Discovery Today**, v. 19, n. 5, p. 637–644, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.drudis.2013.11.005>>.

CHA Y, EREZ T, REYNOLDS IJ, KUMAR D, ROSS J, KOYTIGER G, KUSKO R, ZESKIND B, RISSO S, KAGAN E, PAPAPETROPOULOS S, GROSSMAN I, LAIFENFELD D. Drug repurposing from the perspective of pharmaceutical companies. **Br. J. Pharmacol.** 175:168–180, 2018. <https://doi.org/10.1111/bph.13798>

PUSHPAKOM S, IORIO F, EYERS PA, ESCOTT KJ, HOPPER S, WELLS A, DOIG A, GUILLIAMS T, LATIMER J, MCNAMEE C, NORRIS A, SANSEAU P, CAVALLA D, PIRMOHAMED M. Drug repurposing: progress, challenges and recommendations. **Nat. Rev. Drug Discov.** 18(1):41-58, 2019. <https://doi.org/10.1038/nrd.2018.168>

CORTÉS-FUNES, H. **New treatment approaches for lung cancer and impact on survival.** *Semin Oncol* 2002;29(suppl 8):26-29.

O'NEILL, M. et al. Invitro flubendazole-induced damage to vital tissues in adult females of the filarial nematode *Brugia malayi*. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 5, n. 3, p. 135–140, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpddr.2015.06.002>>.

KRÁLOVÁ, V. et al. Antiproliferative effect of benzimidazole anthelmintics albendazole, ricobendazole, and flubendazole in intestinal cancer cell lines. **Anti-Cancer Drugs**, v.

24, n. 9, p. 911–919, 2013.

HOU, Z.-J. et al. Flubendazole, FDA-approved anthelmintic, targets breast cancer stem-like cells. **Oncotarget**, v. 6, n. 8, 2015.

DONG, T., LU, Z., LI, J., LIU, Y. & WEN, J. Flubendazole inhibits the proliferation of A549 and H460 cells and promotes autophagy. **Chinese Journal of Lung Cancer** **23**, 306–313 (2020)

AMIDOM, G.L.; LENNERNÄS, H.; SHAH, V. P.; CRISON, J.R. A Theoretical Basis for a Biopharmaceutic Drug Classification: The Correlation of in Vitro Drug Product Dissolution and in Vivo Bioavailability. **Pharmaceutical Research**, v.12, n. 3, p.413-420, 1995.

NOBILIS, M. et. Al. Achiral and chiral high-performance liquid chromatographic determination of flubendazole and its metabolites in biometrics using UV photodiode-array and mass spectrometric detection. **Journal of Chromatography A**, vol. 1149, p.112-120, 2007.

VIALPANDO, M. et al. Evaluation of Three Amorphous Drug Delivery Technologies to Improve the Oral Absorption of Flubendazole. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 105, n. 9, p.2782-2793, sept.2016.

PEREIRA, E. R. et al. The lymph node microenvironment and its role in the progression of metastatic cancer. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 38, p. 98–105, 2015.

RYAN, G. M.; KAMINSKAS, L. M.; PORTER, C. J. H. Nano-chemotherapeutics: Maximising lymphatic drug exposure to improve the treatment of lymph-metastatic cancers. **Journal of Controlled Release**, v. 193, p. 241–256, 2014.

DONG, T., LU, Z., LI, J., LIU, Y. & WEN, J. Flubendazole inhibits the proliferation of A549 and H460 cells and promotes autophagy. **Chinese Journal of Lung Cancer** **23**, 306–313 (2020)

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Guidance for Industry Considering Whether an FDA-Regulated Product Involves the Application of Nanotechnology**. Office of the Commissioner, jun. 2014.

SEAMAN S, BATES-JENSEN M. Skin disorders. Malignant wounds, fistulas, and stomas. In: Ferrell BR, Coyle N, Paice JÁ, editors. **Oxford Textbook of Palliative Nursing**. 4a Ed. New York: Oxford University Press; 2015. p:325-40.

DE SOUZA GONÇALVES, D. et al. Revisiting Flubendazole Through Nanocrystal Technology: Statistical Design, Characterization and Its Potential Inhibitory Effect on Xenografted Lung Tumor Progression in Mice. **Journal of Cluster Science**, 14 jan. 2022.

S. BARDAA, N. BEN HALIMA, F. ALOUI, R. BEN MANSOUR, H. JABEUR, M. BOUAZIZ, Z. SAHNOUN, Oil from pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) seeds: Evaluation of its functional properties on wound healing in rats, **Lipids in Health and Disease**. 15 (2016). <https://doi.org/10.1186/s12944-016-0237-0>.

H.M. HAN, S. KO, M.-J. CHEONG, J.K. BANG, C.H. SEO, T. LUCHIAN, Y. PARK, Myxinidin2 and myxinidin3 suppress inflammatory responses through STAT3 and MAPKs to promote wound healing, **Oncotarget**, 8 (2017) 87582–87597. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.20908>.

J. HUYNH, A. CHAND, D. GOUGH, M. ERNST, Therapeutically exploiting STAT3 activity in cancer — using tissue repair as a road map, **Nature Reviews Cancer**. 19 (2019) 82–96. <https://doi.org/10.1038/s41568-018-0090-8>.

S. LIN, L. YANG, Y. YAO, L. XU, Y. XIANG, H. ZHAO, L. WANG, Z. ZUO, X. HUANG, C. ZHAO, Flubendazole demonstrates valid antitumor effects by inhibiting STAT3 and activating autophagy, **Journal of Experimental and Clinical Cancer Research**. 38 (2019). <https://doi.org/10.1186/s13046-019-1303-z>.

M. KARIN, F.R. GRETEN, NF- κ B: Linking inflammation and immunity to cancer development and progression, **Nature Reviews Immunology**. 5 (2005) 749–759. <https://doi.org/10.1038/nri1703>.

X. JIN, Z. WANG, L. QIU, D. ZHANG, Z. GUO, Z. GAO, C. DENG, F. WANG, S. WANG, C. GUO, Potential biomarkers involving IKK/RelA signal in early stage non-small cell lung cancer, **Cancer Science**. 99 (2008) 582–589. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2007.00713.x>.

X. WANG, W. CHEN, Y. LIN, Sensitization of TNF-induced cytotoxicity in lung cancer cells by concurrent suppression of the NF- κ B and Akt pathways, **Biochemical and**

Biophysical Research Communications. 355 (2007) 807–812.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.02.030>.

X. WANG, W. JU, J. RENOUARD, J. ADEN, S.A. BELINSKY, Y. LIN, 17-Allylamino-17-demethoxygeldanamycin synergistically potentiates tumor necrosis factor-induced lung cancer cell death by blocking the nuclear factor- κ B pathway, **Cancer Research**. 66 (2006) 1089–1095. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-2698>.

J. TAO, H. ZHAO, X. XIE, M. LUO, Z. GAO, H. SUN, Z. HUANG, The anthelmintic drug flubendazole induces cell apoptosis and inhibits NF- κ B signaling in esophageal squamous cell carcinoma, **OncoTargets and Therapy**. 12 (2019) 471–478.
<https://doi.org/10.2147/OTT.S193206>

8. ANEXOS

8.1 Aprovação CEUA



DECLARAÇÃO

Declaro que o Projeto “Estudo do reposicionamento do flubendazol para o tratamento de câncer de pulmão empregando nanossistema lipídico oral”, certificado sob o número 164/2020, desenvolvido sob responsabilidade da Profa. Dra. Claudiana Lameu, em colaboração com os alunos: **Megumi Nishitani Yukuyama, Eduardo José Barbosa, Nádia Araci Bou Chacra, Beatriz Rabelo Folchini, Aline de Souza, Lara Mendes Ferreira Guimarães, Camilla Midori Peroni e Caio Vinicius Teles Rossini**, foi aprovado pela Comissão de Ética em Uso de Animais (CEUA), do IQ-USP, em 18/02/2020.

O período aprovado por esta Comissão para execução deste projeto foi de 18/02/2020 até 03/12/2022, sendo que o número de animais aprovados para o respectivo protocolo foram: 180 camundongos isogênicos machos - linhagem BALB/C nude

São Paulo, 18 de fevereiro de 2021

Prof. Dra. Daniela S. Bassères
 Coordenadora CEUA



10/05/2022

Beatriz Rabelo Folchini

Assinatura do aluno(a)



16/05/2022

Profª. Drª. Nádia Araci Bou-Chacra

Assinatura do orientador(a)