



# ESTUDO PRÉ-CLÍNICO UTILIZANDO MOLÉCULA ISOLADA DE VENENO DE ARANHA PARA TRATAMENTO DO CÂNCER DE MAMA

**Palavras-Chave:** NEOPLASIAS MAMÁRIAS, LW-3, MODELO MURINO.

**Autores(as):**

**CIBELE PEREIRA MARIANO, FCF – UNICAMP**

**INGRID MAYARA CAVALCANTE TREVISAM, FCF – UNICAMP**

**SABRINA CARVALHO BRUNELLI, FCF – UNICAMP**

**VALQUIRIA MATHEUS, FCF – UNICAMP**

**NATALIA BARRETO, IB - UNICAMP**

**AMANDA PIRES BONFANTI, IB – UNICAMP**

**GABRIEL CORDEIRO, IB – UNICAMP**

**Prof<sup>(a)</sup>. Dr<sup>(a)</sup>. CATARINA RAPOSO DIAS CARNEIRO (orientadora), FCF - UNICAMP**

---

## INTRODUÇÃO:

De acordo com um estudo publicado pela revista *The Lancet*, o câncer é a principal causa de morte em países desenvolvidos (DAGENAIS et al., 2020). O câncer de mama se tornou um grande problema de saúde pública, sendo a neoplasia mais incidente em mulheres em todo o mundo. Para o Brasil, a estimativa de incidência de casos de câncer de mama para o ano de 2019 foi de 59.700 novos casos, representando 29,5% dos cânceres em mulheres segundo o Instituto Nacional de Câncer José de Alencar Gomes da Silva (INCA, 2019). Apesar dos tratamentos existentes, a estimativa de sobrevivência no Brasil nos anos de 2010 a 2014 foi de 75,2% (ALLEMANI et al., 2018) e, somente em 2016, 16.069 mulheres morreram por essa malignidade no país (INCA, 2019), o que ressalta a importância do fortalecimento de políticas de saúde pública e do descobrimento de novas terapias que auxiliem no tratamento dessa doença.

O veneno da aranha *Phoneutria nigriventer* (PnV) é uma mistura de compostos bioativos com potencial farmacológico (RAPÔSO et al., 2007). Foram demonstradas pelo nosso grupo de pesquisa suas atividades antitumorais *in vitro* e *in vivo*, por meio de mecanismos que envolvem a interferência no ciclo celular, na proliferação, migração e morte de células tumorais, ao passo que não diminuiu a viabilidade de células não-tumorais (BARRETO et al., 2020; BONFANTI et al., 2020; SANTOS et al., 2019; MUNHOZ et al., 2021; CABALLERO et al., 2022). Uma investigação da ação antitumoral das frações e subfrações purificadas do veneno em células de glioblastoma identificou a subfração com

maior atividade; os resultados apontaram o componente denominado LW-3 como potencial protótipo para o desenvolvimento de novas drogas para o tratamento de glioblastomas (CABALLERO et al., 2022). A partir desses dados, foi realizado um estudo translacional veterinário de tumores caninos coletados na cidade de Campinas, com o objetivo de testar a eficácia antineoplásica da LW-3 e correlacionar a resposta tumoral ao perfil molecular. No estudo, linhagens celulares foram estabelecidas a partir dos tumores dos cães e tratadas *in vitro* com o composto isolado do veneno. Os resultados demonstraram que houve uma redução da viabilidade das linhagens de carcinoma mamário canino, linfoma e mastocitoma (enquanto melanomas não responderam) expostas ao tratamento testado (TREVISAN et al., em preparação). Uma análise recente do grupo de pesquisa demonstrou que a LW-3 se trata de uma molécula da classe das poliaminas (732,08 Da) e sua estrutura está sendo caracterizada.

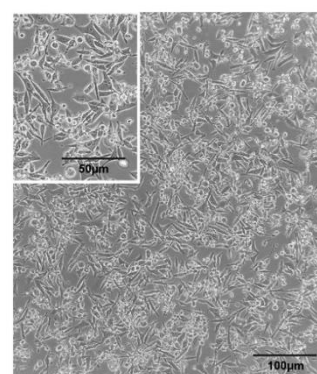
Esses resultados motivaram a continuação do estudo, visando o desenvolvimento de um novo potencial quimioterápico. Nesse contexto, o objetivo do presente trabalho é realizar uma análise pré-clínica, avaliando a eficácia (progressão tumoral, bem estar geral do animal, sobrevida) e segurança/toxicidade da molécula administrada sistemicamente. Foi utilizado modelo murino singênico de neoplasia de mama, desenvolvido em camundongos C57BL/6. Dessa forma, o presente projeto ajudará a esclarecer aspectos fundamentais da ação da molécula, a qual poderá, futuramente, beneficiar os pacientes e o sistema de saúde.

## METODOLOGIA:

Os ensaios em modelo singênico foram realizados em fêmeas adultas (8 semanas de idade), C57BL/6 (C-Black), obtidas no Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área de Ciências em Animais de Laboratório (CEMIB – UNICAMP) e mantidos em colônia estabelecida no Biotério de Animais da Área de Imunologia, Departamento de Biologia Estrutural e Funcional, Instituto de Biologia/UNICAMP. Os animais permaneceram em gaiolas do tipo microisolador, com água e alimento fornecidos *ad libitum* e ciclo de claro/escuro de 12/12 horas. O protocolo experimental seguiu os 5 princípios do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e o protocolo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UNICAMP; 6175/2023).

Foram realizadas a expansão e manutenção das células tumorais da linhagem de adenocarcinoma mamário murino (EO771) (Fig.1). As células foram cultivadas em meio de cultura Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) contendo 10% de soro fetal bovino, 50 mg/mL, Penicilina e Estreptomicina (Gibco Inc., Billings, MT, USA), em estufa a 37 °C contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Após o cultivo, foram feitas alíquotas de 1,5 x 10<sup>5</sup> células em 100 µL de PBS estéril para serem inoculadas na 4ª glândula mamária dos animais, por via epidermal.

Os animais foram monitorados em relação à progressão do tumor em resposta ao tratamento durante 30 dias. Os tumores primários foram medidos utilizando um paquímetro. O tratamento descrito abaixo foi iniciado no dia 0 ou após o aparecimento da massa tumoral palpável ou visível (em torno de



**Figura 1.** Linhagem EO771 – Adenocarcinoma mamário

15 a 20 dias após a inoculação do tumor, protocolo com maior similaridade clínica com o momento em que ocorre o diagnóstico do câncer de mama e início do tratamento), com administração a cada 48 horas e duração de 15 dias (totalizando ~30 de experimento). Todos os grupos descritos abaixo receberam inoculação das células tumorais (Tab.1).

**Tabela 1.** Grupos de tratamento (n = 3 por grupo)

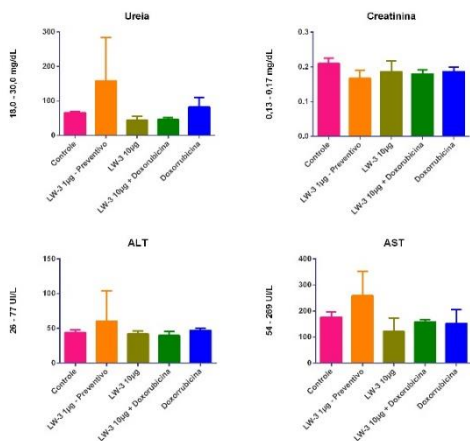
<b>Grupos experimentais</b>				
<b>Controle</b>	<b>LW-3 1 µg/kg - Preventivo</b>	<b>LW-3 10 µg/kg</b>	<b>LW-3 10 µg/kg + Doxorrubicina 5 mg/kg</b>	<b>Doxorrubicina 5 mg/kg</b>
<b>Injeção sistêmica de PBS 1 M em 100 µL, a cada 48 h, durante 15 dias.</b>	Tratadas a partir do dia 0 (dia da inoculação das células tumorais), com injeções via (i,p) em 100 µL, a cada 48 h, durante 15 dias.	Tratadas a partir do aparecimento do tumor (por volta do 15º dia), com injeções via (i,p) em 100 µL, a cada 48 h, durante 15 dias.	Tratadas a partir do aparecimento do tumor (por volta do 15º dia), com injeções via (i,p) em 50µL, a cada 48hs, durante 15 dias. E uma única dose de Doxorrubicina (no 1º dia de tratamento com a LW-3) em 50µL.	Tratadas no dia do aparecimento do tumor (por volta do 15º dia), com dose única via (i,p) em 100 µL.

Os animais foram acompanhados a cada 48 h durante 30 dias, período em que foram feitos os tratamentos e os seguintes parâmetros clínicos foram observados: sinais de dor (pelo eriçado, postura arqueada, olhos fechados), alterações no peso, consumo de alimento, progressão do tumor. O crescimento do tumor foi avaliado utilizando um paquímetro e a pesagem dos animais e da ração foi realizada para todos os grupos no mesmo horário.

O nível de significância entre tratamentos e controles foi analisado usando o teste de variância de uma via (ANOVA de uma via) ou de duas vias (ANOVA de duas vias), seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunnet. As análises foram realizadas utilizando GraphPad 8.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). Teste t de student foi utilizado para comparar cada grupo com o controle. Foram considerados os seguintes níveis de significância:  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*) e  $p < 0,001$  (\*\*\*)

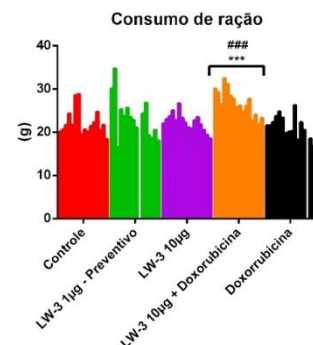
## **RESULTADOS E DISCUSSÃO:**

Após 30 dias, foi realizada a eutanásia dos animais utilizando sobredose de anestésico (cetamina 300 mg/kg e xilazina 30 mg/kg) e imediatamente foi realizada a coleta do material biológico (sangue e órgãos) para as análises laboratoriais: hemograma, função renal (ureia e creatinina), função hepática (aspartato aminotransferase - AST e alanina aminotransferase - ALT). O rim, fígado, baço e a mama foram dissecados, pesados, medidos e processados para inclusão em parafina e análise histopatológica. As análises laboratoriais (Fig. 2) demonstraram uma tendência a uremia em todos os grupos (inclusive controle, em relação a parâmetros estabelecidos na literatura), sendo mais evidente no grupo LW-3 1 µg – preventivo, não foi observada hepatopatia (ALT e AST) exceto um leve aumento de ambas as enzimas (não significativo estatisticamente), pelo grupo LW-3 1 µg – preventivo. Esses resultados demonstram que a poliamina não possui efeitos tóxicos relevantes nos protocolos utilizados. Não foram observadas alterações no exame hematológico (dados não apresentados).



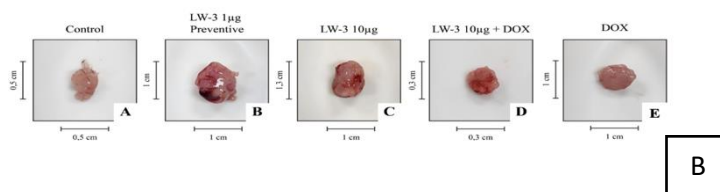
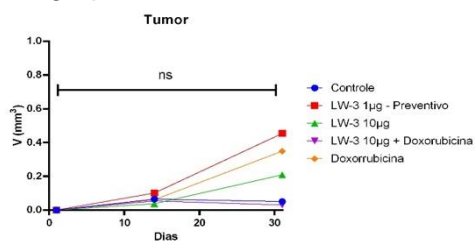
**Figura 2.** Resultado das análises laboratoriais. Sem diferença significativa pelo teste One-way ANOVA seguido pelo post test de Dunnett's de comparações múltiplas.

Nenhum óbito foi observado até o final do tratamento, os animais não apresentaram perda de peso e o consumo de ração foi maior no grupo tratado com LW-3 10 µg associado a doxorubicina (Fig. 3); além disso, os animais que fizeram o tratamento neoadjuvante (ou seja, doxorubicina associada à LW-3) apresentaram melhor bem estar clínico (maior exploração, maior consumo de ração) comparado ao grupo tratado



**Figura 3.** Consumo de ração nos grupos tratados. One-way ANOVA seguido pelo post test de Dunnett's de comparações múltiplas. \*em comparação ao controle: \*\*\*P<0,001.

somente com a doxorubicina. O tumor apresentou dimensões menores no grupo tratado com LW-3 10 µg e doxorubicina comparado ao grupo controle. Os outros grupos tiveram um aumento do tamanho do tumor (Fig.4).



**Figura 4.** Progressão da massa tumoral nos grupos tratados. A) Sem diferença significativa pelo teste One-way ANOVA seguido pelo post test de Dunnett's de comparações múltiplas. B) Medidas do volume tumoral entre os grupos tratados.

Diversas toxinas animais apresentam efeito antineoplásico. Estudos executados pelo nosso grupo de pesquisa evidenciaram que o veneno da *Phoneutria nibriventer* (PnV) exibiu atividade antitumoral (Barreto & Bonfanti, 2019; Barreto *et al.*, 2020). Esses resultados nos levaram a investigar esse efeito anticâncer em modelo *in vivo*. No presente estudo, os resultados demonstraram que a poliamina LW-3 10 µg associada a doxorubicina (tratamento ouro) reduziu as dimensões do tumor comparado aos outros grupos de tratamento. Além disso esse mesmo grupo não apresentou efeito tóxico relacionados aos parâmetros estudados (fígado, rins e estado clínico geral). Os animais desse grupo apresentaram melhor bem estar geral e aumento no consumo da ração em comparação aos demais grupos. Diversos artigos demonstram que as sub-frações do (PnV) possuem também propriedades analgésicas, o que poderia justificar o bem estar dos animais (Rosa, F et al, 2014; Ferreira, L.A et al 2021; Pedron, C et al 2021). Curiosamente, o grupo tratado com a LW-3 preventiva teve um aumento expressivo no tamanho do tumor, indicando que essa poliamina não possui efeito antineoplásico sozinha mais sim combinada a outro tratamento. Atualmente, o tratamento do câncer de mama inclui abordagens terapêuticas associadas, tais como: terapia hormonal, quimioterapia, cirurgia e radioterapia, que são realizadas de forma individualizada. A doxorubicina é um dos quimioterápicos de eleição mais utilizados para o tratamento do câncer de mama, e geralmente é associada a outras modalidades terapêuticas (Akram, M et al, 2017).

O presente estudo demonstra o tratamento com a poliamina LW-3 10 µg associada à doxorubicina teve um efeito antineoplásico maior comparado ao grupo tratado com a doxorubicina

isolada, o que corrobora a literatura (Cabeza, L et al, 2015; Ewens,A et al, 2006). Não foram observados efeitos tóxicos significativos nos grupos tratados, exceto uma leve toxicidade na administração preventiva da LW-3, que será mais investigada. Apesar dos nossos dados serem preliminares, tal achado sugere que a poliamina tem grande potência neoadjuvante ao tratamento do câncer de mama.

## CONCLUSÃO:

Os resultados indicam que a poliamina LW-3 10 µg associada à doxorrubicina apresentou efeito antineoplásico relevante e melhorou as condições clínicas dos animais em comparação ao tratamento apenas com doxorrubicina. Considerando a limitação dos tratamentos antitumorais e a alta toxicidade dos quimioterápicos clássicos, esses dados indicam que a LW-3 tem potencial para ser utilizada como molécula neoadjuvante no tratamento do câncer de mama. Os experimentos serão repetidos para análise da reprodutibilidade e aumento do n experimental.

## BIBLIOGRAFIA:

- AKRAM, M. et al. **Awareness and current knowledge of breast cancer**. doi: 10.1186/s40659-017-0140-9. *Biol Res*. 50: 33. 2 October, 2017.
- ALLEMANI, C. et al. **Global surveillance of trends in cancer survival 2000–14 (CONCORD-3): analysis of individual records for 37 513 025 patients diagnosed with one of 18 cancers from 322 population-based registries in 71 countries**. *Lancet*, v. 391, n. 10125, p 1023-1075, 2018.
- BARRETO, N. et al. **Spider venom components decrease glioblastoma cell migration and invasion through RhoA-ROCK and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase beta 2: potential molecular entities to treat invasive brain cancer**. *Cancer Cell International*, v. 20, n. 1, DEC 17 2020. (15/04194-0, 15/06134-4, 17/05402-0, 17/16196-2, 17/24331-7, 19/10003-3, 18/23559-7). 2020.
- BONFANTI, A.P. et al. **Spider venom administration impairs glioblastoma growth and modulates immune response in a non-clinical model**. *Sci Rep*. 2020;10(1):5876. Published 2020 Apr 3. doi:10.1038/s41598-020-62620-9, 2020.
- CABALLERO, M. et al. **Isolated Components From Spider Venom Targeting Human Glioblastoma Cells and Its Potential Combined Therapy With Rapamycin**. *Frontiers in molecular Biosciences*. 14 march 2022 <https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.752668>, 2022.
- CABEZA, L. et al. **Enhanced antitumor activity of doxorubicin in breast cancer through the use of poly(butylcyanoacrylate) nanoparticles**. Doi: 10.2147/IJN.S74378. *Int J Nanomedicine*. 10: 1291–1306, 2015.
- DAGENAIS, G. R. et al. **Variations in common diseases, hospital admissions, and deaths in middle-aged adults in 21 countries from five continents (PURE): a prospective cohort study**. *THE LANCET*. VOLUME 395, ISSUE 10226, P785-794, MARCH 07, 2020.
- EWENS, A. et al. **Doxorubicin plus Interleukin-2 Chemoimmunotherapy against Breast Cancer in Mice**. *Immunology Cancer Res* 66 (10): 5419–5426. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-3963>, 2006.
- FERREIRA, L.A. et al. **Antinociceptive synergism upon the joint use of methadone and Phα1β in a model of cancer-related pain in C57BL/6J mice**. Doi: 10.1016/j.lfs.2021.119582. *Life sciences*, Elsevier, vol 278, 1 august, 2021.
- INCA. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **A situação do câncer de mama no Brasil: síntese de dados dos sistemas de informação**. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva – Rio de Janeiro, 2019.
- MUNHOZ, J. et al. **Components from spider venom activate macrophages against glioblastoma cells: new potential adjuvants for anticancer immunotherapy**. *J Biochem*. 2021;mvab020. doi:10.1093/jb/mvab020, 2021.
- PEDRON, C. et al. **Phoneutria nigriventer Tx3-3 peptide toxin reduces fibromyalgia symptoms in mice** doi.org/10.1016/j.npep.2020.102094. *Neuropeptides*, Vol 85, February, 2021.
- RAPÔSO, C. et al. **Acute blood-brain barrier permeabilization in rats after systemic Phoneutria nigriventer venom**. *Brain Res*. 2007;1149:18-29. doi:10.1016/j.brainres.2007.02.086, 2007.
- ROSA, F. et al. **Phα1β, a peptide from the venom of the spider Phoneutria nigriventer shows antinociceptive effects after continuous infusion in a neuropathic pain model in rats**. Doi: 10.1213/ANE.0000000000000249. *Anesthesia & Analgesia* 119(1):p 196-202, July, 2014.
- SANTOS, N.B. et al. **Venom of the Phoneutria nigriventer spider alters the cell cycle, viability, and migration of cancer cells**. *Journal of Cellular Physiology*, v. 234, n. 2, p. 1398-1415, FEB 2019. Doi: 17/05402-0, 15/04194-0, 17/16196-2, 16/15827-6, 2019.
- SINHA, P. et al. **Prostaglandin E2 promotes tumor progression by inducing myeloid-derived suppressor cells**. *Cancer Research*, v. 67, n. 9, p. 4507-4513, 2007.