



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(ª). 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).

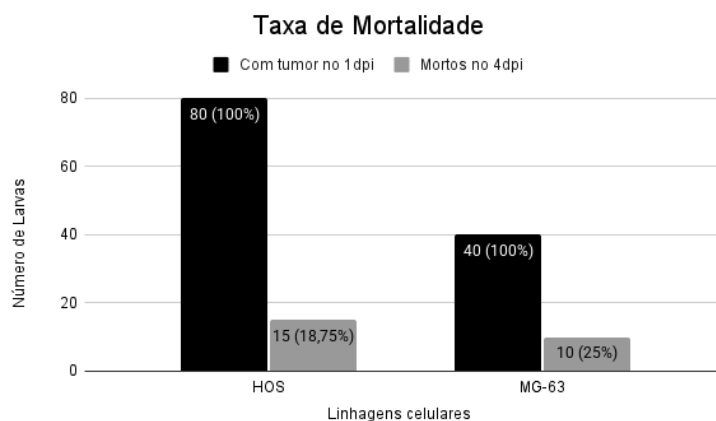


Gráfico 1. A barra em preto representa o número de larvas total e com tumor no PVS no 4 dpi e a barra em cinza representa o número de larvas mortas com 4 dpi, contendo também o valor em porcentagem.

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).

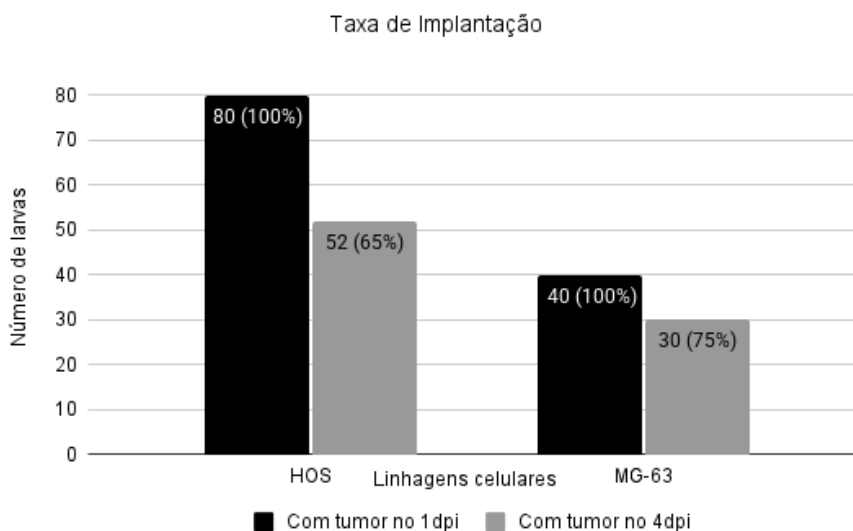


Gráfico 2. A barra em preto representa o número de larvas com tumor no PVS com 1dpi e em cinza o número de larvas que estão vivas e com tumor no 4dpi.

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.

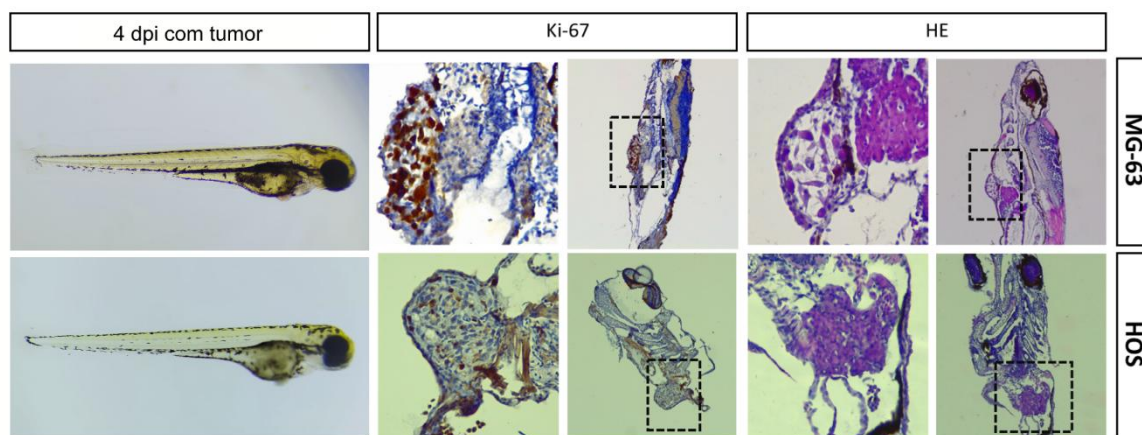


Figura 1. Na figura estão representadas, larvas injetadas com MG-63 e HOS, coradas com Hematoxilina e Eosina (HE); larvas que passaram por Imunohistoquímica (IHC), marcadas com Ki-67; e larvas com tumor no 4dpi em campo claro.

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