

TRATAMENTO NEOADJUVANTE DO CÂNCER DE MAMA COM O PEPTÍDEO LW-9 E AVALIAÇÃO DE SOBREVIVÊNCIA LIVRE DE DOENÇA EM MODELO MURINO

Palavras-Chave: câncer de mama, *Phoneutria nigriventer*, terapia neoadjuvante e adjuvante

Autores(as):

SABRINA CARVALHO BRUNELLI, FCF - UNICAMP

INGRID MAYARA CAVALCANTE TREVISAN, FCF - UNICAMP

DANAÊ FERNANDA AVANZE CAÇÃO, FCF - UNICAMP

CIBELE PEREIRA MARIANO, FCF - UNICAMP

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

INTRODUÇÃO:

O câncer de mama é uma das neoplasias que mais acometem as mulheres e que apresenta uma alta taxa de mortalidade (INCA, 2019; Teixeira *et al.*, 2020). Apesar da ampla variedade de tratamentos disponíveis, muitos apresentam efeitos adversos importantes por agirem sem especificidade em células de alta proliferação, além da possibilidade de recidivas e resistência à terapia utilizada (Iuchno *et al.*, 2019; Teixeira *et al.*, 2024). Na busca por novos tratamentos, estudos pré-clínicos realizados com venenos de animais demonstram sua capacidade de interferir em processos essenciais à progressão tumoral, como a angiogênese, proliferação celular, invasão tecidual e metástase; além de possuírem efeitos imunomodulatórios (Rapôso *et al.*, 2017; Santos *et al.*, 2019; Barreto *et al.*, 2020; Bonfanti *et al.*, 2020; Kisaki *et al.*, 2021; Munhoz *et al.*, 2021; Caballero *et al.*, 2022).

Nosso grupo de pesquisa demonstrou que o veneno da aranha *Phoneutria nigriventer* (PnV) possui capacidade de interferir no ciclo celular, viabilidade, migração e proliferação de células tumorais (Santos *et al.*, 2019). Entre os peptídeos isolados do PnV, a molécula LW-9 apresentou atividades imunomodulatórias com indução de morte de células tumorais (Munhoz *et al.*, 2021; Mato *et al.*, 2023; Bonfanti, 2024). Em modelo murino de câncer de mama, a molécula LW-9 foi avaliada associada ou não à doxorrubicina, apresentando redução do volume tumoral, com aumento da eficácia do medicamento e redução dos seus efeitos adversos (dados ainda não publicados).

Diante disso, outros protocolos terapêuticos devem ser investigados. A quimioterapia neoadjuvante, administrada antes da cirurgia, busca reduzir o volume tumoral e viabilizar essa intervenção (Andrade *et al.*, 2013; MS, 2024). Já o tratamento adjuvante, realizado após a nodulectomia, reduz a taxa de mortalidade e aumenta a sobrevivência global do paciente (MS, 2024).

Assim, o presente trabalho avaliou, em modelo murino, os protocolos de terapia neoadjuvante e adjuvante com a LW-9 associada ou não à doxorrubicina, visando propor modelos de tratamento mais próximos da prática clínica.

METODOLOGIA:

Células da linhagem EO771 (adenocarcinoma mamário murino) derivadas de camundongos C57BL/6, foram descongeladas e cultivadas em garrafas de 25 cm² com meio IMDM completo (10% SFB, 50 mg/mL L-glutamina, Penicilina e Estreptomicina; Gibco Inc., Billings, MT, USA) a 37°C, em estufa com 5% de CO₂. Ao atingirem ~95% de confluência, foram repicadas e expandidas até as passagens de 4 a 9.

Para os ensaios de inoculação tumoral utilizaram-se camundongos fêmeas C57BL/6 (8–10 semanas), provenientes do CEMIB/UNICAMP, mantidos no biotério do Instituto de Biologia/UNICAMP, sob condições controladas (12/12 h claro/escuro, água e ração *ad libitum*). O protocolo seguiu os princípios do COBEA e foi aprovado pela CEUA/UNICAMP (nº 6595-1/2025). Os animais foram divididos em duas replicatas (n=5/grupo) e receberam inoculação de 1,5x10⁵ células, na região da quarta glândula mamária esquerda de forma epidermal. Eles foram monitorados a cada 48 horas até que fosse possível observar crescimento tumoral palpável (aproximadamente 0,2 cm de diâmetro). Após isso, foram divididos nos grupos experimentais, conforme a **Tabela 1**.

Tabela 1. Grupos de tratamento neoadjuvante e adjuvante

Tratamento	Controle	LW-9 1µg/mL	LW-9 1µg/mL + Doxorrubicina 5mg/kg	Doxorrubicina 5mg/kg
Neoadjuvante	Soro fisiológico via i.p. em 100 µl, a cada 48hs, durante 21 dias. Total de 11 doses	Peptídeo LW-9 via i.p. diluído em 100 µl de soro fisiológico, a cada 48hs, durante 21 dias. Total de 11 doses	Peptídeo LW-9 diluído em 100 µl de soro fisiológico a cada 48hs, e 1 dose semanal de doxorrubicina diluída em 150 µl de soro fisiológico, via i.p. durante 21 dias. Total de 11 doses da LW-9 e 3 doses da doxorrubicina.	Doxorrubicina diluída em 150 µl de soro fisiológico, 1 dose semanal, via i.p. durante 21 dias. Total de 3 doses.
Adjuvante	Soro fisiológico via i.p. em 100 µl, a cada 48hs, durante 15 dias. Total de 8 doses.	Peptídeo LW-9 via i.p. diluído em 100 µl de soro fisiológico, a cada 48hs, durante 15 dias. Total de 8 doses	Peptídeo LW-9 diluído em 100 µl de soro fisiológico a cada 48hs, e 1 dose semanal de doxorrubicina diluída em 150 µl de soro fisiológico, via i.p. durante 15 dias. Total de 8 doses da LW-9 e 2 doses da doxorrubicina.	Doxorrubicina diluída em 150 µl de soro fisiológico, 1 dose semanal, via i.p. durante 15 dias. Total de 2 doses.

* Via intraperitoneal: i.p.

- Procedimento cirúrgico:

Após o período de tratamento, os animais foram submetidos a cirurgia de ressecção da massa tumoral. Inicialmente, os camundongos foram aclimatados na sala de procedimento do biotério durante 1 hora. No pré-operatório, foi realizado o analgésico buprenorfina 0,02 mg/kg, via subcutânea, 5 minutos antes da anestesia. A indução anestésica foi realizada com cetamina 80 mg/kg e xilazina 10 mg/kg e mantida com isoflurano 1% em oxigênio durante o procedimento (**Figura 1A**).

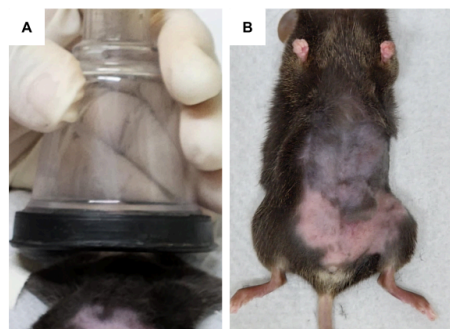


Figura 1. Preparação do camundongo para realização do procedimento cirúrgico. **A)** Animal em câmara de anestesia. **B)** Local da cirurgia após tricotomia e assepsia.

A região da glândula mamária foi tricotomizada e desinfetada com álcool 70% (**Figura 1B**). A massa tumoral foi então ressecada com auxílio de bisturi e tesoura de metzenbaum, o tumor obtido foi fixado em solução de formalina 4%. A sutura foi realizada com fio de nylon 4.0 mm, o local foi limpo com água oxigenada 10% e foi aplicada a pomada vetaglós®, para auxiliar na cicatrização. No pós-operatório, os animais receberam injeção subcutânea de buprenorfina 0,01 mg/kg, por 3 dias a cada 12 horas e dipirona 80 mg/kg, por via oral em dose única. Após a cicatrização completa (20 a 30 dias) e recuperação do

procedimento cirúrgico, foi iniciado o tratamento adjuvante, que durou 15 dias. A sobrevida foi avaliada por 60 a 68 dias, após tratamento neoadjuvante e adjuvante. O material biológico foi coletado (cérebro, pulmão, fígado e tumor) e fixado em solução de formalina 4%, as amostras de sangue foram transferidas para tubos de EDTA e bioquímico para realização do hemograma, função renal (uréia e creatinina), função hepática (fosfatase alcalina - FA) e cálcio ionizado.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Os animais desenvolveram tumor em 10 dias de inoculação. No tratamento neoadjuvante, o grupo tratado com a LW-9 apresentou redução significativa do volume e peso tumoral, comparado ao grupo controle ($p < 0,01$) (**Figura 2A e 2B**), além de redução do crescimento tumoral, quando comparado ao controle ($p < 0,01$) (**Figura 2C**), e melhora no bem-estar dos animais.

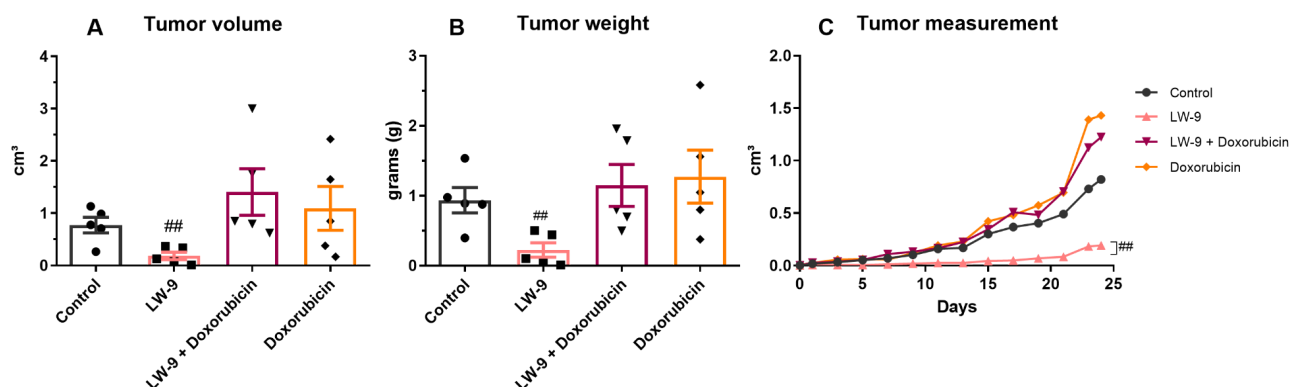


Figura 2. **A)** Volume tumoral após ressecção cirúrgica. **B)** Peso tumoral. **C)** Acompanhamento do crescimento tumoral durante o tratamento neoadjuvante. Resultado de duas replicatas experimentais. Média $\pm$ SEM; One-way ANOVA, seguido pelo teste t-student. Níveis de significância considerados em comparação ao controle: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) e $p < 0,001$ (***) e $p < 0,05$ (#), $p < 0,01$ (##) e $p < 0,001$ (###). Software GraphPad Prism.

Os animais tratados com a doxorubicina apresentaram aumento significativo de peso percentual, comparado ao grupo controle ($p < 0,001$ ao longo dos dias; média $p < 0,001$ e $p < 0,05$), enquanto os grupos da LW-9 ($p < 0,05$ e $p < 0,01$ ao longo dos dias; média $p < 0,05$) e da LW-9 associada à doxorubicina ($p < 0,05$ ao longo dos dias; média $p < 0,05$) apresentaram redução no peso (**Figura 3A e 3B**). O grupo da LW-9 apresentou redução no peso absoluto ($p < 0,05$) e o grupo da LW-9

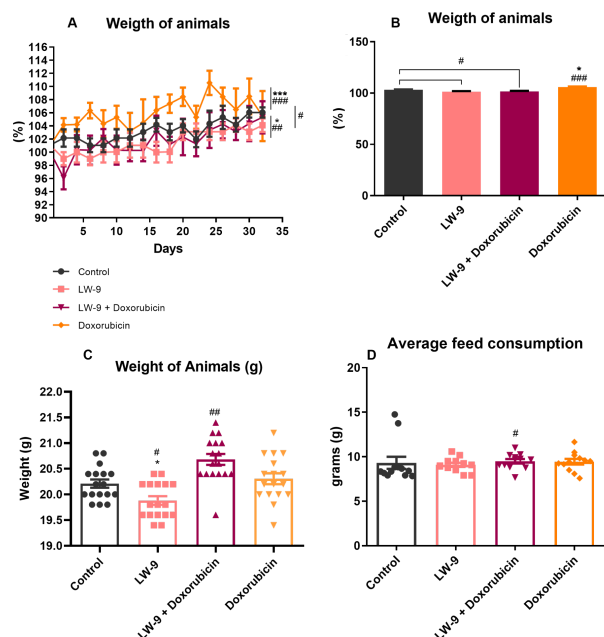


Figura 3. Análises relacionadas ao peso dos animais e ao consumo de ração. **A)** Consumo percentual de ração dos animais, gráfico de linhas. **B)** Peso percentual dos animais, gráfico de barras. **C)** Peso absoluto dos animais, gráfico de barras. **D)** Consumo de ração. Resultado de duas replicatas experimentais. Média $\pm$ SEM; One-way ANOVA, seguido pelo teste t student. Níveis de significância considerados em comparação ao controle: p < 0,05 (*), p < 0,01 (**) e p < 0,001 (***) e p < 0,05 (#), p < 0,01 (##) e p < 0,001 (###). Software GraphPad Prism.

associada à doxorrubicina apresentou aumento (p < 0,01), comparado ao controle (**Figura 3C**). O consumo de ração foi significativamente maior no grupo da associação (p < 0,05) (**Figura 3D**).

A cirurgia foi padronizada, no entanto, devido a complicações operatórias, como presença de tumores de tamanho elevado e a profundidade de crescimento no tecido, alguns animais foram a óbito. Isso resultou nos seguintes números amostrais: controle (n=2), LW-9 (n=3), LW-9 associado à doxorrubicina (n=1), doxorrubicina (n=3). A cicatrização completa dos animais ocorreu após 20 dias de procedimento e o tratamento adjuvante foi iniciado após entre 20 a 30 dias. Os animais do grupo LW-9 associado à doxorrubicina e doxorrubicina apresentaram recidiva.

Com relação aos exames laboratoriais, todos os animais apresentaram uremia e o grupo da LW-9 e da doxorrubicina apresentaram leve aumento de creatinina. Essas alterações renais podem ter sido causadas pela cirurgia e tratamentos. O grupo LW-9 e

da associação apresentaram redução da fosfatase alcalina. O cálcio ionizado no grupo da LW-9 mostrou-se reduzido, o que pode indicar baixa atividade tumoral. Nos grupos com a doxorrubicina o marcador se mostrou aumentado, o que pode demonstrar resistência e recidiva tumoral (**Tabela 2**).

Tabela 2. Resultados dos exames bioquímicos.

Parâmetro	Ureia 17,0 - 28,0 mg/dL			Creatinina 0,3 - 1 mg/dL			Fosfatase alcalina 100 - 184 U/L			Cálcio ionizado 4,6 - 5,4 mg/dL		
Animal	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Controle	58,0 ↑	59,0 ↑	-	0,62	0,54	-	160,0	132,0	-	5,00	5,40	-
LW-9	60,0 ↑	80,0 ↑	41,0 ↑	1,10 ↑	1,30 ↑	0,51	75,0 ↓	145,0	101,0	4,20 ↓	4,20 ↓	5,60 ↑
LW-9 + Doxo	55,0 ↑	-	-	0,57	-	-	54,0 ↓	-	-	6,20 ↑	-	-
Doxo	84,0 ↑	55,0 ↑	59,0 ↑	1,08 ↑	0,68	0,44	120,0	103,0	121,0	6,40 ↑	5,30	5,70 ↑

* Doxo: Doxorrubicina.

O grupo tratado com a LW-9 apresentou aumento de leucócitos e de monócitos, indicando uma possível resposta do sistema imunológico no combate da doença (**Tabela 3**).

Tabela 3. Resultados dos exames hematológicos.

Parâmetro	Leucócitos 1990 - 12.130/uL	Neutrófilos 99 - 4488/uL	Monócitos 121 - 364/uL	Eosinófilos 0 - 121/uL
-----------	--------------------------------	-----------------------------	---------------------------	---------------------------

Animal	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Controle	3800	5200	-	9% - 342	19% - 988	-	2% - 76 ↓	0% - 0 ↓	-	0% - 0	1% - 52	-
LW-9	4200	5700	8600	2% - 84 ↓	4% - 228	11% - 946	3% - 126	1% - 57 ↓	3% - 258	1% - 42	0% - 0	0% - 0
LW-9 + Doxo	5900	-	-	27% - 1.593	-	-	2% - 118 ↓	-	-	0% - 0	-	-
Doxo	2200	8100	2300	10% - 220	25% - 2.025	15% - 345	1% - 22 ↓	1% - 81 ↓	5% - 115	0% - 0	1% - 81	1% - 23

CONCLUSÕES:

O peptídeo LW-9 demonstrou potencial terapêutico pela redução do volume e peso tumoral, e também pela melhora do bem-estar dos animais. Além disso, o procedimento cirúrgico foi otimizado apresentando cicatrização cirúrgica satisfatória. Houveram recidivas nos grupos tratados com a LW-9 associada à doxorrubicina e doxorrubicina isolada. Os exames demonstraram possível resposta do sistema imunológico com aumento de leucócitos e monócitos, principalmente no grupo tratado com a LW-9. Ademais, os animais apresentaram alteração renal e o marcador tumoral cálcio ionizado apresentou diminuição no grupo da LW-9, o que pode indicar controle da progressão da doença. As alterações observadas no presente estudo serão investigadas futuramente.

BIBLIOGRAFIA

ANDRADE, D. A. P. DE. *et al.* Quimioterapia neoadjuvante e resposta patológica: coorte retrospectiva. *einstein* (São Paulo), v. 11, n. 4, p. 446–450, out. 2013.

BARRETO, N. *et al.* Spider venom components decrease glioblastoma cell migration and invasion through RhoA-ROCK and Na⁺/K⁺-ATPase β2: potential molecular entities to treat invasive brain cancer. *Cancer Cell International*, v. 20, n. 1, p. 576, 2020.

BONFANTI, A. P. *et al.* Spider venom administration impairs glioblastoma growth and modulates immune response in a non-clinical model. *Scientific Reports*, v. 10, n. 1, p. 1-16, 2020.

BONFANTI, A. P. Terapia celular com macrófagos e células NK moduladas ex vivo por peptídeos isolados de veneno animal: uma nova abordagem em imunoterapia para tratamento do câncer. 2024. 199P. Tese (Doutorado em Biologia Molecular e Morfofuncional) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, 2024.

CABALLERO, M. *et al.* Isolated componentes from spider venom targeting human glioblastoma cells and its potential combined therapyp with rapamycin. *Frontiers in Molecular Biosciences*, v. 9, p. 752668, 2022.

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: INCA, 2019.

IUCHNO, C. W., CARVALHO, G. P. Toxicidade e efeitos adversos decorrente do tratamento quimioterápico antineoplásico em pacientes pediátricos: revisão integrativa. *Ciência & Saúde* v. 12, n. 1, p. e30329, 2019.

KISAKI, C.Y. *et al.* Bothrops jararaca snake venom modulates key cancer-related proteins in breast tumor cell lines. *Toxins* (Besel), v. 13, n. 8, p. 519, 2022.

MATO, F. C. *et al.* Isolated peptide from spider venom modulates dendritic cells in vitro: a possible application in oncoimmunotherapy for glioblastoma. *Cells*, v. 12, n. 7, p. 1023, 2023.

MS. Ministério da Saúde. Relatório de recomendação: Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas - câncer de mama. Brasília, DF, 2024.

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.

RAPÔSO, C. Scorpion and spider venoms in cancer treatment: state of the art, challenges, and perspectives. *Journal of clinical and translational research*, v. 3, n. 2, p. 233, 2017.

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, 2019.

TEIXEIRA, L. A.; ARAÚJO NETO, L. A.. Câncer de mama no Brasil: medicina e saúde pública no século XX. *Saúde e Sociedade*, v. 29, n. 3, p. e180753, 2020.

TEIXEIRA, N. R. *et al.* Mecanismos celular de resistência ao tratamento do câncer: Uma revisão integrativa da literatura. *X Fórum Rondoniense de Pesquisa*, v. 5, n. 10, p. 1-5, 2024.