

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE - PPGCS
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

NATÁLIA MACIEL ANDRADE

**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DA TOXINA BOTULÍNICA
TIPO A ASSOCIADA A PACLITAXEL EM LINHAGEM CELULAR
DE CÂNCER DE MAMA**

CRICIÚMA

2024

NATÁLIA MACIEL ANDRADE

**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DA TOXINA BOTULÍNICA
TIPO A ASSOCIADA A PACLITAXEL EM LINHAGEM CELULAR
DE CÂNCER DE MAMA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Andrez Machado de Ávila
Coorientadora: Dr^a. Helena Mendes Abelaira

CRICIÚMA

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

A553a Andrade, Natália Maciel.

Avaliação da citotoxicidade da toxina botulínica tipo A associada a paclitaxel em linhagem celular de câncer de mama / Natália Maciel Andrade. - 2024.
42 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2024.

Orientação: Ricardo Andrez Machado de Ávila.
Coorientação: Helena Mendes Abelaira.

1. Toxina botulínica - Uso terapêutico. 2. Paclitaxel - Uso terapêutico. 3. Mamas - Câncer - Tratamento. 4. Quimioterapia adjuvante. I. Título.

CDD. 22. ed. 615.1

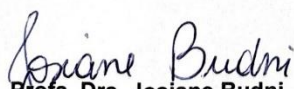
Bibliotecária Eliziane de Lucca Alosilla - CRB 14/1101
Biblioteca Central Prof. Eurico Back - UNESC



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO, INOVAÇÃO E EXTENSÃO
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)
Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria N° 609 de 14.03.2019

ATA DE MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE – N° 463

Com início às 10 (dez) horas do dia 28 (vinte e oito) de fevereiro de 2025 (dois mil e vinte e cinco), realizou-se, na Sala R1/Bloco 101, o seminário formal de apresentação dos resultados da Dissertação de Mestrado de **NATÁLIA MACIEL ANDRADE**, sob a orientação do **Prof. Dr. Ricardo Andrez Machado de Ávila** e coorientação da **Dra. Helena Mendes Abelaira**, intitulada **“AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DA TOXINA BOTULINICA TIPO A ASSOCIADA A PACLITAXEL EM LINHAGEM CELULAR DE CÂNCER DE MAMA”**. A dissertação foi examinada por uma banca constituída pelos seguintes membros: Profa. Dra. Jaqueline da Silva Generoso (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovada, Prof. Dr. Paulo Cesar Lock Silveira (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovada, e Prof. Dr. Alexandre Gonçalves Dal-Bó (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC). – Conceito final: Aprovada. Com o resultado final: APROVADA, a aluna finalizou seus estudos em nível de Mestrado, fazendo jus ao grau de MESTRA EM CIÊNCIAS DA SAÚDE. Os trabalhos foram concluídos às 12h (doze) horas, dos quais eu, Henrique Manenti Felisberto, Secretário do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC, lavrei a presente ata, que assino juntamente com a Profa. Dra. Josiane Budni, Coordenadora do Programa. Criciúma, 28 (vinte e oito) de fevereiro de 2025 (dois mil e vinte e cinco).


Profa. Dra. Josiane Budni
Coordenadora do PPGCS


Henrique Manenti Felisberto
Secretário do PPGCS

Dedico essa dissertação a minha família, que sempre esteve ao meu lado e a todos que de alguma forma contribuíram para a conclusão da mesma.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, por me dar força e sabedoria ao longo desta caminhada e por iluminar meus passos nos momentos mais desafiadores.

À minha família, especialmente aos meus pais, Rose e Ronaldo, e à minha irmã, Naíla, por sempre acreditarem em mim e me apoiarem incondicionalmente. Vocês são a base de todas as minhas conquistas.

Ao meu esposo, Rodrigo, pelo amor, paciência e apoio incansável. Sua presença constante e incentivo foram fundamentais para que eu pudesse concluir essa jornada.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Ricardo Andrez Machado de Ávila, pela orientação precisa e pelo incentivo ao longo de todo o processo de desenvolvimento deste trabalho. Sua experiência e apoio foram determinantes para o sucesso desta pesquisa.

À minha coorientadora, Prof.^a Dr.^a Helena, agradeço pelo apoio e pelas valiosas contribuições durante a realização deste trabalho.

Aos meus colegas de laboratório, em especial à Ellen e ao Gabriel, que estiveram ao meu lado na execução deste trabalho. A ajuda e o companheirismo de vocês foram essenciais para a conclusão deste projeto.

À Universidade do Extremo Sul Catarinense (Unesc) e aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (PPGCS), que contribuíram para minha formação e aprimoramento científico, oferecendo um ambiente rico em aprendizado e desenvolvimento pessoal e acadêmico.

Por fim, aos meus amigos, que me acompanharam e apoiaram em toda essa trajetória, minha gratidão por estarem ao meu lado, sempre com palavras de incentivo e gestos de amizade.

A todos vocês, meu mais sincero agradecimento.

“O conhecimento é o ato de entender a vida.”

Aristóteles

RESUMO

O câncer de mama representa um desafio significativo de saúde pública global, sendo a segunda causa de morte em todo o mundo. Os tratamentos atuais disponíveis para essa patologia se baseiam em quimioterapia, radioterapia e cirurgia. Entretanto, a maior preocupação em relação aos tratamentos atuais, é sua toxicidade em células saudáveis, fator que aumenta os efeitos colaterais, diminuindo a qualidade de vida dos pacientes. Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos citotóxicos da toxina botulínica tipo A (BoNT/A) isolada e associada ao paclitaxel (PTX) em linhagem celular imortalizada de câncer de mama (4T1) e em linhagem celular imortalizada de fibroblastos murinos (NiH3T3). Para a BoNT/A isolada foi realizado uma curva de concentração (0,5 U/mL, 2 U/mL e 6 U/mL) no tempo de 24 h e 48 h, para determinar a melhor concentração para associar ao fármaco PTX. Para construir a curva de dose da PTX, foram testadas concentrações de 0,5 µg/mL, 1,0 µg/mL, 5,0 µg/mL, 10 µg/mL, 20 µg/mL e 50 µg/mL. A viabilidade celular foi avaliada através do ensaio de MTT. Com base nos resultados obtidos, foram definidas as doses a serem utilizadas em combinação com a BoNT/A na concentração definida. Os resultados mostraram que a BoNT/A, na concentração de 6 U/mL após 48 horas de exposição, apresentou citotoxicidade seletiva contra células cancerígenas, preservando a viabilidade das células saudáveis. Em contraste, o PTX nas dosagens de 5,0 µg/mL, 10 µg/mL, 20 µg/mL exibiu efeito citotóxico em ambas as linhagens celulares. A combinação de PTX e BoNT/A também apresentou citotoxicidade em ambas as linhagens, mas, nas concentrações de 5,0 µg/mL e 10,0 µg/mL, demonstrou maior efeito citotóxico em células cancerígenas em comparação com células saudáveis. Destaca-se que a associação de PTX e BoNT/A, na concentração de 5,0 µg/mL, revelou um efeito citotóxico significativamente superior ao do PTX isolado, sugerindo uma interação sinérgica entre os compostos, ao mesmo tempo em que manteve uma viabilidade celular semelhante para as células saudáveis. Esses achados ressaltam o potencial da associação de PTX e BoNT/A como uma abordagem promissora para tratamentos mais eficazes do câncer de mama, com potencial para minimizar os efeitos colaterais associados aos tratamentos convencionais.

Palavras-chave: Câncer de mama; *in vitro*; toxina botulínica; paclitaxel; citotoxicidade; tratamento adjuvante.

ABSTRACT

Breast cancer represents a significant global public health challenge, being the second leading cause of death worldwide. Current treatments available for this pathology are based on chemotherapy, radiotherapy and surgery. However, the greatest concern regarding current treatments is their toxicity to healthy cells, a factor that increases side effects and reduces the quality of life of patients. Thus, the present study aimed to evaluate the cytotoxic effects of botulinum toxin type A (BoNT/A) isolated and associated with paclitaxel (PTX) in an immortalized breast cancer cell line (4T1) and in an immortalized murine fibroblast cell line (NiH3T3). For isolated BoNT/A, a concentration curve (0.5 U/mL, 2 U/mL and 6 U/mL) was performed at 24 h and 48 h to determine the best concentration to associate with the drug PTX. To construct the PTX dose curve, concentrations of 0.5 µg/mL, 1.0 µg/mL, 5.0 µg/mL, 10 µg/mL, 20 µg/mL and 50 µg/mL were tested. Cell viability was assessed through the MTT assay. Based on the results obtained, the doses to be used in combination with BoNT/A at the defined concentration were defined. The results showed that BoNT/A, at a concentration of 6 U/mL after 48 hours of exposure, presented selective cytotoxicity against cancer cells, preserving the viability of healthy cells. In contrast, PTX at dosages of 5.0 µg/mL, 10 µg/mL, 20 µg/mL exhibited a cytotoxic effect on both cell lines. The combination of PTX and BoNT/A also showed cytotoxicity in both cell lines, but at concentrations of 5.0 µg/mL and 10.0 µg/mL, it demonstrated a greater cytotoxic effect in cancer cells compared to healthy cells. It is noteworthy that the combination of PTX and BoNT/A, at a concentration of 5.0 µg/mL, revealed a significantly higher cytotoxic effect than PTX alone, suggesting a synergistic interaction between the compounds, while maintaining similar cell viability for healthy cells. These findings highlight the potential of the combination of PTX and BoNT/A as a promising approach for more effective treatments of breast cancer, with the potential to minimize the side effects associated with conventional treatments.

Keywords: Breast cancer; *in vitro*; botulinum toxin; paclitaxel; cytotoxicity; adjuvant treatment

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1:** Representação dos tipos de tumores não invasivos.9
- Figura 2:** Perfis de potencial zeta do medicamento PTX na ausência e presença de BoNT/A (U/mL).22
- Figura 3:** Curva de dose da BoNT/A na viabilidade celular da linhagem 4T1, avaliada pelo ensaio de MTT nos tempos de 24 e 48 horas. Dados expressos como \pm média e desvio padrão, considerando $p \leq 0,05$ como significativo (ANOVA de uma via).23
- Figura 4:** Curva de dose da BoNT/A na viabilidade celular da linhagem NiH3T3, avaliada pelo ensaio de MTT nos tempos de 24 e 48 horas. Dados expressos como \pm média e desvio padrão, considerando $p \leq 0,05$ como significativo (ANOVA de uma via).24
- Figura 5:** Curva de dose da paclitaxel (PTX) em diferentes concentrações, avaliada pela viabilidade celular por meio do ensaio de MTT nas linhagens 4T1 e NIH3T3. Dados expressos como \pm média e desvio padrão, considerando $p \leq 0,05$ como significativo (ANOVA de uma via).25
- Figura 6:** Efeito da combinação de PTX e BoNT/A em diferentes concentrações na viabilidade celular, avaliado pelo ensaio de MTT nas linhagens 4T1 e NIH3T3. Dados expressos como \pm média e desvio padrão, considerando $p \leq 0,05$ como significativo (ANOVA de uma via).26
- Figura 7:** Efeito isolado do PTX e da combinação de PTX com BoNT/A em diferentes concentrações na viabilidade celular, avaliado pelo ensaio de MTT na linhagem 4T1. Dados expressos como \pm média e desvio padrão, considerando $p \leq 0,05$ como significativo (ANOVA de uma via).26
- Figura 8:** Efeito isolado do PTX e da combinação de PTX com =BoNT/A em diferentes concentrações na viabilidade celular, avaliado pelo ensaio de MTT na linhagem NiH3T3. Dados expressos como \pm média e desvio padrão, considerando $p \leq 0,05$ como significativo (ANOVA de uma via).27

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACS	Sociedade Americana contra o Câncer (do inglês, <i>American Cancer Society</i>)
BoNT	Toxina Botulínica
BoNT-A	Toxina botulínica tipo A
CDIS	Carcinoma Ductal In Situ
CLIS	Carcinoma Lobular In Situ
DMEM	Meio Dulbecco's Eagle Modificado (do inglês, <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>)
DNA	Ácido desoxirribonucleico (do inglês, <i>Deoxyribonucleic Acid</i>)
HIAE	Hospital Israelita Albert Einstein
INCA	Instituto Nacional do Câncer
MTT	Brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5 difeniltetrazólio
NAPs	Proteínas não tóxicas associadas à neurotoxina
NCI	Instituto Nacional do Câncer (do inglês, <i>National Cancer Institut</i>)
OMS	Organização Mundial da Saúde
PALS	Análise de fase de dispersão de luz (do inglês, <i>Phase Analysis Light Scattering</i>)
PARP	poli(ADP-ribose) polimerase
PTX	Paclitaxel
RE	Receptor de Estrogênio
RP	Receptor de Progesterona
TNBC	Câncer de Mama Triplo-Negativo (<i>do inglês Triple-negative breast cancer</i>)
UV	Ultravioletas
ZP	Potencial Zeta (do inglês, <i>Zeta Potential</i>)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	6
1.1 CÂNCER	6
1.1.1 Câncer de Mama	7
1.2 ABORDAGENS TERAPÊUTICAS	10
1.3 PACLITAXEL	12
1.4 TOXINA BOTULÍNICA	14
2 OBJETIVOS	18
2.1 OBJETIVO GERAL.....	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
3 MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1 CARACTERIZAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE PTX E BoNT/A.....	19
3.2 LINHAGEM CELULAR.....	19
3.3 CULTURA CELULAR.....	19
3.4 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR (MTT)	20
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	21
4 RESULTADOS	22
4.1 CARACTERIZAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE PTX E BoNT/A.....	22
4.2 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR (MTT)	23
5 DISCUSSÃO	28
6 CONCLUSÃO	33

1 INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER

O corpo humano é composto por trilhões de células que crescem, dividem-se e morrem de maneira controlada. No entanto, quando as células de um tecido ou órgão crescem de forma desordenada, tornam-se cancerosas. Nesse cenário, o processo de apoptose (morte celular programada) é interrompido, permitindo a formação de novas células anormais, que resultam em tumores (Oncoguia, 2017; INCA, 2022).

O crescimento e amadurecimento celular são coordenados pelas ações de genes específicos que controlam a divisão celular, reparam erros no DNA e promovem a apoptose (INCA, 2022). Alterações ou mutações nesses genes podem comprometer essas funções, resultando em crescimento celular desordenado, um fator-chave no desenvolvimento do câncer. Os principais genes envolvidos nesse processo são: oncogenes, genes supressores de tumores e genes de reparo do DNA. Normalmente, o surgimento de tumores envolve alterações em mais de um desses tipos de genes em uma única célula (ACS, 2022). Uma das principais complicações do câncer é a formação de metástases. Nesse processo, as células cancerígenas se desprendem do tumor primário e migram para outros órgãos e tecidos por meio da corrente sanguínea ou do sistema linfático (NCI, 2021; ACS, 2024).

O câncer é uma doença multifatorial, cujo desenvolvimento pode ser influenciado por fatores externos e internos. Entre as causas externas, destacam-se a exposição a substâncias químicas, consumo de álcool, uso de drogas, tabagismo, poluição, radiações ionizantes, raios-ultravioleta (UV), infecções, alimentação inadequada, sedentarismo e obesidade. Já as causas internas estão associadas a fatores hormonais, condições imunológicas e alterações genéticas (NCI, 2015). Além disso, o envelhecimento é um fator significativo para o surgimento do câncer, pois as taxas de incidência aumentam progressivamente com a idade (NCI, 2021; INCA, 2023).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) (2024), cerca de 1 em cada 5 pessoas desenvolverá câncer ao longo da vida. Entre os tipos mais prevalentes estão os cânceres de pulmão, mama, cólon e reto, próstata, estômago e

pele (não melanoma). Em termos de mortalidade, os dados de 2020 destacaram o câncer de pulmão como o principal responsável, com 1,8 milhão de mortes, seguido pelos cânceres de cólon e reto (916 mil), fígado (830 mil), estômago (769 mil) e mama (685 mil) (OMS, 2022). Dados publicados pela OMS em 2022, indicaram aproximadamente 20 milhões de novos casos de câncer e 9,7 milhões de mortes neste ano. No entanto, revisões baseadas em dados demográficos apontam que o número anual de novos casos chegará a 35 milhões até 2050, um aumento de 77% em relação aos dados de 2022 (Bray et al., 2024).

Esses números refletem um crescimento significativo nos índices de incidência e mortalidade ao longo dos anos. Entretanto, estima-se que entre 30% e 50% dos casos de câncer possam ser evitados por meio de medidas preventivas. Adotar hábitos saudáveis, como manter uma alimentação balanceada, realizar atividades físicas regularmente, evitar o tabagismo e moderar o consumo de álcool, desempenha um papel crucial na prevenção da doença. Além disso, a redução da exposição a substâncias nocivas, como poluentes e produtos químicos, contribui significativamente para diminuir os riscos. A implementação de estratégias globais de prevenção e detecção precoce é fundamental no âmbito dos sistemas de saúde. O diagnóstico precoce e o tratamento adequado aumentam consideravelmente as chances de remissão completa, elevando as taxas de cura e proporcionando melhor qualidade de vida aos pacientes (OMS, 2022; INCA, 2024).

1.1.1 Câncer de Mama

No Brasil, o câncer de mama é o tipo mais comum entre as mulheres, excluindo os tumores de pele não melanoma. A doença afeta todas as regiões do país, mas os maiores índices de incidência são registrados nas regiões Sul e Sudeste. A idade é um dos principais fatores de risco para o câncer de mama, com a maioria dos casos diagnosticados em mulheres acima de 50 anos. Embora raro, o câncer de mama também pode ocorrer em homens, representando cerca de 1% dos casos totais (INCA, 2019, 2023).

Para cada ano do triênio 2023-2025, são estimados 73.610 novos casos de câncer de mama, com uma taxa ajustada de 41,89 casos por 100 mil mulheres. Este tipo de câncer é a principal causa de morte oncológica entre as mulheres no Brasil, com variações regionais significativas. Em 2022, a taxa de mortalidade

ajustada pela idade, com base na população mundial, foi de 12,3 óbitos por 100 mil mulheres. As regiões Sul e Sudeste apresentaram as maiores taxas de mortalidade, com 13,60 e 13,16 óbitos por 100 mil mulheres, respectivamente. As regiões Centro-Oeste (12,06 óbitos por 100 mil), Nordeste (10,78 óbitos por 100 mil) e Norte (9,73 óbitos por 100 mil) seguem na sequência (INCA, 2024).

O câncer de mama, assim como os outros cânceres, resulta de uma disfunção celular que faz com que certas células do corpo cresçam e se multipliquem de maneira desordenada, levando à formação de um tumor. Existem diversos tipos de câncer de mama, que podem ser classificados de diferentes maneiras. A maioria dos cânceres de mama são formados por tumores epiteliais, conhecidos como carcinomas, que se originam em células que revestem os ductos e lóbulos mamários (Pfizer, 2019; Choi, 2023).

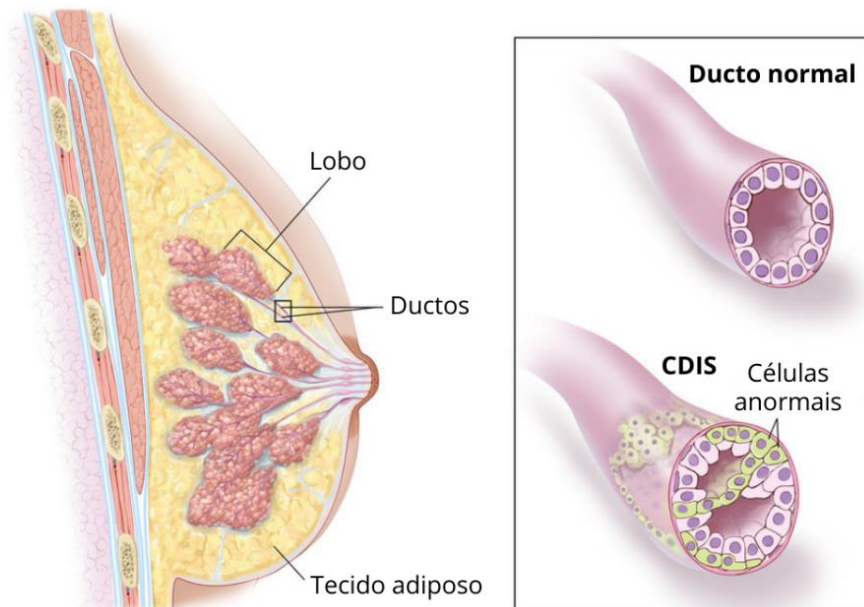
O câncer de mama pode ser classificado com base na disseminação do tumor. Quando o tumor permanece confinado aos ductos ou lóbulos, sem invadir tecidos vizinhos, é denominado como não invasivo (ou carcinoma *in situ*). Por outro lado, se as células cancerosas se espalham para o tecido adjacente, o câncer é classificado invasivo, indicando maior potencial de disseminação para outras partes do corpo (Harbeck et al., 2019; HIAE, 2023).

Dentre os tumores não invasivos, tem-se o carcinoma ductal *in situ* (CDIS) e o carcinoma lobular *in situ* (CLIS). O CDIS é caracterizado por lesões neoplásicas epiteliais nos ductos mamários, sem invasão dos tecidos circundantes (Figura 1). O CDIS corresponde a cerca de 20% dos casos de câncer de mama e, geralmente, é assintomático, sendo detectado principalmente por mamografias. Embora tenha potencial de evoluir para um carcinoma invasivo, essa progressão depende de fatores biológicos e da agressividade das lesões, não ocorrendo em todos os casos (Giaquinto et al., 2022; Sathvik et al., 2024).

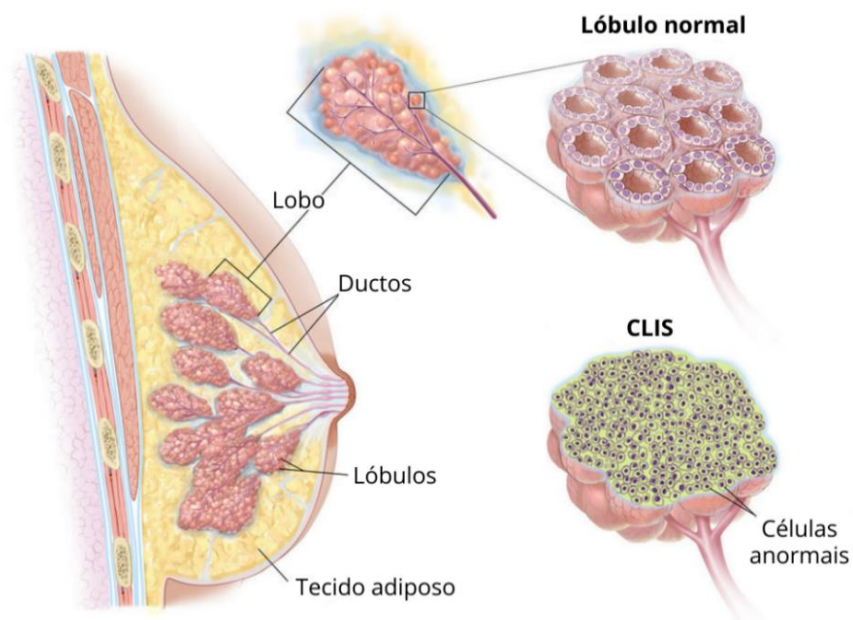
O CLIS é uma alteração nas mamas frequentemente identificada durante uma biópsia. No CLIS, células anormais, com características semelhantes às células cancerígenas, proliferam no revestimento dos lóbulos mamários, estruturas responsáveis pela produção de leite (Figura 1). No entanto, essas células não invadem as paredes dos lóbulos, permanecendo confinadas dentro da estrutura. Embora não seja considerado um câncer invasivo, o CLIS é um marcador de risco, indicando uma maior probabilidade de desenvolvimento de câncer de mama no futuro (Renshaw; Gould, 2016; Sabel; Collins, 2017).

Figura 1: Representação dos tipos de tumores não invasivos.

Carcinoma Ductal In Situ (CDIS)



Carcinoma Lobular In Situ (CLIS)



Fonte: Winslow (2012), com adaptações da autora.

Dentre os cânceres de mama invasivo, o tipo mais comum é o carcinoma invasivo, geralmente classificado como adenocarcinoma. Cerca de 75% dos casos

correspondem ao carcinoma ductal infiltrante (CDI), que se origina nos ductos mamários e invade os tecidos circundantes. Por outro lado, cerca de 10% dos casos são diagnosticados como carcinoma lobular infiltrante (CLI), que tem origem nos lóbulos mamários. Apesar das diferenças na origem celular, ambos os subtipos possuem a capacidade de invadir tecidos adjacentes e disseminar-se para outras partes do corpo, dando origem a metástases (Choi, 2023).

Perou e colaboradores (2000) identificaram quatro subtipos principais de câncer de mama, com base em perfis moleculares distintos: luminal A e luminal B, ambos expressando o receptor de estrogênio (RE); basal-*like* e HER2-enriquecido (caracterizado pela superexpressão do HER2 e ausência de RE). Os tumores que expressam RE e/ou receptor de progesterona (RP) são classificados como positivos para receptores hormonais, enquanto aqueles que não expressam RE, RP ou HER2 são denominados triplo-negativos (TNBC) (Harbeck et al., 2019). Essa classificação molecular melhorou a compreensão da biologia do câncer de mama e possibilitou abordagens terapêuticas personalizadas.

1.2 ABORDAGENS TERAPÊUTICAS

Atualmente, o tratamento do câncer abrange diversas abordagens, incluindo cirurgia, radioterapia, quimioterapia, hormonioterapia, terapia-alvo, imunoterapia, medicina personalizada e transplante de medula óssea (Oncoguia, 2023). A escolha do tratamento mais adequado para cada paciente é baseada em vários fatores, como o tipo celular do tumor, estágio da doença, condições clínicas do paciente, disponibilidade de medicamentos e objetivos do tratamento. Cada abordagem pode ser usada isoladamente ou em combinação, de acordo com as necessidades específicas de cada caso (OPAS, 2020; ACS, 2024).

O tratamento do câncer de mama requer uma abordagem multidisciplinar, que combina terapias loco-regionais, como cirurgia e radioterapia, com terapias sistêmicas. Entre as terapias sistêmicas, destacam-se a terapia hormonal para tumores com receptores hormonais positivos, quimioterapia, terapia anti-HER2 para tumores HER2-positivos, e inibidores da poli(ADP-ribose) polimerase (PARP), para pacientes com mutações nos genes BRCA. O câncer de mama triplo-negativo, que não expressa receptores hormonais nem HER2, corresponde a cerca de 15 a 20 % de todos os casos de câncer de mama e geralmente requer estratégias terapêuticas

específicas, devido à sua agressividade e à menor variedade de alvos terapêuticos disponíveis (Harbeck et al., 2019; Smolarz; Nowak; Romanowicz, 2022).

Embora os tratamentos tenham evoluído significativamente ao longo dos anos e contribuído para um aumento na sobrevida, os pacientes ainda enfrentam desafios significativos. A principal preocupação em relação aos tratamentos oncológicos, é a alta taxa de toxicidade, que afetam além das células cancerígenas, as células saudáveis. Essa falta de precisão, pode limitar a eficácia do tratamento e aumentar a necessidade de doses mais altas, o que por sua vez intensifica os efeitos colaterais adversos (Letai, 2017; Kaur; Bhardwaj; Gupta, 2023).

Os efeitos colaterais do tratamento oncológico são variados e podem incluir sintomas como alopecia, hematomas, hemorragias, anemia, náuseas, diarreia, fadiga, perda de peso, imunossupressão e aumento da vulnerabilidade a infecções, entre outros. Esses sintomas impactam a qualidade de vida dos pacientes, exigindo uma abordagem cuidadosa de suporte e acompanhamento contínuo (Gale, 2024).

A toxicidade cardíaca é um dos efeitos colaterais mais relevantes dos tratamentos adjuvantes para o câncer de mama (Nardin et al., 2020). Em especial, a cardiotoxicidade tardia pode surgir anos após a conclusão do tratamento e está associada principalmente ao uso de antraciclinas e trastuzumabe. Além disso, terapias endócrinas e radioterapia na parede torácica, especialmente no caso de câncer na mama esquerda, também podem contribuir para a toxicidade cardíaca, exigindo acompanhamento contínuo dos pacientes para detecção precoce e manejo adequado desses efeitos (Sledge Jr et al., 2017).

Entre as toxicidades de médio prazo que impactam significativamente a qualidade de vida, o comprometimento da fertilidade é uma das mais importantes, especialmente para pacientes jovens submetidas a terapias adjuvantes sistêmicas (Condorelli et al., 2019). O risco de falência ovariana prematura está principalmente associado ao uso de agentes alquilantes, como a ciclofosfamida. Em comparação, as antraciclinas e os taxanos apresentam um risco intermediário para essa condição (Demeestere et al., 2012).

1.3 PACLITAXEL

O paclitaxel (PTX), representa um dos avanços mais importantes na quimioterapia das últimas duas décadas, por ter sido o primeiro agente identificado capaz de estabilizar microtúbulos. Os microtúbulos são polímeros proteicos longos, em forma de tubo, formados por heterodímeros de α -tubulina e β -tubulina, organizados em estruturas delgadas e tubulares, que desempenham funções essenciais no citoesqueleto. Eles desempenham papéis cruciais em todas as células eucarióticas, incluindo a manutenção da forma celular, o transporte intracelular, a sinalização celular e a divisão celular, especialmente durante a mitose (Sherline; Schiavone, 1977; Jordan; Wilson, 2004).

Sua descoberta revolucionou o tratamento do câncer ao interromper a divisão celular, tornando-se uma ferramenta crucial no combate a diversos tipos de tumores, incluindo câncer de mama, câncer endometrial, câncer de pulmão de células não pequenas, câncer de bexiga e carcinoma cervical. O PTX também é usado como um tratamento de segunda linha, para tratar sarcoma de Kaposi (Abu Samaan et al., 2019; Alqahtani et al., 2019).

O mecanismo de ação do PTX se baseia na ligação aos 31 aminoácidos N-terminais da subunidade β -tubulina nos microtúbulos. Essa interação induz a fosforilação da β -tubulina em células diferenciadas e indiferenciadas, promovendo a estabilização do microtúbulo e aumentando sua polimerização. Como resultado, esse processo culmina na morte celular. A capacidade do PTX de modular a dinâmica dos microtúbulos é um dos principais mecanismos pelos quais ele exerce seus efeitos antitumorais. Essa ação destaca a importância dos microtúbulos na regulação do ciclo celular e apoptose (Abu Samaan et al., 2019).

No tratamento do câncer de mama, o PTX é frequentemente utilizado como terapia de primeira linha devido à sua eficácia no bloqueio da divisão celular. Ainda, pode atuar estabilizando os microtúbulos durante a mitose, impedindo o processo normal de despolimerização, essencial para a finalização da divisão celular. Com isso, as células cancerosas ficam retidas na fase mitótica, levando à morte celular programada (Das et al., 2022; Zenjanab et al., 2024). Além disso, estudos indicam que o PTX pode ter um impacto positivo na modulação da resposta imunológica, influenciando a regulação de quimiocinas, citocinas e células do sistema imunológico (Panis; Pavanelli, 2015; Wanderley et al., 2018).

Apesar da sua eficácia, alguns pacientes desenvolvem resistência ao PTX durante o tratamento do câncer de mama, esse fator representa um grande desafio clínico e é uma das principais causas de falha terapêutica e mortalidade (Abu Samaan et al., 2019). Essa resistência está associada a diversos fatores, incluindo a superexpressão dos transportadores da família ABC, que expulsam o fármaco das células, reduzindo sua eficácia. Outro fator, é a regulação por microRNAs que afetam processos celulares chave, além de alterações em genes específicos relacionados ao controle da mitose. Esses mecanismos permitem que as células cancerígenas se adaptem ao tratamento, desenvolvendo resistência ao tratamento medicamentoso com PTX, comprometendo a eficácia dos taxanos na terapia oncológica (Sudo et al., 2004; Xu et al., 2009; A'Hern et al., 2013; Chen et al., 2018).

Além da resistência terapêutica citada, a eficácia do PTX também é limitada por gerar diversos efeitos colaterais, como reações de hipersensibilidade e neuropatias específicas. As reações de hipersensibilidade estão associadas ao fato de que o PTX precisa ser formulado com um veículo à base de lipídios (óleo de rícino polioxetilado, também conhecido como Cremophor™, e etanol anidro), devido à sua baixa solubilidade em água. Esses solventes melhoram a administração do PTX, mas por estarem associados a efeitos adversos de reações de hipersensibilidade, é necessário o uso de pré-medicações para reduzir os riscos durante o tratamento (Vishnu; Roy, 2011; Yamamoto; Kawano; Iwase, 2011; Ma; Mumper, 2013).

Além disso, o uso do PTX tem sido associado a cardiotoxicidades, como bradiarritmias, taquiarritmias, bloqueios atrioventriculares e de ramo, e até isquemia cardíaca. Acredita-se, que os efeitos cardiotóxicos do PTX estejam relacionados ao Cremophor™, o solvente utilizado em sua formulação, o qual pode hiperestimular os receptores de histamina nas células cardíacas, causando um influxo elevado de histamina e aumentando o risco de toxicidade cardíaca (Rowinsky et al., 1991).

As limitações do PTX, como sua baixa solubilidade, efeitos colaterais significativos, tendência de se acumular em tecidos não tumorais, ressaltam a necessidade de desenvolver métodos mais eficazes para o direcionamento e administração do PTX às células cancerígenas (Feng et al., 2019; Zhang et al., 2019).

Métodos que otimizem a entrega do PTX diretamente às células cancerígenas ou a sua combinação com outros agentes terapêuticos, podem não apenas aumentar sua eficácia, mas também reduzir os efeitos adversos associados à sua toxicidade sistêmica. Diversos estudos, vem demonstrando que estratégias de combinação de agentes quimioterápicos com outros agentes terapêuticos, são eficazes em diversos aspectos da terapia oncológica, podendo melhorar significativamente os resultados clínicos. As combinações terapêuticas, podem potencializar a eficácia terapêutica, reduzir a toxicidade acumulativa, minimizar a resistência ao tratamento, atuar de forma sinérgica, atuando em diferentes vias metabólicas ou moleculares das células, diminuindo a toxicidade dos medicamentos e a inibição do crescimento tumoral, superando em muitos casos, os resultados obtidos com a utilização de um único medicamento (Ma; Waxman, 2008; Zenjanab et al., 2024).

1.4 TOXINA BOTULÍNICA

Estudos recentes e preliminares apresentam a toxina botulínica (BoNT), como um potencial agente terapêutico anticancerígeno. Amplamente conhecida por sua aplicação estética para suavizar rugas, também tem sido explorada em tratamentos médicos, incluindo o tratamento de câncer. Embora a BoNT não seja uma terapia convencional contra o câncer, há pesquisas emergentes sugerindo seu potencial em alguns contextos oncológicos (Safarpour; Tavassoli; Jabbari, 2024).

A BoNT, é produzida pela bactéria anaeróbia Gram-positiva *Clostridium botulinum*, a mesma é composta por sete subtipos antigênicos (A, B, C, D, E, F e G) (Huang; Foster; Rogachefsky, 2000; Eleopra et al., 2004; Barash; Arnon, 2014; Dover et al., 2014). A BoNT consiste em um complexo de protoxinas, composto pela neurotoxina botulínica e diversas proteínas não tóxicas associadas à neurotoxina (NAPs). As NAPs protegem as BoNT do ambiente hostil do trato gastrointestinal e facilitam sua passagem pela barreira epitelial intestinal antes de serem liberadas na circulação sistêmica (Dembek; Smith; Rusnak, 2007; Kutschenko et al., 2019). Devido a essa característica, a ingestão oral dessas toxinas, por meio de alimentos contaminados (intoxicação), causa o botulismo, uma doença grave cujo nome deriva do latim *botulus* (salsicha). Esta condição é caracterizada pela síndrome neuromuscular, que pode ser fatal (Erbguth, 2004).

Atualmente, apenas a toxina botulínica tipo A (BoNT/A), comumente chamada de “Botox”, é aprovada para uso clínico, dado seu perfil clínico relativamente seguro (Frampton; Easthope, 2003). A BoNT/A tem uma ampla gama de indicações terapêuticas, no entanto, a aplicação mais conhecida e utilizada da toxina botulínica é na área estética, onde ela é utilizada para prevenir e reduzir rugas faciais dinâmicas, através do relaxamento muscular. Entretanto, seu uso não se limita a área estética. Nas últimas décadas a BoNT se tornou um forte candidato terapêutico no tratamento de diferentes distúrbios médicos, com base em sua capacidade de inibir a liberação de acetilcolina e neurotransmissores de dor das vesículas pré-sinápticas (Rossetto et al., 2021; Pirazzini; Montecucco; Rossetto, 2022; Safarpour; Jabbari, 2023).

A BoNT, já é considerada como o tratamento de escolha para diversos distúrbios do movimento, como distonia cervical, blefaroespasma, espasmo hemifacial, distúrbios espásticos musculares grandes, enxaqueca, bexiga neurogênica, entre outros (Brin, 2009; Jankovic, 2017; Phan et al., 2021). O mesmo mecanismo anticolinérgico torna as BoNT eficazes para o tratamento da espasticidade, um sintoma comum associado a condições como acidente vascular cerebral, paralisia cerebral e trauma cerebral ou medula espinhal (Brown; Schütz; Simpson, 2014; Safarpour; Jabbari, 2023).

Na área dermatológica é utilizada para hidrocistomas écrinos, poros dilatados, quelóides e cicatrizes hipertróficas, hidradenite supurativa, hiperidrose, hipertrofia do músculo masseter e das glândulas salivares, redução da formação de cicatrizes pós-operatórias (cirurgias mamárias), entre outros (Chen et al., 2020; Alster, 2020; Winayanuwattikun et al., 2023).

Além disso, a terapia com BoNT/A vem sendo estudada e utilizada para o tratamento de uma variedade de problemas associados ao câncer. Como por exemplo, gastroparesia secundária ao tratamento cirúrgico do câncer esofágico local, estenose esofágica pós-cirúrgica e fístula parótida e hiperidrose gustativa que podem se desenvolver após câncer de parótida. Também, vem sendo muito estudada para o tratamento de diferentes tipos de dores associadas ao câncer ou as dores ocasionadas pelos tratamentos medicamentosos, cirúrgicos ou radioativos (Grenda, 2022; Kim; Choi, 2022; Mittal; Jabbari, 2020).

Os efeitos antitumorais da toxina, embora ainda em estágios iniciais de pesquisa, estão associados ao fato de a BoNT/A interferir na sinalização celular,

impactando na proliferação celular. Alguns mecanismos de ação vêm sendo proposto, como: modulação do microambiente tumoral, no qual a toxina pode alterar a atividade do sistema nervoso, afetando a angiogênese e a invasão tumoral, potencialmente reduzindo a propagação do câncer. Além disso, acredita-se que a toxina possa interferir na comunicação entre as células tumorais e o sistema imunológico, promovendo um microambiente que dificulte o crescimento do tumor (Karsenty et al., 2009; Proietti et al., 2012; Bandala et al., 2013; Bandala et al., 2015; Coarfa et al. 2018).

Recentemente, estudos *in vitro* e *in vivo* apontam que a BoNT/A possui potencial terapêutico relevante, demonstrando capacidade de retardar a progressão e o desenvolvimento de células de câncer de mama, próstata, cólon e neuroblastoma por meio de diferentes mecanismos moleculares (Ansiaux et al., 2006, Karsenty et al., 2009; Bandala et al., 2015; He et al., 2016; Rust et al., 2016; Coarfa et al., 2018; Shebl, 2019; Safarpour; Tavassoli; Jabbari, 2024). Essas descobertas sugerem que o BoNT pode ser uma estratégia promissora para tratamentos combinados ou alternativos no combate ao câncer de mama, podendo reduzir os efeitos adversos associados aos tratamentos convencionais e melhorar a eficácia terapêutica. Visto que, o tratamento padrão do câncer de mama frequentemente envolve o uso de quimioterapia com agentes como o PTX, que, apesar de sua eficácia no combate ao tumor, está associado a diversos efeitos colaterais adversos.

Esses efeitos podem comprometer significativamente a qualidade de vida dos pacientes, prejudicando sua adesão ao tratamento e, conseqüentemente, o sucesso terapêutico em longo prazo. Em vista disso, a busca por alternativas terapêuticas que reduzam os efeitos colaterais e melhorem a eficácia do tratamento se torna cada vez mais urgente. Nesse contexto, a BoNT/A surge como uma possível estratégia inovadora. Integrá-la ao tratamento oncológico poderia representar um avanço significativo, não apenas ao melhorar os resultados clínicos, mas também ao proporcionar uma abordagem mais direcionada e menos invasiva, com o potencial de reduzir os efeitos adversos comuns nos tratamentos convencionais. A utilização do BoNT/A no tratamento do câncer de mama poderia, assim, contribuir para a melhoria da qualidade de vida dos pacientes, ao mesmo tempo que amplia as opções terapêuticas, oferecendo uma alternativa promissora no manejo dessa condição desafiadora.

Nesse sentido, o objetivo do presente estudo é avaliar a eficácia anticancerígena da BoNT/A isolada e associada ao PTX, através da análise de viabilidade celular da linhagem celular imortalizada de câncer de mama (4T1). Além disso, comparar os efeitos em linhagem celular imortalizadas de fibroblastos saudáveis (NIH3T3). Este trabalho visa contribuir para uma melhor compreensão dos potenciais efeitos terapêuticos da BoNT/A no tratamento do câncer de mama, bem como para a avaliação de sua seletividade em células cancerígenas em comparação com células saudáveis.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos citotóxicos da BoNT/A isolada e associada ao PTX em linhagem celular imortalizada de câncer de mama (4T1) e em linhagem celular imortalizadas de fibroblastos murinos (NiH3T3).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a eficácia da associação entre a BoNT/A e o fármaco PTX, através de caracterização do potencial zeta;
- Avaliar os efeitos citotóxicos da BoNT/A isolado na linhagem celular de câncer de mama (4T1) e em linhagem celular imortalizadas de fibroblastos murinos (NiH3T3);
- Avaliar os efeitos citotóxicos do PTX isolado na linhagem celular de câncer de mama (4T1) e em linhagem celular imortalizadas de fibroblastos murinos (NiH3T3);
- Avaliar os efeitos citotóxicos da associação entre a BoNT/A com o fármaco PTX na linhagem celular de câncer de mama (4T1) e em linhagem celular imortalizadas de fibroblastos murinos (NiH3T3).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CARACTERIZAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE PTX E BoNT/A

As medições do potencial zeta (ZP) foram realizadas usando um analisador *NanoBrook Omni ZP* (Brookhaven Instruments Corp., EUA) com um laser de diodo vermelho padrão de 40 mW usando a técnica de espalhamento de luz de análise de fase (PALS). A faixa de mobilidade foi entre 1011 e 107 mV, a faixa ZP foi entre -500 e 500 mV e o ângulo de espalhamento foi de 15°. As amostras foram medidas em água Milli-Q e as medições foram conduzidas em triplicata a 20 ± 1 °C (Dal Bó et al., 2014; Micheletto et al., 2015; Dos Santos et al., 2016; Dos Santos et al., 2018).

3.2 LINHAGEM CELULAR

Para realização do presente estudo, foi utilizado linhagem celular imortalizada de câncer de mama murino (BALB/C Fêmeas) (4T1). A escolha da linhagem celular foi baseada no fato de ser uma linhagem caracterizada e amplamente utilizada na literatura científica (Abdel-Ghany et al., 2024; Satam et al., 2024). promovendo comparações e interpretações entre diferentes estudos. A fim de promover comparação dos resultados em células saudáveis, foi utilizado a linhagem celular imortalizada de fibroblastos murinos (NiH3T3), por ser amplamente utilizada como controle em estudos de citotoxicidade de diferentes compostos.

3.3 CULTURA CELULAR

As células (4T1 e NiH3T3) foram cultivadas em garrafas de plástico de 25 cm², com meio *Dulbecco's Eagle Modificado* (DMEM), suplementadas com 10% de soro fetal bovino, Penicilina (100 unidades/mL) e Estreptomicina (100 mg/mL). Para o crescimento e adesão celular, as células foram mantidas em uma estufa umidificada, com atmosfera de 5 % de CO₂ a 37 °C. As trocas de meio foram realizadas em dias alternados, até se obter uma confluência de células viáveis (80 %), para o desenvolvimento dos experimentos *in vitro*. Ao obter a confluência necessária, as células foram tripsinizadas. Para isso foi retirado o DMEM da garrafa

e adicionado 4 mL de tripsina durante 5 min, ou até as células ficarem em suspensão. Em seguida, foi adicionado 4 mL de DMEM completo para neutralizar a tripsina.

Em seguida, foi realizada a contagem do número total de células, na câmara *Neubauer* e realizada a diluição dessas células em meio DMEM na concentração de 10^4 células/poço e plaqueadas em uma placa de cultura de fundo plano de 96 poços. As mesmas foram incubadas por 24 horas em uma incubadora umidificada, com atmosfera de 5 % de CO_2 a 37 °C, a fim de proporcionar a aderência das células na superfície da placa (De Pieri et al., 2024).

Após o período de incubação as células foram tratadas com a BoNT/A isolada, PTX isolado e com a associação entre eles. Para a BoNT/A isolada foi realizado uma curva de concentração (0,5 U/mL, 2,0 U/mL e 6,0 U/mL) no tempo de 24 h e 48 h, para determinar a melhor concentração para associar ao fármaco PTX. Para construir a curva de dose da PTX, foram testadas concentrações de 0,5 µg/mL, 1,0 µg/mL, 5,0 µg/mL, 10 µg/mL, 20 µg/mL e 50 µg/mL. Com base nos resultados obtidos, foram definidas as doses a serem utilizadas em combinação com a BoNT/A na concentração definida.

O tratamento foi realizado de forma idêntica em ambas as linhagens celulares, por um período de 48 h em atmosfera contendo 5 % de CO_2 a 37 °C.

3.4 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR (MTT)

A viabilidade celular, foi avaliada através da redução do brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio (MTT). Ao ser reduzido, o MTT forma cristais de formazan, um sal de coloração roxa e insolúvel em água. Essa reação de redução ocorre nas mitocôndrias das células, fazendo com que a viabilidade celular seja diretamente proporcional à produção dos cristais de formazan (Mosmann, 1983).

Neste estudo, após o tempo de incubação de 48 horas das células com os tratamentos específicos, foi retirado o sobrenadante e 100 µL da solução de MTT (0,5 mg/mL) foi adicionado em cada poço. Na sequência, a placa foi incubada por três horas em uma estufa a 37 °C e 5 % de CO_2 para permitir a reação de formação do formazan.

Após o período de incubação, o sobrenadante celular foi removido e os cristais de formazan foram dissolvidos em 100 µL álcool isopropílico. Por fim, a placa

foi analisada em um leitor de placas por absorvância, no comprimento de onda de 570 nm.

A viabilidade celular foi determinada, através da comparação dos resultados das absorvâncias dos grupos testes, com as absorvâncias do grupo controle incubado apenas com DMEM, ou seja, o grupo que possui apenas células viáveis. Sendo assim, os resultados foram apresentados em porcentagem de viabilidade celular, onde o grupo controle mimetiza 100 % de células vivas (De Pieri et al., 2024).

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas serão realizadas com o *software GraphPad Prism*, versão 9.1.1. A distribuição das variáveis foi avaliada por meio do teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Para as análises de viabilidade celular, foi utilizado ANOVA *one-way*. Os dados serão apresentados como média \pm desvio padrão, considerando valores de $p \leq 0,05$ como estatisticamente significativos. Todos os testes foram realizados em triplicatas, para cada concentração do tratamento e para os controles, sendo repetidas quatro vezes em dias alternados.

4 RESULTADOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE PTX E BoNT/A

A análise do potencial zeta (ZP) foi realizada para avaliar a influência do fármaco BoNT/A na carga superficial da PTX. Os resultados demonstraram uma mudança significativa no ZP das partículas, sugerindo que a interação entre a BoNT/A e o PTX ocasionou à formação de uma camada na superfície do PTX, confirmando o processo de associação.

Os resultados demonstram alterações no ZP do PTX em diferentes concentrações de BoNT/A (Figura 2). Observa-se, que o aumento das concentrações de BoNT/A, ocasionam um aumento nos valores positivos de ZP, sugerindo interações de superfície e eletrostáticas entre o PTX e BoNT/A.

O revestimento do PTX com BoNT/A estabilizou a solução de forma marginal a partir de 1,0 U /mL, e, além dessa concentração não foram observadas mudanças significativas nos valores de ZP com a adição de BoNT/A.

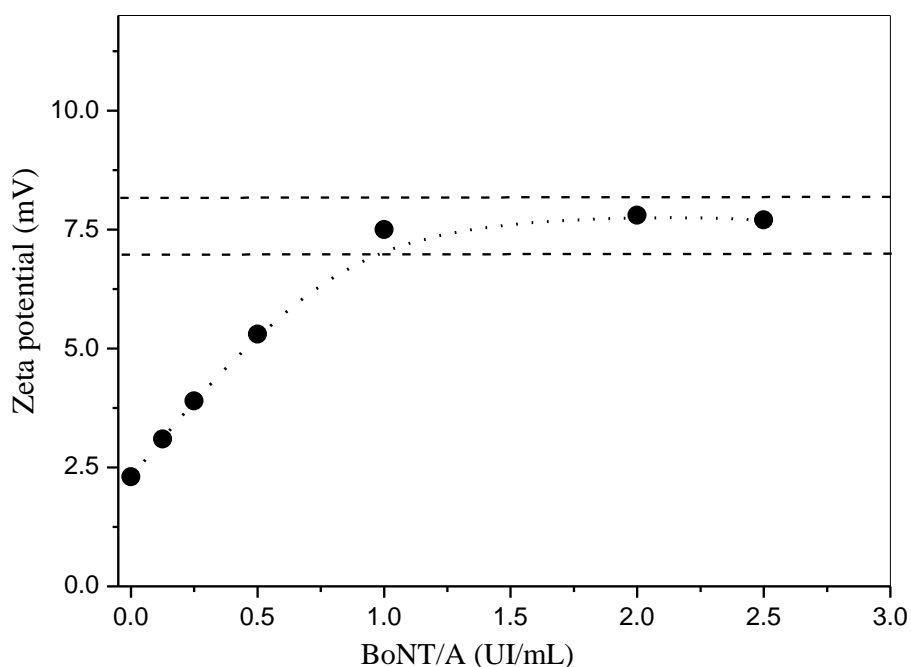


Figura 2: Perfis de potencial zeta do medicamento PTX na ausência e presença de BoNT/A (U/mL).

4.2 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR (MTT)

A viabilidade celular foi avaliada utilizando o ensaio de MTT, que permite a quantificação da viabilidade das células em resposta aos tratamentos avaliados. No presente estudo, foram utilizadas células da linhagem 4T1, um modelo de câncer de mama murino, e fibroblastos NiH3T3, como controle. As linhagens celulares foram expostas aos tratamentos com PTX e BoNT/A, isolados e combinados.

Para determinar a concentração e o tempo de exposição mais adequados para associar a BoNT/A à PTX, foi realizada uma curva de dose e tempo utilizando três concentrações de BoNT/A (0,5; 2,0 e 6,0 U/mL) em dois tempos de exposição diferentes (24 e 48 horas) (Figura 3). Após 24 horas de tratamento, nenhuma das concentrações testadas reduziu significativamente a viabilidade celular, indicando ausência de citotoxicidade (viabilidade > 70%). Contudo, após 48 horas de exposição, a concentração de 6,0 U/mL resultou em uma redução significativa da viabilidade celular, alcançando valores inferiores a 70%.

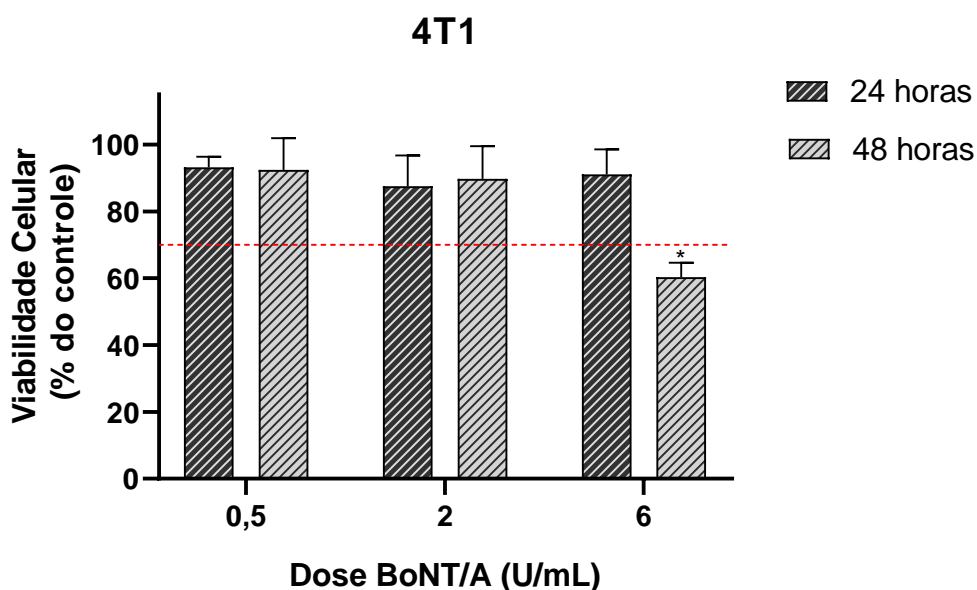


Figura 3: Curva de dose da BoNT/A na viabilidade celular da linhagem 4T1, avaliada pelo ensaio de MTT nos tempos de 24 e 48 horas. Dados expressos como \pm média e desvio padrão, considerando $p \leq 0,05$ como significativo (ANOVA de uma via).

Os efeitos da BoNT/A também foram avaliados em linhagem celular saudável (NiH3T3). Os resultados, representados na Figura 4, demonstram que após 24 horas e 48 horas de exposição ao tratamento, não houve redução significativa na viabilidade celular em nenhuma das concentrações testadas, ou seja,

a viabilidade celular permaneceu superior a 70%, em todas as doses testadas, indicando ausência de citotoxicidade. Esses resultados demonstram a segurança da BoNT/A em células saudáveis, nas condições analisadas.

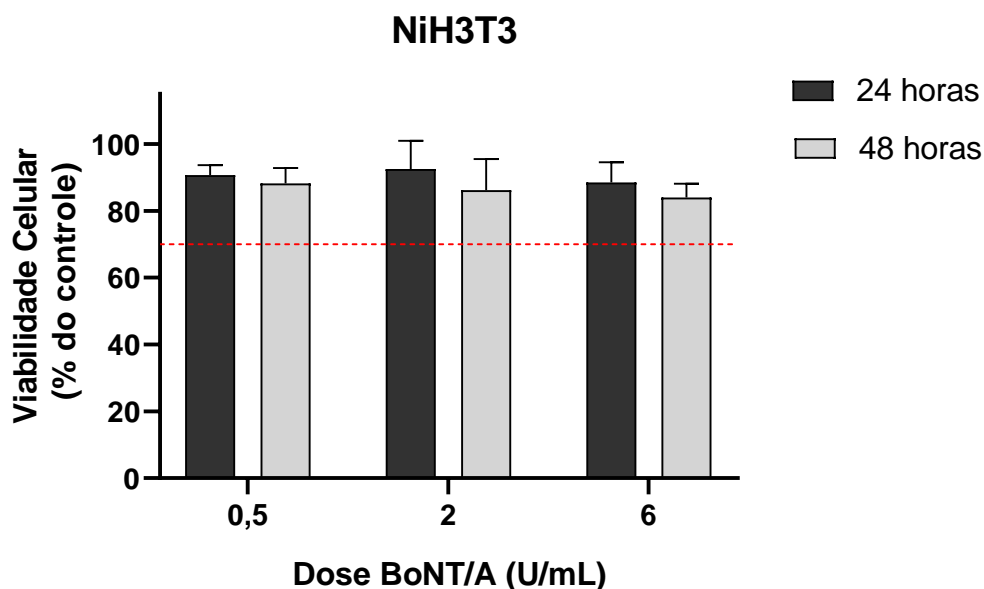


Figura 4: Curva de dose da BoNT/A na viabilidade celular da linhagem NiH3T3, avaliada pelo ensaio de MTT nos tempos de 24 e 48 horas. Dados expressos como \pm média e desvio padrão, considerando $p \leq 0,05$ como significativo (ANOVA de uma via).

Após a definição da dose e do tempo de exposição ideais para a BoNT/A, foi realizada uma curva de dose para determinar as concentrações de PTX a serem utilizadas na associação com a BoNT/A. A Figura 5 apresenta os resultados da curva de dose de PTX em diferentes concentrações (0,5; 1,0; 5,0; 10; 20 e 50 $\mu\text{g/mL}$), avaliados nas células 4T1 e NiH3T3 após 48 horas de exposição. Praticamente todas as doses avaliadas ocasionaram efeito citotóxico (viabilidade celular $< 70\%$) em ambas as linhagens celulares. Entretanto nas concentrações de 5,0 $\mu\text{g/mL}$, 10,0 $\mu\text{g/mL}$ e 20,0 $\mu\text{g/mL}$, o efeito citotóxico foi maior nas células tumorais 4T1, ou seja, houve uma redução significativa na viabilidade celular das células 4T1, em comparação com a viabilidade celular das células NiH3T3. Não foram observadas diferenças estatísticas nas demais concentrações analisadas.

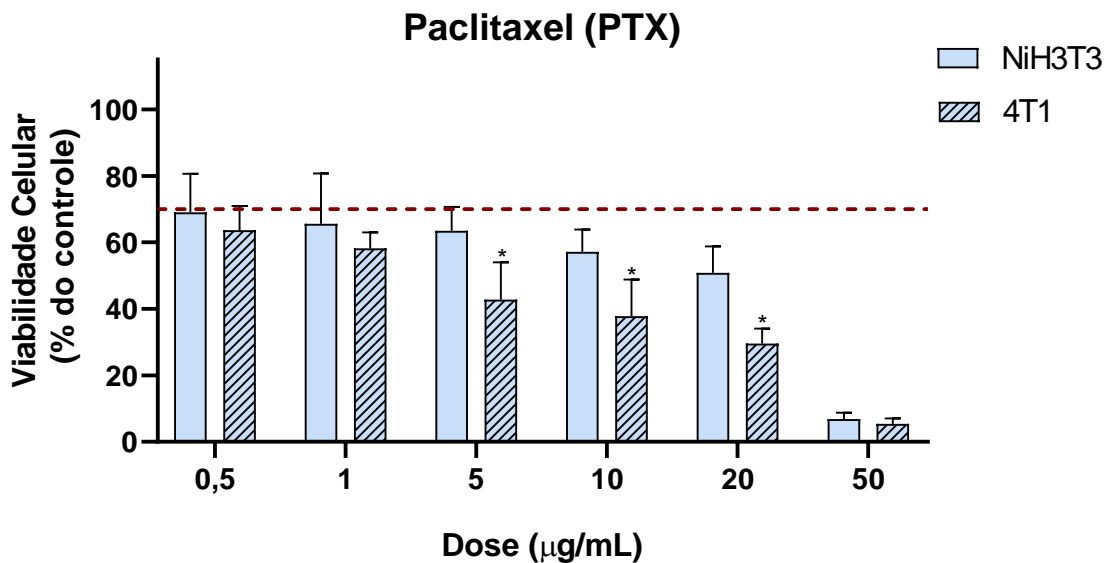


Figura 5: Curva de dose da paclitaxel (PTX) em diferentes concentrações, avaliada pela viabilidade celular por meio do ensaio de MTT nas linhagens 4T1 e NIH3T3. Dados expressos como \pm média e desvio padrão, considerando $p \leq 0,05$ como significativo (ANOVA de uma via).

Após a definição da dose de BoNT/A e das concentrações de PTX para a associação, foram realizados os testes com os tratamentos combinados. Os resultados, apresentados na Figura 6, mostram os efeitos da associação de PTX (0,5; 1; 5; 10 e 20µg/mL) e BoNT/A (6 U/mL) sobre a viabilidade celular das linhagens 4T1 e NiH3T3. Todas as doses da associação avaliadas ocasionaram efeito citotóxico (viabilidade celular < 70%) em ambas as linhagens celulares. Entretanto nas concentrações de 5,0 µg/mL e 10,0 µg/mL foi observada uma redução estatisticamente significativa na viabilidade celular das células 4T1 em comparação às células NiH3T3, demonstrando um potencial citotóxico maior nas células cancerígenas. Além disso, a citotoxicidade da dose de 10,0 µg/mL, se assemelha a citotoxicidade da dose de 5,0 µg/mL, evidenciando que é possível alcançar o mesmo efeito citotóxico com uma dose menor. As demais concentrações não apresentaram diferenças estatísticas significantes.

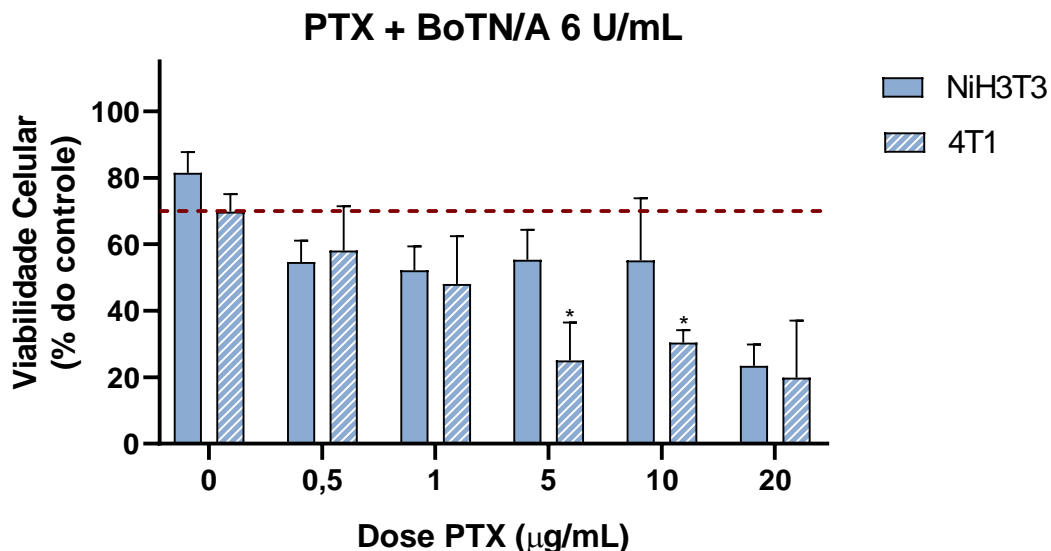


Figura 6: Efeito da combinação de PTX e BoNT/A em diferentes concentrações na viabilidade celular, avaliado pelo ensaio de MTT nas linhagens 4T1 e NIH3T3. Dados expressos como \pm média e desvio padrão, considerando $p \leq 0,05$ como significativo (ANOVA de uma via).

Afim de determinar a dose com melhor efeito citotóxico da associação de PTX com BoNT/A, foi realizado a comparação entre o efeito da dose de PTX isolado, com a mesma dose combinada com BoNT/A. Os resultados obtidos para a linhagem celular 4T1 (Figura 7), indicam uma diferença estatisticamente significativa na concentração de 5 µg/mL, demonstrando que a combinação de PTX e BoNT/A mostrou maior citotoxicidade em comparação ao PTX isolado, destacando o potencial sinérgico dos compostos quando administrados em conjunto.

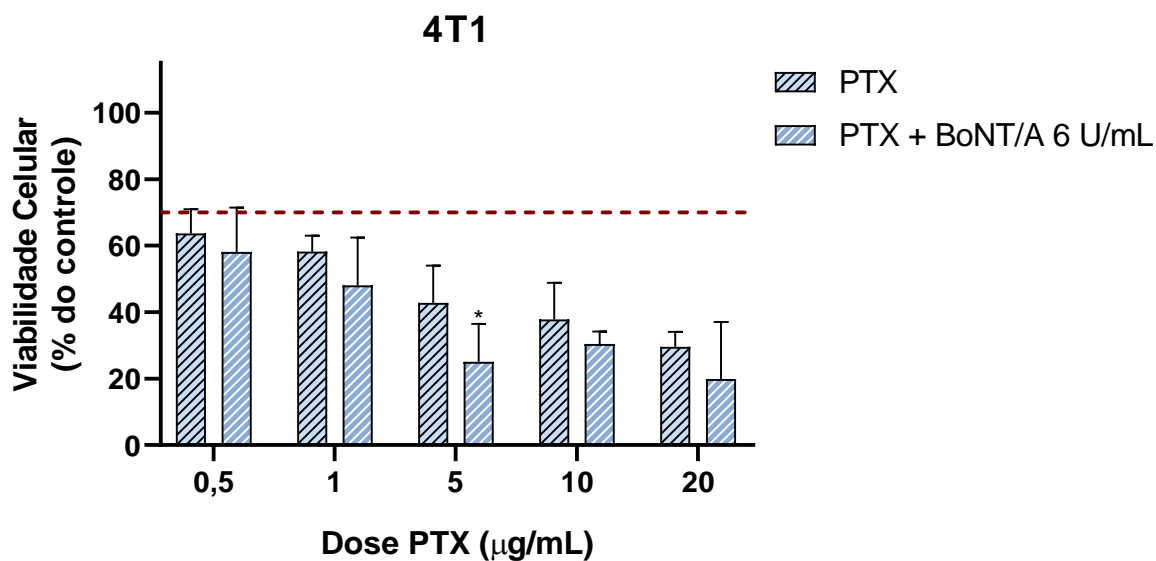


Figura 7: Efeito isolado do PTX e da combinação de PTX com BoNT/A em diferentes concentrações na viabilidade celular, avaliado pelo ensaio de MTT na linhagem 4T1. Dados expressos como \pm média e desvio padrão, considerando $p \leq 0,05$ como significativo (ANOVA de uma via).

A Figura 8 apresenta os efeitos do PTX, administrado isoladamente e em combinação com a BoNT/A, na viabilidade celular da linhagem NIH3T3. No geral, não foram identificadas diferenças estatisticamente significativas entre as doses testadas, exceto na concentração de 20 $\mu\text{g/mL}$. Nessa dose, a combinação do fármaco PTX com a BoNT/A reduziu significativamente a viabilidade celular em comparação ao PTX isolado. Entretanto, vale destacar que os efeitos citotóxicos observados com a dose de 20 $\mu\text{g/mL}$, são equivalentes aos efeitos da dose de 5 $\mu\text{g/mL}$ nas células tumorais 4T1. Isso indica que é possível alcançar o mesmo efeito citotóxico em células cancerígenas utilizando uma dose menor de fármaco, o que torna a dose de 20 $\mu\text{g/mL}$ menos viável para uso terapêutico.

Dessa forma, a dose de 5 $\mu\text{g/mL}$ de PTX associado a BoNT/A, se demonstra como uma alternativa terapêutica, visto que apresentou maior efeito citotóxico em células cancerígenas, mantendo semelhante a viabilidade celular das células saudáveis.

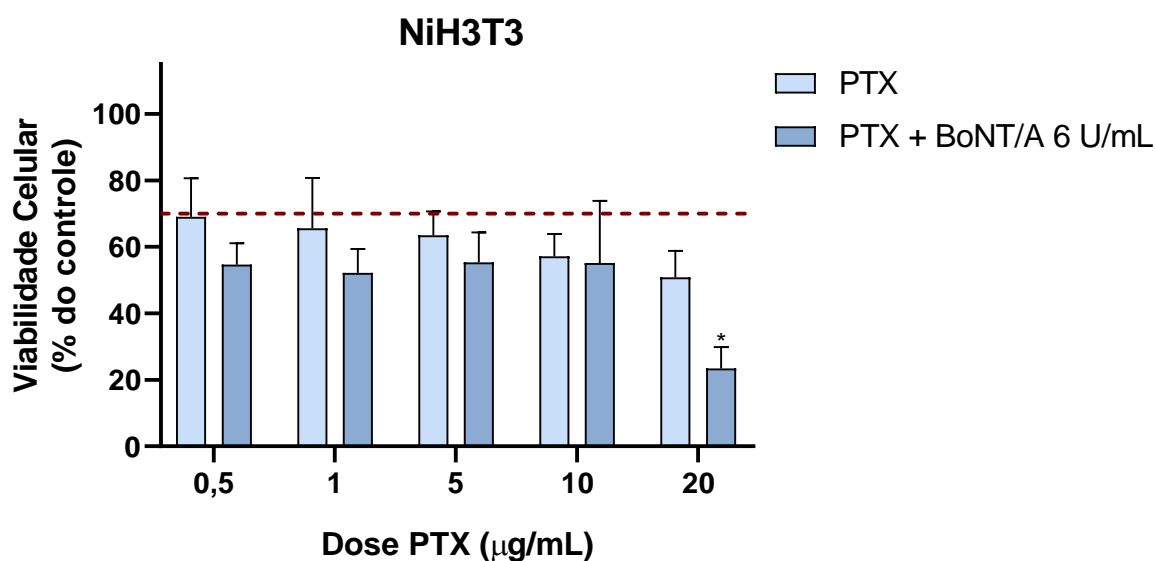


Figura 8: Efeito isolado do PTX e da combinação de PTX com BoNT/A em diferentes concentrações na viabilidade celular, avaliado pelo ensaio de MTT na linhagem NIH3T3. Dados expressos como \pm média e desvio padrão, considerando $p \leq 0,05$ como significativo (ANOVA de uma via).

5 DISCUSSÃO

O câncer de mama é uma das neoplasias mais prevalentes no mundo, sendo uma das principais causas de mortalidade entre as mulheres. O tratamento dessa doença frequentemente se baseia no uso de fármacos quimioterápicos, como o PTX, que é amplamente utilizado devido à sua capacidade de inibir a divisão celular, promovendo a morte de células tumorais (Alqahtani et al., 2019). No entanto, esses tratamentos apresentam limitações importantes, principalmente devido aos efeitos colaterais severos, como neurotoxicidade, fadiga, náuseas e danos a células saudáveis, comprometendo significativamente a qualidade de vida dos pacientes. Nesse contexto, a BoNT/A surge como uma alternativa coadjuvante promissora. Além de potencializar a ação antitumoral do PTX, a BoNT/A apresenta características únicas, como a seletividade por células tumorais, o que contribui para reduzir a toxicidade em tecidos saudáveis (Rust et al., 2016; Shebl, 2019; Akpinar et al., 2019; Demir; Duman; Nariroglu, 2024).

Primeiramente, o presente estudou avaliou a interação do fármaco PTX com a BoNT/A, demonstrando que a interação entre ambos, resultou em uma mudança significativa na carga de superfície das moléculas de PTX. Inicialmente, o ZP do PTX na concentração de 20 µg/mL, na ausência de BoNT/A em água Milli-Q, foi de aproximadamente $2,3 \pm 0,4$ mV. Esse valor de ZP indica uma estabilidade coloidal marginal, o que pode comprometer a eficácia de sistemas terapêuticos devido à maior suscetibilidade à agregação das partículas (Dal Bó et al., 2014; Micheletto et al., 2015; Dos Santos et al., 2016; Dos Santos et al., 2018).

No entanto, ao associar o PTX com a BoNT/A, ocorreu uma alteração no ZP, indicando que a BoNT/A forma uma camada de revestimento ao redor do PTX, contribuindo para a estabilização coloidal marginal das partículas. Esse efeito estabilizador foi evidente a partir da concentração de 1 U/mL de BoNT/A, momento em que não foram observadas alterações adicionais no ZP, mesmo com o aumento da concentração de PTX.

A estabilização coloidal ocasionada pela BoNT/A, desempenha um papel crucial na formulação de sistemas terapêuticos, contribuindo para a uniformidade, estabilidade e funcionalidade das partículas. Evitando a agregação de partículas, e mantendo-as dispersas de maneira homogênea, esse processo garante maior biodisponibilidade do medicamento, melhora sua interação com os tecidos-alvo e

prolonga sua vida útil. Conseqüentemente, a estabilização coloidal facilita o transporte eficiente e a liberação precisa dos fármacos, otimizando a eficácia do tratamento e minimizando os efeitos colaterais (Abelaira et al., 2023; De Oliveira et al., 2024).

Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que a concentração de 6 U/mL de BoNT/A, em um período de 48 horas de exposição, foi eficaz na redução da viabilidade celular da linhagem 4T1, evidenciando o efeito citotóxico da toxina em células neoplásicas. Em contrapartida, a BoNT/A não apresentou efeitos citotóxicos significativos sobre as células normais NiH3T3 em nenhum dos períodos avaliados. Esses achados sugerem uma possível seletividade da BoNT/A para células tumorais, o que representa um avanço importante no desenvolvimento de terapias oncológicas mais direcionadas, capazes de preservar os tecidos saudáveis e reduzir os efeitos colaterais indesejados.

Os dados corroboram com os resultados apresentados por Bandala et al. (2013), que relataram a capacidade citotóxica da BoNT/A em células T47D de câncer de mama, destacando sua maior eficácia em comparação às células normais MCF10A. O estudo demonstrou que doses de 5 U/mL, por 24 horas, foram suficientes para induzir apoptose de forma significativa nas células tumorais. Em continuidade, Bandala et al. (2015) observaram que a BoNT/A também atuou na diminuição da expressão do receptor SV2 em diferentes linhagens de câncer de mama (T47D, MDA-MB-231 e MDA-MB-453), potencializando a apoptose. Esse achado reforça a importância da BoNT/A na regulação de alvos moleculares específicos em células tumorais, como o receptor SV2, o que pode explicar, em parte, sua seletividade observada nos experimentos.

Além do câncer de mama, outros estudos demonstraram a eficácia da BoNT/A em diferentes modelos tumorais. Karsenty et al. (2009) relataram a redução significativa da proliferação de células de câncer de próstata (LNCaP) e o aumento da apoptose em um modelo dose-dependente, com concentrações variando de 0,025 a 0,1 U/mL. De maneira similar, Proietti et al. (2012) observaram que a exposição de células de próstata LNCaP e PC-3 a concentrações de BoNT/A (1 a 10 U/mL) resultou em uma diminuição significativa no crescimento celular após 96 horas de tratamento, com reduções de até 25% na viabilidade celular. Esses estudos reforçam o amplo potencial terapêutico da BoNT/A em diferentes contextos tumorais, destacando sua ação dose-dependente e seletiva.

A variabilidade observada nas doses de BoNT/A empregadas em diferentes estudos pode ser atribuída às características intrínsecas de cada linhagem celular (Purkiss et al., 2001; Cheng et al., 2013; Rust et al., 2016). Fatores como o microambiente tumoral, a densidade de receptores específicos e a sensibilidade das células à toxina influenciam diretamente na resposta ao tratamento. Assim, a seleção da dose ideal para cada tipo celular é essencial para maximizar a eficácia terapêutica e minimizar potenciais efeitos adversos (Karsenty et al., 2009; Proietti et al., 2012). No presente estudo, a concentração de 6 U/mL de BoNT/A mostrou-se ideal para a indução de citotoxicidade em células 4T1, sem comprometer a viabilidade de células não tumorais, indicando uma dose promissora para futuras investigações.

O PTX é amplamente reconhecido como um agente quimioterápico eficaz devido à sua capacidade de induzir citotoxicidade em células tumorais, como as células 4T1. Seu mecanismo de ação, baseado na estabilização dos microtúbulos e no bloqueio da despolimerização necessária para a divisão celular, é central para sua eficácia (Sherline; Schiavone, 1977; Jordan; Wilson, 2004). No entanto, essa característica não é seletiva, o que explica seus efeitos tóxicos em tecidos normais, como observado nas células saudáveis NiH3T3. Essa toxicidade não seletiva representa um desafio significativo na aplicação terapêutica do PTX, uma vez que pode limitar sua eficácia clínica devido aos efeitos adversos associados (Feng et al., 2019; Zhang et al., 2019).

A literatura documenta amplamente o impacto citotóxico abrangente do PTX, sublinhando a urgência de otimizar sua utilização por meio de intervenções inovadoras. Estratégias que busquem preservar sua eficácia antitumoral, ao mesmo tempo em que reduzem os efeitos adversos, são fundamentais para aprimorar seu perfil terapêutico. A revisão de Marupudi et al. (2007) destaca as toxicidades adversas associadas ao uso do PTX, incluindo neuropatia periférica, mielossupressão e toxicidade gastrointestinal, evidenciando os desafios relacionados à sua aplicação clínica. Esses efeitos colaterais reforçam a necessidade de estratégias que não apenas minimizem os danos às células saudáveis, mas também aumentem a especificidade do fármaco.

Nesse contexto, o desenvolvimento de combinações terapêuticas, como a associação do PTX com outros agentes, incluindo a BoNT/A, surge como uma abordagem promissora. A combinação com agentes adjuvantes, como a BoNT/A,

tem o potencial de não apenas mitigar a toxicidade, mas também aumentar a seletividade do tratamento, ampliando as possibilidades de sua aplicação clínica com maior segurança e eficácia (Hajighasemlou et al., 2015).

O presente estudo inovou ao avaliar a combinação de PTX e BoNT/A em células tumorais (4T1) e saudáveis (NiH3T3). Os resultados indicaram que a associação, especialmente na concentração de 5 µg/mL, reduziu significativamente a viabilidade celular das células tumorais, enquanto preservou a viabilidade das células saudáveis. Este achado sugere um efeito sinérgico entre PTX e BoNT/A, com um perfil de segurança aprimorado em comparação ao uso isolado de PTX. A dose de 20 µg/mL, apesar de promover maior citotoxicidade em células tumorais, apresentou menor seletividade, destacando a importância de identificar concentrações otimizadas para maximizar a eficácia antitumoral com impacto mínimo em células saudáveis.

Estudos anteriores corroboram com esses achados. Hajighasemlou et al. (2015) demonstraram que a combinação de BoNT/A com Herceptin melhorou a eficácia antitumoral em células de câncer de mama SK-BR-3 e BT-474, enquanto Demir, Duman e Nariroglu (2024) relataram que a associação entre BoNT/A e oxaliplatina aumentou significativamente a apoptose em células de câncer colorretal (HT-29). Esses estudos reforçam o papel da BoNT/A como um adjuvante terapêutico, capaz de potencializar os efeitos de diferentes quimioterápicos, promovendo maior eficácia em células tumorais resistentes.

Além disso, evidências sugerem que a BoNT/A pode melhorar a resposta terapêutica de agentes antitumorais através de mecanismos como a sensibilização das células tumorais e o aumento da perfusão tumoral. Ansiaux et al. (2006) observaram que a administração local de BoNT/A aumentou a oxigenação do tumor, potencializando os efeitos da radioterapia e da quimioterapia, enquanto Yao et al. (2023) demonstraram o benefício da BoNT/A em combinação com tratamentos a laser, reduzindo significativamente a gravidade de siringomas e a necessidade de sessões terapêuticas.

No presente estudo, a capacidade da BoNT/A de preservar células saudáveis NiH3T3, quando associada ao PTX, reforça sua potencial seletividade como adjuvante. Embora os mecanismos pelos quais a BoNT/A potencializa os efeitos quimioterápicos ainda não estejam completamente elucidados, estudos

apontam para sua influência na remodelação vascular tumoral, permitindo melhor penetração dos tratamentos (Ansiaux et al., 2006).

Esses achados sublinham a relevância do desenvolvimento de terapias combinadas envolvendo BoNT/A e quimioterápicos como PTX, visando maximizar a eficácia terapêutica enquanto minimiza os efeitos colaterais. A combinação de BoNT/A com PTX, particularmente em doses otimizadas como 5 µg/mL, apresenta um perfil terapêutico promissor, abrindo novas perspectivas para tratamentos mais direcionados e menos tóxicos no combate ao câncer. Estudos futuros devem explorar os mecanismos moleculares envolvidos na sinergia entre BoNT/A e agentes quimioterápicos, além de validar a eficácia dessa abordagem em modelos *in vivo* e em ensaios clínicos.

6 CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo destacam o potencial promissor da BoNT/A como terapia adjuvante no tratamento do câncer, evidenciando seus efeitos citotóxicos seletivos em células tumorais, com preservação significativa da viabilidade de células saudáveis. O PTX, utilizado isoladamente, como já é sabido, também demonstrou eficácia na redução da viabilidade de células cancerígenas; no entanto, seus efeitos colaterais e alta toxicidade em doses elevadas podem limitar sua aplicação clínica. Nesse contexto, a associação entre PTX e BoNT/A revelou-se promissora, combinando a eficácia do PTX com a seletividade da BoNT/A. Essa combinação não apenas potencializou os efeitos antitumorais em células 4T1, mas também apresentou um perfil de segurança aprimorado, com menor impacto em células saudáveis.

Esses achados sugerem que a associação do PTX e a BoNT/A pode oferecer uma estratégia terapêutica mais eficaz e segura, contribuindo para o desenvolvimento de abordagens inovadoras no tratamento do câncer. Contudo, são necessários estudos adicionais para elucidar os mecanismos moleculares envolvidos e validar o potencial clínico dessa combinação.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-GHANY, Shaimaa et al. Trastuzumab Induces Apoptosis and Cell Cycle Arrest in Triple-Negative Breast Cancer, Suggesting Repurposing Potential. *Breast Cancer: Basic and Clinical Research*, v. 18, p. 11782234241285411, 2024.
- ABELAIRA, H. M. et al. Sertraline associated with gold nanoparticles reduce cellular toxicity and induce sex-specific responses in behavior and neuroinflammation biomarkers in a mouse model of anxiety. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 233, p. 173661, 2023.
- ABU SAMAAN, Tala M. et al. Paclitaxel's mechanistic and clinical effects on breast cancer. *Biomolecules*, v. 9, n. 12, p. 789, 2019.
- ACS, American Cancer Society Oncogenes, Tumor Suppressor Genes, and DNA Repair Genes. 2022. Disponível em: <https://www.cancer.org/cancer/understanding-cancer/genes-and-cancer/oncogenes-tumor-suppressor-genes.html> Acesso em: 14 out de 2024
- ACS, American Cancer Society. Gene Changes and Cancer. 2022. Disponível em: <https://www.cancer.org/cancer/understanding-cancer/genes-and-cancer/gene-changes.html>. Acesso em: 14 out de 2024
- ACS, American Cancer Society. Treatment Types. 2024. Disponível em: <https://www.cancer.org/cancer/managing-cancer/treatment-types.html>. Acesso em: 14 out de 2024
- A'HERN, Roger P. et al. Taxane benefit in breast cancer—a role for grade and chromosomal stability. *Nature reviews Clinical oncology*, v. 10, n. 6, p. 357-364, 2013.
- AKPINAR, Orhan et al. Clostridium botulinum neurotoxin A induces apoptosis and mitochondrial oxidative stress via activation of TRPM2 channel signaling pathway in neuroblastoma and glioblastoma tumor cells. *Journal of Receptors and Signal Transduction*, v. 40, n. 6, p. 620-632, 2020.
- ALQAHTANI, Fulwah Yahya et al. Paclitaxel. *Profiles of drug substances, excipients, and related methodology*, v. 44, p. 205-238, 2019.
- ALSTER, Tina S.; HARRISON, Iris S. Alternative clinical indications of botulinum toxin. *American journal of clinical dermatology*, v. 21, n. 6, p. 855-880, 2020.
- ANSIAUX, R.√© ginald et al. Botulinum toxin potentiates cancer radiotherapy and chemotherapy. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, v. 12, n. 4, p. 1276-1283, 2006.
- BANDALA, C. et al. Botulinum neurotoxin type A inhibits synaptic vesicle 2 expression in breast cancer cell lines. *International journal of clinical and experimental pathology*, v. 8, n. 7, p. 8411, 2015.

- BANDALA, Cindy et al. Effect of botulinum toxin A on proliferation and apoptosis in the T47D breast cancer cell line. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, v. 14, n. 2, p. 891-894, 2013.
- BARASH, Jason R.; ARNON, Stephen S. A novel strain of Clostridium botulinum that produces type B and type H botulinum toxins. *The Journal of infectious diseases*, v. 209, n. 2, p. 183-191, 2014.
- BRAY, Freddie et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, v. 74, n. 3, p. 229-263, 2024.
- BRIN, Mitchell F. Development of future indications for BOTOX®. *Toxicon*, v. 54, n. 5, p. 668-674, 2009.
- BROWN, E. Alexandra; SCHÜTZ, Sonja G.; SIMPSON, David M. Botulinum toxin for neuropathic pain and spasticity: an overview. *Pain Management*, v. 4, n. 2, p. 129-151, 2014.
- CHEN, Junqing et al. Downregulation of miR-200c-3p contributes to the resistance of breast cancer cells to paclitaxel by targeting SOX2. *Oncology reports*, v. 40, n. 6, p. 3821-3829, 2018.
- CHEN, Sen et al. Local injection of botulinum toxin type A to prevent postoperative scar. *Journal of Craniofacial Surgery*, v. 31, n. 2, p. 440-443, 2020.
- CHENG, Yuan-Tso et al. OnobotulinumtoxinA has no effects on growth of LNCaP and PC3 human prostate cancer cells. *LUTS: Lower Urinary Tract Symptoms*, v. 5, n. 3, p. 168-172, 2013.
- CHOI, Lydia. Câncer de mama. 2023, Manual MSD. Disponível em: <https://www.msdmanuals.com/pt/profissional/ginecologia-e-obstetr%C3%ADcia/c%C3%A2ncer-de-mama/c%C3%A2ncer-de-mama>. Acesso em: 20 out de 2024
- COARFA, Christian et al. Influence of the neural microenvironment on prostate cancer. *The Prostate*, v. 78, n. 2, p. 128-139, 2018.
- CONDORELLI, Margherita et al. Fertility, sexuality and cancer in young adult women. *Current opinion in oncology*, v. 31, n. 4, p. 259-267, 2019.
- DAL BO, Alexandre G. et al. Synthesis, micellization and lectin binding of new glycosurfactants. *Carbohydrate research*, v. 397, p. 31-36, 2014.
- DAS, Tuyelee et al. An update on paclitaxel treatment in breast cancer. *Paclitaxel*, p. 287-308, 2022.
- DE OLIVEIRA, Maria Eduarda et al. Accuracy improvement enzyme-linked immunosorbent assay using superparamagnetic/polyethylene glycol) nanoparticles for leishmaniasis diagnostic. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 109, n. 3, p. 116326, 2024.

DE-PIERI, Ellen et al. DAP1-2: um peptídeo sintético que tem como alvo o receptor IL-1R1 suprime efetivamente IL-1 β in vitro. *Immunologic Research*, p. 1-9, 2024.

DEMBEK, Zygmunt F.; SMITH, Leonard A.; RUSNAK, Janice M. Botulism: cause, effects, diagnosis, clinical and laboratory identification, and treatment modalities. *Disaster medicine and public health preparedness*, v. 1, n. 2, p. 122-134, 2007.

DEMEESTERE, Isabelle et al. Multiple approaches for individualized fertility protective therapy in cancer patients. *Obstetrics and Gynecology International*, v. 2012, n. 1, p. 961232, 2012.

DEMIR, Sıdıka; DUMAN, İpek; NAZIROĞLU, Mustafa. Synergic actions of botulinum neurotoxin A and oxaliplatin on colorectal tumour cell death through the upregulation of TRPM2 channel-mediated oxidative stress. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, v. 51, n. 4, p. e13844, 2024.

DOS SANTOS, Marinalva Cardoso et al. Elucidating Bauhinia variegata lectin/phosphatidylcholine interactions in lectin-containing liposomes. *Journal of colloid and interface science*, v. 519, p. 232-241, 2018.

DOS SANTOS, Marinalva Cardoso et al. Self-assembled carbohydrate-based vesicles for lectin targeting. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 148, p. 12-18, 2016.

DOVER, Nir et al. Molecular characterization of a novel botulinum neurotoxin type H gene. *The Journal of infectious diseases*, v. 209, n. 2, p. 192-202, 2014.

ELEOPRA, Roberto et al. Different types of botulinum toxin in humans. *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society*, v. 19, n. S8, p. S53-S59, 2004.

ERBGUTH, Frank J. Historical notes on botulism, Clostridium botulinum, botulinum toxin, and the idea of the therapeutic use of the toxin. *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society*, v. 19, n. S8, p. S2-S6, 2004.

FENG, Zhang-Qi et al. Magnetic Janus particles as a multifunctional drug delivery system for paclitaxel in efficient cancer treatment. *Materials Science and Engineering: C*, v. 104, p. 110001, 2019.

FRAMPTON, James E.; EASTHOPE, Stephanie E. Botulinum Toxin A (Botox® Cosmetic) a review of its use in the treatment of glabellar frown lines. *American journal of clinical dermatology*, v. 4, p. 709-725, 2003.

GALE, Robert Peter. Princípios do tratamento do câncer. 2024, Manual MSD. Disponível em:

<https://www.msmanuals.com/pt/casa/c%C3%A2ncer/preven%C3%A7%C3%A3o-e-tratamento-do-c%C3%A2ncer/princ%C3%ADpios-do-tratamento-do-c%C3%A2ncer>.

Acesso em: 22 out de 2024

GIAQUINTO, Angela N. et al. Breast cancer statistics, 2022. *CA: a cancer journal for clinicians*, v. 72, n. 6, p. 524-541, 2022.

GREINDA, Tomasz et al. Botulinum toxin in cancer therapy—current perspectives and limitations. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 106, n. 2, p. 485-495, 2022.

HAIJIGHASEMLOU, Saieh et al. Preparation of immunotoxin herceptin-botulinum and killing effects on two breast cancer cell lines. *Asian Pacific journal of cancer prevention*, v. 16, n. 14, p. 5977-5981, 2015.

HARBECK, Nadia et al. Breast cancer. *Nature reviews Disease primers*, v. 5, n. 1, p. 66, 2019.

HE, Dandan et al. Biologic effect of neurogenesis in pancreatic cancer. *Human pathology*, v. 52, p. 182-189, 2016.

HIAE, Hospital Israelita Albert Einstein. Carcinoma in situ: entenda o que é. 2023. Disponível em: <https://vidasaudavel.einstein.br/carcinoma-in-situ-entenda-o-que-e/> Acesso em: 22 out de 2024

HUANG, Wilber; FOSTER, Jill A.; ROGACHEFSKY, Arlene S. Pharmacology of botulinum toxin. *Journal of the American academy of dermatology*, v. 43, n. 2, p. 249-259, 2000.

INCA, Instituto Nacional de Câncer. A situação do câncer de mama no Brasil: síntese de dados dos sistemas de informação. 2019, Rio de Janeiro. Disponível em: https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//a_situacao_do_cancer_de_mama_no_brasil.pdf Acesso em: 21 out de 2024.

INCA, Instituto Nacional de Câncer. Causas e prevenção do câncer. 2024. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/causas-e-prevencao-do-cancer>. Acesso em: 10 out de 2024

INCA, Instituto Nacional de Câncer. Como surge o câncer? 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/como-surge-o-cancer> Acesso em: 01 out de 2024

INCA, Instituto Nacional de Câncer. Dados e números sobre câncer de mama: relatório anual 2023. 2023, Rio de Janeiro. Disponível em: https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//relatorio_dados-e-numeros-ca-mama-2023.pdf Acesso em: 21 out de 2024

INCA, Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2023: incidência do Câncer no Brasil. 2022, Rio de Janeiro. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-2023.pdf> Acesso em: 21 out de 2024.

INCA, Instituto Nacional de Câncer. O que causa o câncer? 2023. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/causas-e-prevencao-do-cancer/o-que-cause-o-cancer>. Acesso em: 01 out de 2024

INCA, Instituto Nacional de Câncer. O que é câncer? 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/o-que-e-cancer>. Acesso em: 30 set de 2024

INCA, Instituto Nacional do Câncer. Controle do Câncer de Mama no Brasil: Dados e Números 2024. 2024, Rio de Janeiro. Disponível em: <https://ninho.inca.gov.br/jspui/bitstream/123456789/17002/1/Controle%20do%20c%3%a2ncer%20de%20mamano%20Brasil%20-%20dados%20e%20n%3%bameros%202024.pdf> Acesso em: 21 out de 2024.

JANKOVIC, Joseph. Botulinum toxin: State of the art. *Movement Disorders*, v. 32, n. 8, p. 1131-1138, 2017.

JORDAN, Mary Ann; WILSON, Leslie. Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nature reviews cancer*, v. 4, n. 4, p. 253-265, 2004.

KARSENTY, Gilles et al. Botulinum toxin type A inhibits the growth of LNCaP human prostate cancer cells in vitro and in vivo. *The Prostate*, v. 69, n. 11, p. 1143-1150, 2009.

KAUR, Rasanpreet; BHARDWAJ, Alok; GUPTA, Saurabh. Cancer treatment therapies: traditional to modern approaches to combat cancers. *Molecular biology reports*, v. 50, n. 11, p. 9663-9676, 2023.

KIM, Se Il; CHOI, YongMin. Botulinum toxin injection for intractable pain in cancer patients with psoas muscle invasion. *Journal of Pain and Symptom Management*, v. 63, n. 4, p. e441-e444, 2022.

KUTSCHENKO, Anna et al. The role of human serum albumin and neurotoxin associated proteins in the formulation of BoNT/A products. *Toxicon*, v. 168, p. 158-163, 2019.

LETAI, Anthony. Functional precision cancer medicine—moving beyond pure genomics. *Nature medicine*, v. 23, n. 9, p. 1028-1035, 2017.

MA, Jie; WAXMAN, David J. Combination of antiangiogenesis with chemotherapy for more effective cancer treatment. *Molecular cancer therapeutics*, v. 7, n. 12, p. 3670-3684, 2008.

MA, Ping; MUMPER, Russell J. Paclitaxel nano-delivery systems: a comprehensive review. *Journal of nanomedicine & nanotechnology*, v. 4, n. 2, p. 1000164, 2013.

MARUPUDI, Neena I. et al. Paclitaxel: a review of adverse toxicities and novel delivery strategies. *Expert opinion on drug safety*, v. 6, n. 5, p. 609-621, 2007.

MICHELETTO, Yasmine Miguel Serafini et al. Investigation of self-association between new glycosurfactant N-acetyl- β -d-glucosaminyl-PEG-docosanate and soybean phosphatidylcholine into vesicles. *Colloids and surfaces A: physicochemical and engineering aspects*, v. 467, p. 166-172, 2015.

MITTAL, Shivam O.; JABBARI, Bahman. Botulinum neurotoxins and cancer—A review of the literature. *Toxins*, v. 12, n. 1, p. 32, 2020.

MOSMANN, Tim. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

NARDIN, Simone et al. Breast cancer survivorship, quality of life, and late toxicities. *Frontiers in oncology*, v. 10, p. 864, 2020.

NCI, National Cancer Institute. What Is Cancer? 2021. Disponível em: <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer> Acesso em: 18 out de 2024

NCI, National Cancer Institute. Age and Cancer Risk. 2021. Disponível em: <https://www.cancer.gov/about-cancer/causes-prevention/risk/age>. Acesso em: 01 out de 2024

NCI, National Cancer Institute. Risk Factors for Cancer. 2015. Disponível em: <https://www.cancer.gov/about-cancer/causes-prevention/risk>. Acesso em: 01 out de 2024

OMS, Organização Mundial da Saúde. Câncer. 2022. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>. Acesso em: 09 out de 2024

OMS, Organização Mundial da Saúde. Global cancer burden growing, amidst mounting need for services. 2024. Disponível em: <https://www.who.int/news/item/01-02-2024-global-cancer-burden-growing--amidst-mounting-need-for-services>. Acesso em: 09 out de 2024

ONCOGUIA. O câncer. 2017. Disponível em: <http://www.oncoguia.org.br/conteudo/cancer/12/1/>. Acesso em: 30 set de 2024

ONCOGUIA. Tratamentos do câncer. 2023. Disponível em: <https://www.oncoguia.org.br/conteudo/tratamentos/77/50/> Acesso em: 20 out de 2024

OPAS, Organização Pan-Americana da Saúde. Câncer. 2020. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/topicos/cancer>. Acesso em: 14 out de 2024

PANIS, Carolina; PAVANELLI, Wander Rogério. Cytokines as mediators of pain-related process in breast cancer. *Mediators of inflammation*, v. 2015, n. 1, p. 129034, 2015.

PEROU, Charles M. et al. Molecular portraits of human breast tumours. *nature*, v. 406, n. 6797, p. 747-752, 2000.

PFIZER. Câncer de mama. 2019. Disponível em: <https://www.pfizer.com.br/sua-saude/oncologia/cancer-de-mama>. Acesso em 22 out de 2024

- PHAN, Kevin et al. Emerging off-label esthetic uses of botulinum toxin in dermatology. *Dermatologic Therapy*, v. 35, n. 1, p. e15205, 2022.
- PIRAZZINI, Marco; MONTECUCCO, Cesare; ROSSETTO, Ornella. Toxicology and pharmacology of botulinum and tetanus neurotoxins: an update. *Archives of Toxicology*, v. 96, n. 6, p. 1521-1539, 2022.
- PROIETTI, Silvia et al. Attivita della tossina botulinica A in linee cellulari di cancro prostatico. *Urologia*, v. 79, n. 2, p. 135-41, 2012.
- PURKISS, John R. et al. Clostridium botulinum neurotoxins act with a wide range of potencies on SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Neurotoxicology*, v. 22, n. 4, p. 447-453, 2001.
- RENSHAW, Andrew A.; GOULD, Edwin W. Long term clinical follow-up of atypical ductal hyperplasia and lobular carcinoma in situ in breast core needle biopsies. *Pathology*, v. 48, n. 1, p. 25-29, 2016.
- ROSSETTO, O. et al. Botulinum neurotoxins: mechanism of action. *Botulinum Toxin Therapy*, p. 35-47, 2021.
- ROWINSKY, Eric K. et al. Cardiac disturbances during the administration of taxol. *Journal of Clinical Oncology*, v. 9, n. 9, p. 1704-1712, 1991.
- RUST, Aleksander et al. Botulinum neurotoxin type C protease induces apoptosis in differentiated human neuroblastoma cells. *Oncotarget*, v. 7, n. 22, p. 33220, 2016.
- SABEL, Michael S.; COLLINS, Laura C. Atypia and lobular carcinoma in situ: high risk lesions of the breast. *UptoDate*, 2017.
- SAFARPOUR, Delaram; JABBARI, Bahman. Botulinum Toxin Treatment for Cancer-Related Disorders: A Systematic Review. *Toxins*, v. 15, n. 12, p. 689, 2023.
- SAFARPOUR, Delaram; TAVASSOLI, Fattaneh A.; JABBARI, Bahman. The Potential Therapeutic Effects of Botulinum Neurotoxins on Neoplastic Cells: A Comprehensive Review of In Vitro and In Vivo Studies. *Toxins*, v. 16, n. 8, p. 355, 2024.
- SATAM, Sharvari et al. Sirtinol, a SIRT1 inhibitor, inhibits the EMT and metastasis of 4T1 breast cancer cells and impacts the tumor microenvironment. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, v. 46, n. 6, p. 829-842, 2024.
- SATHVIK, Guttikonda et al. Spectrum of Ductal Carcinoma In Situ (DCIS) Lesions of the Breast: From Morphology to Molecular Characteristics. *Cureus*, v. 16, n. 9, 2024.
- SHEBL, Rania Ibrahim. Anti-cancer potential of captopril and botulinum toxin type-A and associated p53 gene apoptotic stimulating activity. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR*, v. 18, n. 4, p. 1967, 2019.

SHERLINE, Peter; SCHIAVONE, Karen. Immunofluorescence localization of proteins of high molecular weight along intracellular microtubules. *Science*, v. 198, n. 4321, p. 1038-1040, 1977.

SLEDGE JR, George W. et al. MONARCH 2: abemaciclib in combination with fulvestrant in women with HR+/HER2- advanced breast cancer who had progressed while receiving endocrine therapy. *Journal of clinical oncology*, v. 35, n. 25, p. 2875-2884, 2017.

SMOLARZ, Beata; NOWAK, Anna Zdrożna; ROMANOWICZ, Hanna. Breast cancer—epidemiology, classification, pathogenesis and treatment (review of literature). *Cancers*, v. 14, n. 10, p. 2569, 2022.

SUDO, Tamotsu et al. Dependência da sensibilidade ao paclitaxel em um checkpoint de montagem do fuso funcional. *Cancer research*, v. 64, n. 7, p. 2502-2508, 2004.

VISHNU, Prakash; ROY, Vivek. Safety and efficacy of nab-paclitaxel in the treatment of patients with breast cancer. *Breast Cancer: Basic and Clinical Research*, v. 5, p. BCBCR. S5857, 2011.

WANDERLEY, Carlos W. et al. Paclitaxel reduces tumor growth by reprogramming tumor-associated macrophages to an M1 profile in a TLR4-dependent manner. *Cancer research*, v. 78, n. 20, p. 5891-5900, 2018.

WINAYANUWATTIKUN, Waranaree et al. Efficacy of botulinum toxin type a for prevention of post-mastectomy scar in transmen: a prospective, randomized study. *Toxins*, v. 15, n. 11, p. 636, 2023.

WINSLOW, Terese. Medical and scientific illustration. 2012. Disponível em: <https://www.teresewinslow.com/#/breast/> Acesso em: 21 out de 2024

XU, Rui et al. Enhancement of paclitaxel-induced apoptosis by inhibition of mitogen-activated protein kinase pathway in colon cancer cells. *Anticancer research*, v. 29, n. 1, p. 261-270, 2009.

YAMAMOTO, Yutaka; KAWANO, Ichiro; IWASE, Hirotaka. Nab-paclitaxel for the treatment of breast cancer: efficacy, safety, and approval. *OncoTargets and therapy*, p. 123-136, 2011.

YAO, Bin et al. Er: YAG laser combined with botulinum toxin A for patients with local syringomas: A preliminary report. *Journal of Cosmetic Dermatology*, v. 22, n. 10, p. 2721-2728, 2023.

ZENJANAB, Masoumeh Kaveh et al. Paclitaxel for breast cancer therapy: A review on effective drug combination modalities and nano drug delivery platforms. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, p. 105567, 2024.

ZENJANAB, Masoumeh Kaveh et al. Niosomes containing paclitaxel and gold nanoparticles with different coating agents for efficient chemo/photothermal therapy of breast cancer. *Biomedical Materials*, v. 19, n. 3, p. 035015, 2024.

ZHANG, Qibo et al. Construction and in vitro and in vivo evaluation of folic acid-modified nanostructured lipid carriers loaded with paclitaxel and chlorin e6. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 569, p. 118595, 2019.