

POTENCIAL TERAPÊUTICO DA MOLÉCULA ISOLADA DE VENENO DE ARANHA NO CÂNCER DE MAMA: UM ESTUDO PRÉ-CLÍNICO

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

GABRIEL CORDEIRO, IB – UNICAMP

Prof^(a). Dr^(a). CATARINA RAPOSO (orientadora), FCF - UNICAMP

INTRODUÇÃO:

O câncer de mama é uma condição em que células anormais da mama se multiplicam de maneira desordenada, formando um tumor com potencial de invadir outros órgãos. Existem diversos tipos de câncer de mama, com alguns se desenvolvendo rapidamente e outros de forma mais lenta. Em 2023, o Brasil registrou 73.610 casos de câncer de mama em mulheres, representando 30,1% dos diagnósticos de câncer e 13,5% das mortes relacionadas ao câncer, com 16.300 óbitos (INCA, 2023). Um estudo da Universidade Federal Fluminense (UFF) revelou que uma em cada seis mortes por câncer de mama ocorre em mulheres com menos de 50 anos, ressaltando a importância do rastreamento precoce pois a maioria dos casos, quando tratados adequadamente e em tempo oportuno, apresentam bom prognóstico e possibilitam melhores resultados, com até 95% de chance de cura (FEMAMA, 2024).

O veneno da aranha *Phoneutria nigriventer* (PnV) é uma mistura de compostos bioativos com potencial farmacológico (RAPÔSO et al., 2007). Foi demonstrado pelo nosso grupo de pesquisa suas atividades antitumorais *in vitro* e *in vivo*, através da interferência no ciclo celular, 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; DOS SANTOS et al., 2019; MUNHOZ et al., 2021). Uma investigação da ação antitumoral das frações e subfrações purificadas do veneno em células de glioblastoma identificou a subfração mais ativa; os resultados apontaram que 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

foram estabelecidas a partir dos tumores dos cães e tratadas com o composto isolado do veneno. Os resultados demonstraram que houve uma redução da viabilidade do 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. Será 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 as pacientes e o sistema de saúde.

METODOLOGIA:

Os ensaios em modelo pré-clínico 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 foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UNICAMP; 6175/2023).

Foi realizada a expansão e manutenção das células tumorais da linhagem de adenocarcinoma mamário murino (EO771) (Fig.1), mantidas e cultivadas em meio de cultura *Iscoe'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 CO₂. Após o cultivo, foram feitas alíquotas de 1,5x10⁵ células em 100 µL de PBS estéril para serem inoculadas na 4^a glândula mamária por via epidermal.

Os animais foram monitorados em relação à progressão e regressão em resposta ao tratamento durante 30 dias. Os tumores primários foram medidos utilizando um paquímetro. O tratamento descrito abaixo foi iniciado no dia 0, e após o aparecimento da massa tumoral palpável ou visível (em torno de 15 a 20 dias após inoculação do tumor), com duração de 15 dias (totalizando 30) (protocolo que simula com maior similaridade o momento em que ocorre o diagnóstico do câncer de mama e início do tratamento). Todos os grupos descritos abaixo receberam inoculação das células tumorais (Tab.1).

Tabela 1. Grupos de tratamento

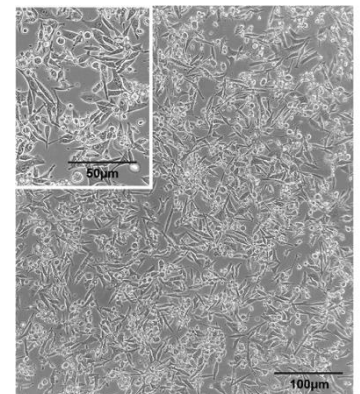


Figura 1. Linhagem EO771 - Adenocarcinoma mamário murino.

Grupos experimentais				
Controle	LW-3 10 µg/kg - Preventivo	LW-3 10 µg/kg	LW-3 10 µg/kg + Doxorubicina 5 mg/kg	Doxorrubicina 5 mg/kg
Injeção sistêmica de PBS 1M em 100 µL, a cada 48h, durante 15 dias.	Tratada a partir do dia 0 (dia da inoculação de células tumorais), com injeções via (i,p) em 100 µL, a cada 48h, durante 15 dias.	Tratada a partir do aparecimento do tumor (15 dias), com injeções via (i,p) em 100 µL, a cada 48h, durante 15 dias.	Tratada a partir do aparecimento do tumor (15 dias), com injeções via (i,p) em 50µL, a cada 48h, durante 15 dias. E uma única dose de Doxorubicina em 50 µL.	Tratada a partir do aparecimento do tumor (15 dias), com uma dose única via (i,p) em 100 µL.

Os animais foram acompanhados a cada 48h durante 30 dias, onde foram feitos os tratamentos e os seguintes parâmetros clínicos foram observados: sinais de dor, alterações no peso, consumo de alimento, teste de comportamento animal – campo aberto (*open field*), regressão e progressão do tumor. O desenvolvimento e crescimento do tumor foi avaliado utilizando um paquímetro e a pesagem e administração da ração foram realizadas para todos os grupos no mesmo dia e horário. O nível de significância entre tratamentos e controles será 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 Dunnett. As análises serão realizadas utilizando GraphPad 8.0 (*GraphPad Software Inc.*, San Diego, CA). Foram considerados os seguintes níveis de significância: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) e $p < 0,001$ (***).

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Após 30 dias de tratamento, foi realizada a eutanásia dos animais utilizando sobredose de anestésico cetamina 100 mg/kg e xilazina 10 mg/kg, imediatamente foi realizada a coleta do material biológico (sangue e órgãos) para as análises laboratoriais: hemograma, função renal (ureia e creatinina), função hepática (ALT e AST). O rim, fígado e o tumor de mamário foram dissecados, pesados, medidos e processados para inclusão em parafina e análise histopatológicas (Fig. 2). As análises laboratoriais (Fig. 3) demonstraram uremia em todos os grupos, sendo mais evidente no grupo LW-3 10 preventivo,

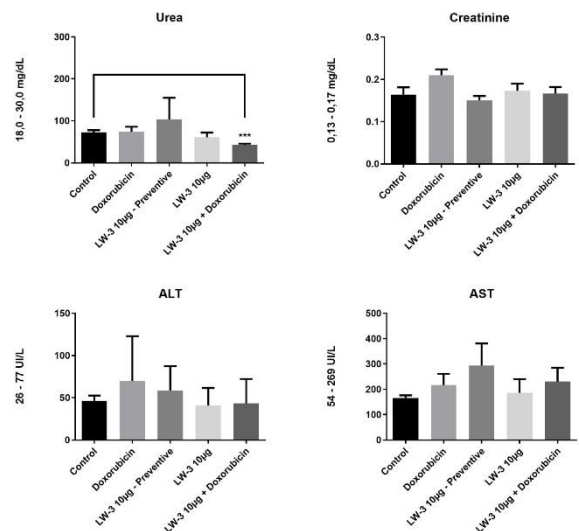


Figura 3. Resultado das análises laboratoriais.

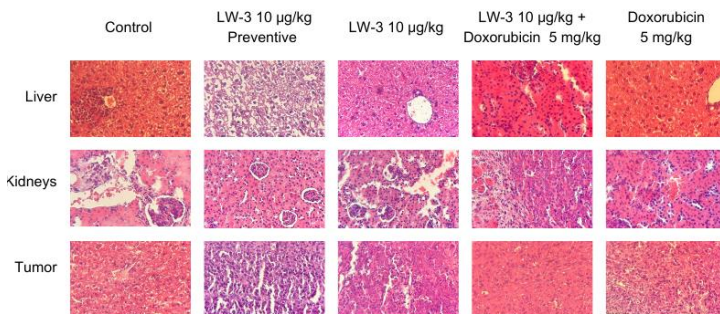


Figura 2. Imagens representativas da análise histológica dos órgãos (Fígado, Rins e Tumor) em cada grupo experimental. Cortes histológicos corados com hematoxilina e eosina.

no entanto é possível observar uma diminuição da uremia no grupo tratado com a LW-3 associada a doxorubicina, sendo significativo. Não foi observada hepatopatia (ALT e AST). Esses resultados prévios demonstram que a poliamina não possui efeitos citotóxicos nos grupos de tratamento. Não foi observada

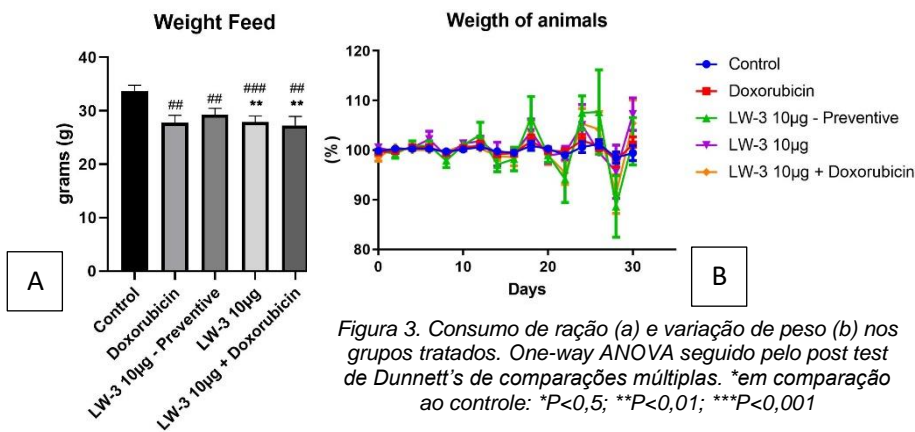


Figura 3. Consumo de ração (a) e variação de peso (b) nos grupos tratados. One-way ANOVA seguido pelo post test de Dunnett's de comparações múltiplas. *em comparação ao controle: * $P < 0,5$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$

3) sendo significativo além disso observamos que houve variação de peso dos animais ao longo do período experimental, com exceção do grupo controle que permaneceu estável. O teste de *Open Field* (Campo aberto) foi realizado para avaliar a atividade locomotora e exploração dos animais após o fim dos tratamentos. Nenhum efeito significativo foi observado no número de quadrantes percorridos pelos animais do grupo, também não foram observadas diferenças estatísticas entre o número de levantamentos e nem na frequência de limpeza ou comportamento exploratório (Fig. 4).

Diversos estudos executados pelo nosso grupo de pesquisa, evidenciou 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 regrediu o desenvolvimento do tumor comparado aos outros grupos de tratamento (Fig. 5). Além disso esse mesmo grupo não apresentou efeito citotóxico. Diversos artigos demonstram que as sub-frações do (PnV) possuem também propriedades analgésicas, o que justifica o bem estar dos animais (Rosa, F et al., 2014; Ferreira, L.A et al., 2021; Pedron, C et al., 2021).

alterações no exame hematológico. Apenas um óbito foi observado até o final do tratamento LW-3 10 µg, os animais não apresentaram perda de peso e o consumo de ração foi maior no grupo tratado com LW-3 10 µg e no grupo LW-3 10 µg associado a Doxorubicina (Fig.

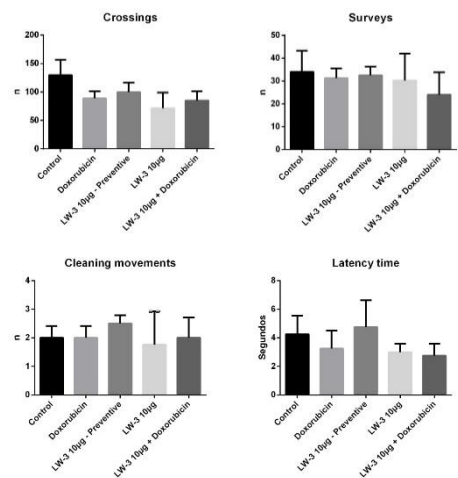


Figura 4. Avaliação da atividade dos camundongos no teste de campo aberto. (* $p < 0,05$, comparado ao controle sem tratamento).

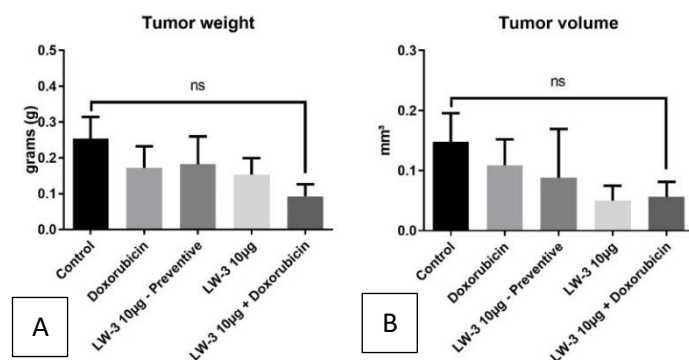


Figura 5. Peso dos tumores (a). Medida dos tumores em mm^3 (b). One-way ANOVA seguido pelo post test de Dunnett's de comparações múltiplas. *em comparação ao controle: * $P < 0,5$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$

Curiosamente o grupo tratado com a LW-3 preventiva teve um aumento expressivo no tamanho do tumor indicado que essa poliamina não possui efeito antineoplásico sozinha mais sim combinada a outro tratamento (Fig. 5). Atualmente o tratamento do câncer de mama inclui diversas abordagens de tratamento como: terapia hormonal, quimioterapia, cirurgia e radioterapia que são realizadas de forma individualiza. A Doxorubicina é um dos quimioterápicos de eleição

mais utilizados para o tratamento do câncer de mama, e geralmente é associada juntamente com outras modalidades terapêuticas (Akram, M et al., 2017).

Nosso estudo demonstra que os animais tratados com a poliamina LW-3 10µg associada a Doxorubicina tiveram um efeito antineoplásico significado comparado ao grupo tratado com a Doxorubicina isolada, o que corrobora com a literatura (Cabeza, L et al., 2015; Ewens,A et al., 2006)). Não foi observada efeitos citotóxicos evidentes nos grupos tratados exceto pelo grupo LW-3 preventivo, esse aumento das enzimas hepáticas e renais pode ter sido provocada pela própria progressão tumoral. Apesar dos nossos dados serem preliminares, tal achado sugere que a poliamina tem grande potência neoadjuvante ao tratamento do câncer de mama.

CONCLUSÕES:

Os resultados indicam que a poliamina LW-3 10 µg associada à Doxorubicina apresentou efeito antineoplásico in vivo e melhorou o bem estar dos animais tratados.

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.
- BARRETO, N. et al. **Spider venom components decrease glioblastoma cell migration and invasion through RhoA-ROCK and Na⁺/K⁺-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.
- 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.
- 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.
- FEMAMA. **Câncer de mama: 1 em cada 6 mortes pela doença no Brasil é de mulheres com menos de 50 anos**. Disponível em: <<https://femama.org.br/site/noticias-recentes/cancer-de-mama-1-em-cada-6-mortes-pela-doenca-no-brasil-e-de-mulheres-com-menos-de-50-anos/>>. Acesso em: 2 ago. 2024.
- FERREIRA, L.A. et al. **Antinociceptive synergism upon the joint use of methadone and Phc1β 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. **Estimativa de câncer no Brasil**. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva – Rio de Janeiro, 2023.
- MUNHOZ, J. et al. **Components from spider venom activate macrophages against glioblastoma cells: new potential adjuvants for anticancer immunotherapy**. *Journal of Biochemistry*, v. 170, n. 1, p. 51-68, 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. **Phc1β, 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.