

# Caracterização do modelo de xenotransplante gerado em zebrafish a partir de linhagens de células de tumores ósseos

**Palavras-Chave:** Osteossarcoma, Zebrafish, Xenotransplante

**Autores(as):**

Vitória Alves da Silva, Larissa Mariano (Coautora), Ester Fernandes Martins dos Santos (Coautora), **Instituto de Biologia – UNICAMP**

**Orientador(a):**

**Dr<sup>(a)</sup>.** Maraysa de Melo Oliveira Stein, Laboratório Zebrafish - **Centro de Pesquisa Boldrini**

---

## INTRODUÇÃO

O câncer pediátrico é uma doença rara que acomete crianças e adolescentes entre 0 e 19 anos e corresponde a cerca de 3% dos casos de cânceres em relação aos tumores de adultos. Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), as estimativas sugerem 7.930 novos casos, no Brasil entre 2023 e 2025, representando um risco estimado de 134,81 novos casos por milhão de crianças e adolescentes (INCA, 2022). Apesar da alta taxa de sobrevivência ser em alguns países desenvolvidos até mais que 80%, eles ainda representam a primeira causa de morte pediátrica (INCA, 2022).

No Centro Infantil Boldrini em Campinas-SP, referência no tratamento de cânceres pediátricos, já foram recebidos 9502 casos desde a sua fundação em 1978, destes 3864 novos casos (40,67%) foram recebidos no período de 2008 a 2021. No início, entre os anos de 1978 e 1987 a taxa de sobrevivência era de 47,14%, aumentando para 77,25% ao fim de 2021. Esses valores demonstram os avanços no tratamento e cuidado com o paciente (dados obtidos do Serviço de Arquivo Médico e Estatístico do Boldrini).

Entre os cânceres infantojuvenis os tumores ósseos representam de 4 a 8% dos casos. Entre seus tipos pode se encontrar: o Osteossarcoma com 50% de incidência, o Sarcoma de Ewing, com 40% e o Condrossarcoma, tumor raro na pediatria (WARD et al., 2014; PFISTER et al., 2022). O osteossarcoma (OS) é o tumor ósseo mais prevalente na população infantojuvenil, representando 3 a 5% de todos os tumores dessa faixa etária (INCA, 2022), sendo diagnosticado principalmente em meninos durante a puberdade (AZEVEDO et al., 2020). Uma parte significativa dos diagnósticos, cerca de 10 a 20%, vem atrelado a metástase pulmonar, um grande desafio para o tratamento, uma vez que 70 a 80% dos casos vão a óbito dentro de 5 anos após o diagnóstico (BIELACK et al., 2002; HARTING et al., 2006; AHMED et al., 2019).

Esses tumores têm impacto significativo na saúde pública devido à sua incidência em populações jovens, o que pode levar a longos períodos de tratamento e reabilitação, além de afetar a qualidade de vida dos pacientes e suas famílias. Esse tipo de tumor apresenta uma alta complexidade genética, dificultando o tratamento e consequentemente a cura. O tratamento geralmente envolve uma combinação de cirurgia, quimioterapia e, em

alguns casos, radioterapia. A complexidade do tratamento requer uma abordagem multidisciplinar e pode ter efeitos colaterais significativos. Além disso, por ser raro, a busca por novas abordagens terapêuticas ainda é um desafio. Entender como se dá o processo de desenvolvimento tumoral *in vivo* é importante para o desenvolvimento de novos medicamentos e o delineamento de melhores tratamentos sendo então capaz de prever o tratamento mais adequado para cada tipo de tumor e indivíduo.

Os modelos animais são ferramentas valiosas para compreensão da biologia de doenças como o câncer e nas formulações de tratamento e prognóstico personalizados para o paciente (KORINEK, 2020). Os camundongos são considerados padrão ouro em estudos de xenotransplante de células tumorais. Entretanto, devido a algumas limitações tais como custos altos e o longo tempo de reprodução, o modelo Zebrafish (*Danio rerio*) vem ganhando destaque. Este modelo apresenta como vantagens: (1) embriões transparentes, permitindo a observação direta do comportamento das células tumorais; (2) alto número de prole, fornecendo um número amostral grande para pesquisas, especialmente para testes toxicológicos e teste de eficácia de drogas; (3) baixo custo de manutenção; (4) rápido desenvolvimento; (5) absorvem facilmente moléculas que são dissolvidas em água, permitindo testagens de medicamentos; e (6) conservação significativa dos genes e das vias de sinalização comparado com humanos, sendo cerca de 70% dos seus genes homólogos (CAGAN, ZON & WHITE, 2019; FAZIO ET AL., 2020). Com esse modelo em evidência, muitos trabalhos o utilizam para injeções de células tumorais a fim de acompanhar o desenvolvimento dessas células, desvendar a progressão tumoral, migração e principalmente o ambiente tumoral (CABEZAS-SÁINZ et al., 2020).

Dessa forma o objetivo do projeto é caracterizar morfológicamente do modelo de xenotransplante de células de osteossarcoma em larvas de zebrafish. Caracterizar, por histologia (HE, imunofluorescência e imunohistoquímica), os tumores formados em larvas de zebrafish injetadas com células de osteossarcoma da linhagem MG63 e HOS.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Para o desenvolvimento da pesquisa foram utilizados peixes zebrafish (*Danio rerio*) das linhagens AB, TU e a linhagem transgênica tg(Fli:GFP) que expressam a proteína fluorescente verde nas células endoteliais cardiovasculares. Esses animais vivem em condições controladas de salinidade, temperatura e pH, além de serem alimentados 4 vezes ao dia. Os peixes são colocados para cruzamento e seus ovos coletados e mantidos a 28°C. Com cerca de 48 horas após a fecundação (hpf), é possível executar as microinjeções com células tumorigênicas, técnica também chamada de xenotransplante. Para a realização dos xenotransplantes foram usadas as linhagens celulares MG-63 e HOS, cultivadas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma-Aldrich), com 10% de soro fetal bovino (SFB) com adição de Penicilina-Estreptomicina 1%.

Primeiramente, os embriões com 48hpf são retirados do córion, processo que pode ser realizado manualmente ou com ação da enzima pronase. Após esse procedimento são anestesiados com tricaina (*Tricaine, 3-amino benzoic acid ethyl ester also called ethyl 3-aminobenzoate*) de 0,168 mg/mL por 5 a 10 minutos e então alinhados em uma placa de petri com fundo de agarose 1,5% afim de facilitar a microinjeção das células. As injeções são realizadas com uma microagulha de capilar de vidro conectadas ao microinjetor *Pneumatic Picopump PV830*

(World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA) e em cada larva são injetadas aproximadamente 250 células, variando de acordo com as características de cada linhagem, entre elas a agressividade. As células são depositadas no PVS (Espaço Perivitelínico). Após as injeções os peixes são mantidos a 34°C, temperatura que mantém vivas tanto as células quanto as larvas e durante os 4 dias que sucedem a injeção elas são acompanhadas, para verificar padrões de tamanho e crescimento de tumores, além de mortalidade dos peixes xenotransplantados.

Após este período, as larvas com tumores são fixadas de acordo com a análise a ser realizada. Neste trabalho são utilizados dois tipos principais de análise: a histologia e a imunofluorescência (IF). Para a histologia as larvas são fixadas em formalina e processadas em séries crescentes de etanol, xilol, parafina e inclusão em blocos de parafina; enquanto para as imunofluorescências, elas são fixadas em paraformoldeído 4% e depois de 24hrs são transferidas para o metanol 100%, onde ficam estocadas até o início do protocolo de imunofluorescência com duração de 3 dias.

Na histologia serão realizadas a coloração de Hematoxilina e Eosina (HE), a fim de verificar morfologia dos tumores formados e Imunohistoquímica (IHC), utilizando o anticorpo Ki-67 humano, que irá marcar apenas células humanas em proliferação. As imagens das lâminas serão adquiridas em Microscópio Leica DM750 (Leica DM750 Phase Microscope with ICC50W Camera Module, 5.0 Megapixels). Já com a técnica de IF, foram usados os anticorpos para mitocôndria humana, caspase e vimentina, após o protocolo, as imagens foram adquiridas através do Microscópio (Zeiss LSM 880 confocal). Ao fim das aquisições será possível traçar o perfil tumoral das células HOS e MG-63. Além das análises de HE, IHC e IF, foi calculado a taxa de mortalidade o sucesso no processo de formação do tumor através das fórmulas:

$$\text{Taxa de Mortalidade 4 dpi} = \frac{[\text{total de larvas mortas com 4 dpi}] \times 100\%}{[\text{total larvas vivas e com tumor PVS 1 dpi}]}$$

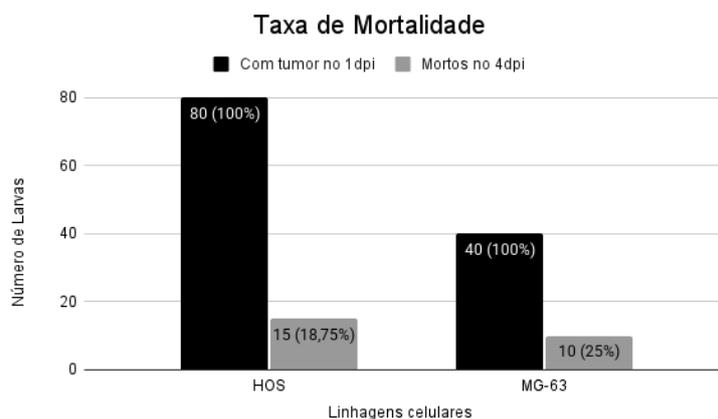
$$\text{Tumor no PVS 4 dpi} = \frac{[\text{total de larvas com tumor no PVS com 4 dpi}] \times 100\%}{[\text{total de larvas com tumor PVS 1 dpi}]}$$

## RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Devido ao projeto ter iniciado no primeiro semestre de 2025, o processamento das amostras e consequentemente as análises dos resultados ainda estão em andamento, entretanto com os experimentos realizados até o momento já é possível prever o comportamento das taxas de mortalidade e implantação do tumor, no PVS.

Até o momento foram realizados 6 xenotransplantes para linhagem HOS e sua taxa de mortalidade foi de 18,75% para as larvas injetadas ao fim de 4 dias pós injeção. Já para MG-63, foram realizados 4 xenotransplantes e obteve-se a taxa de mortalidade de 25%. Os dados das larvas, podem ser observados no **Gráfico 1**.

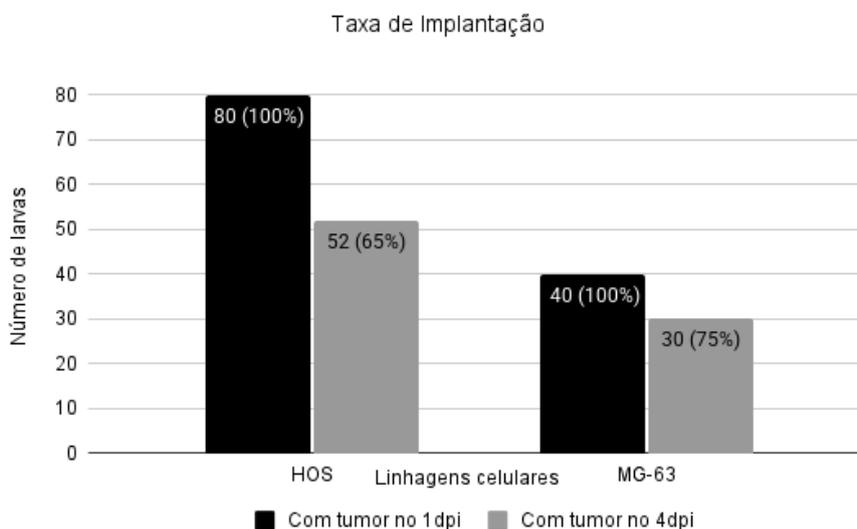
**Gráfico 1.** Taxa de mortalidade das larvas com 4 dias pós injeção (dpi).



**Gráfico 1.** A barra em preto representa o número de larvas total e com tumor no PVS no 4 dpi e a barra em cinza representa o número de larvas mortas com 4 dpi, contendo também o valor em porcentagem.

Já no **Gráfico 2**, pode ser encontrada a taxa de implantação representada pela barra preta. Ela leva em consideração o número de larvas com tumor no 1dpi e o número de larvas com tumor no 4dpi. A linhagem MG-63 teve maior taxa implantação do tumor, sendo 75% comparado com os 65% da HOS, apesar de ser necessário análises estatísticas para dizer se há diferença significativa entre as duas linhagens, esses dados demonstram que esses tipos celulares podem ser eficientes para o estudo de tumores ósseos a partir do xenotransplante em zebrafish, especialmente a linhagem MG-63.

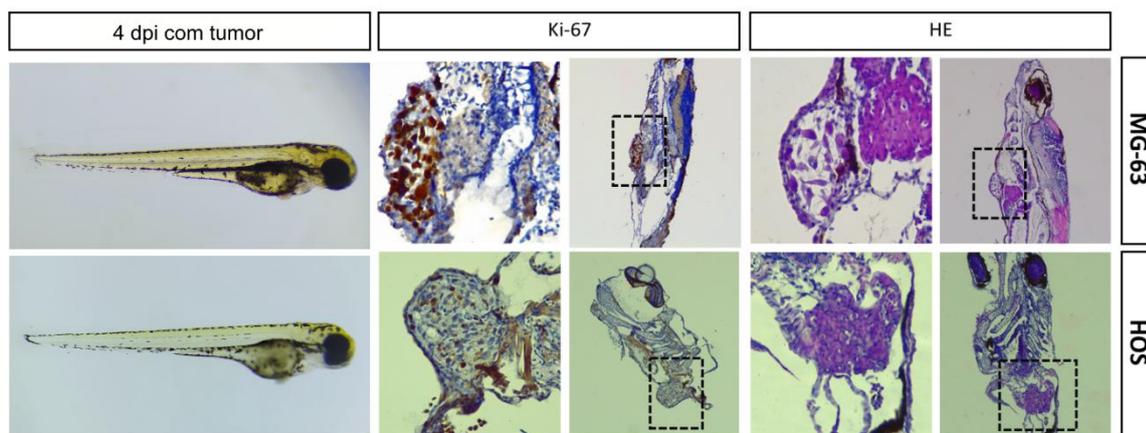
**Gráfico 2.** Taxa de Implantação das linhagens tumorais no quarto dia pós injeção (4 dpi).



**Gráfico 2.** A barra em preto representa o número de larvas com tumor no PVS com 1dpi e em cinza o número de larvas que estão vivas e com tumor no 4dpi.

Dados preliminares do laboratório reunimos na **Figura 1**, trazem indícios sobre futuros achados. Diante dessas imagens, é possível notar que as células da linhagem HOS são menores do que as da MG63 e tiveram melhor desenvolvimento tumoral no zebrafish, formando tumores maiores e mais compactos. Através da imunohistoquímica para Ki-67 observou-se que tanto a MG-63 quanto a HOS apresentam proliferação tumoral, mas os dados sugerem que as células MG63 tem uma capacidade proliferativa maior.

**Figura 1.** Imagens representativas de larvas de zebrafish (4 dpi) de cada uma das linhagens que apresentaram tumor e que não apresentaram tumor e das colorações de HE e IHC.



**Figura 1.** Na figura estão representadas, larvas injetadas com MG-63 e HOS, coradas com Hematoxilina e Eosina (HE); larvas que passaram por Imunohistoquímica (IHC), marcadas com Ki-67; e larvas com tumor no 4dpi em campo claro.

## CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos pode-se inferir que as linhagens MG-63 e HOS, com taxas de implantação entre 75 e 100% e de mortalidade entre de 27,5% e 43,75%, respectivamente são promissoras para o sucesso da implementação do tumor em zebrafish e sobrevivência dos peixes. Entretanto é necessário concluir o processamento de HE, IHC e IF das larvas que já foram injetadas, fazer a aquisição de imagens e analisá-las estatisticamente.

Neste sentido, podemos perceber que há inúmeras abordagens e técnicas empregadas para tornar o zebrafish um modelo de estudo do câncer pediátrico. Entretanto, o uso do zebrafish para o estudo do câncer pediátrico ainda é recente, mas já se mostra um modelo promissor para futuras descobertas que ajudem a prevenir e melhorar prognósticos de cânceres pediátricos.

## BIBLIOGRAFIA

- Azevedo JWV, de Medeiros Fernandes TAA, Fernandes JV Jr, et al. Biology and pathogenesis of human osteosarcoma. *Oncol Lett.* 2020;19(2):1099–1116. doi:10.3892/ol.2019.11229
- Ahmed AU, Li H, Cao Y, Xiang S, Wang B, Lu C. Zebrafish as a model system for studying pediatric bone tumors and drug screening. *Genes.* 2019;10(11):935. doi:10.3390/genes10110935
- Bielack SS, Kempf-Bielack B, Delling G, et al. Prognostic factors in high-grade osteosarcoma of the extremities or trunk: an analysis of 1,702 patients treated on neoadjuvant cooperative osteosarcoma study group protocols. *J Clin Oncol.* 2002;20(3):776–90. doi:10.1200/JCO.2002.20.3.776
- Cabezas-Sáinz P, Pensado-López A, Sáinz B Jr, Sánchez L. Modeling cancer using zebrafish xenografts: drawbacks for mimicking the human microenvironment. *Cells.* 2020;9(9):1978. doi:10.3390/cells9091978
- Cagan RL, Zon LI, White RM. Modeling cancer with flies and fish. *Dev Cell.* 2019;49(3):317–24. doi:10.1016/j.devcel.2019.04.013
- Fazio M, Ablain J, Chuan Y, Langenau DM, Zon LI. Zebrafish patient avatars in cancer biology and precision cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2020;20(5):263–73. doi:10.1038/s41568-020-0252-3
- Harting MT, Blakely ML, Jaffe N, et al. Long-term survival after aggressive resection of pulmonary metastases among children and adolescents with osteosarcoma. *J Pediatr Surg.* 2006;41(1):194–9. doi:10.1016/j.jpedsurg.2005.10.089
- Instituto Nacional de Câncer (Brasil). Estimativa 2023: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA; 2022.
- Pfister SM, Koelsche C, Berger AK, et al. A summary of the inaugural WHO classification of pediatric tumors: transitioning from the optical into the molecular era. *Cancer Discov.* 2022;12(2):331–55. doi:10.1158/2159-8290.CD-21-1295
- Ward E, DeSantis C, Robbins A, Kohler B, Jemal A. Childhood and adolescent cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin.* 2014;64(2):83–103. doi:10.3322/caac.21219