

PADRONIZAÇÃO DE INDUÇÃO DE GLIOBLASTOMA POR CIRURGIA ESTEREOTÁXICA EM MODELO MURINO

Palavras-Chave: GLIOBLASTOMA, 5-ALA, MODELO MURINO XENOGRÁFICO.

Autores/as:

THAYNÁ FERNANDA FONSECA [Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP]

AMANDA PIRES BONFANTI [Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP]

GIOVANA DA COSTA VENANCIO [Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP]

NATÁLIA BARRETO DOS SANTOS [Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP]

JOÃO LUIZ VITORINO-ARAUJO [Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo]

Prof.ª Dr.ª CATARINA RAPOSO DIAS CARNEIRO (Orientadora) [UNICAMP].

INTRODUÇÃO:

Gliomas de alto grau de malignidade, como o glioblastoma (grau IV), são tumores de crescimento rápido, altamente infiltrantes e agressivos. Essas neoplasias se caracterizam por possuírem prognóstico desfavorável, tendo os pacientes uma sobrevida média em torno de 15 meses após o diagnóstico (Modrek et al., 2014; Weller et al., 2014).

O grau de ressecção cirúrgica para esses tumores representa, até o momento, o principal fator prognóstico (Lacroix et al., 2001; Sanai et al., 2011). A cirurgia guiada por fluorescência para gliomas malignos utilizando o ácido 5-aminolevulínico (5-ALA), se tornou padrão-ouro em diversos países durante o tratamento dessas neoplasias. O 5-ALA age produzindo realce vermelho-rosado (630 nm) quando submetido à excitação pela luz azul (405 nm), permitindo auxiliar o neurocirurgião na ressecção de gliomas de alto grau (III e IV), uma vez que permite uma melhor distinção do tumor em relação ao tecido cerebral saudável a olho nu, possibilitando maior extensão da ressecção e aumento de sobrevivência livre de progressão tumoral (Guyotat et al., 2016; Zhao et al., 2012; Stummer et al., 2011).

Apesar de ser um método utilizado em países da Europa e nos Estados Unidos, o custo do procedimento é inacessível para boa parte da população brasileira, principalmente para os pacientes do Sistema Único de Saúde (SUS), uma vez que o produto é importado e de alto custo. Alternativas que permitam tornar acessível a utilização do procedimento para esses pacientes mostram-se como opções interessantes para aprimorar o tratamento desses tumores. Nesse sentido, visando contribuir com o desenvolvimento de um composto de baixo custo da molécula do 5-ALA - sintetizado durante o desenvolvimento de projeto de pesquisa em paralelo na Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF) da Unicamp, o presente estudo teve como objetivo a padronização e desenvolvimento de técnica de indução de glioblastoma humano (NG97) no córtex cerebral de modelos murinos através de cirurgia

esterotáxica, a fim de avaliar o crescimento e desenvolvimento do tumor nesses modelos. A padronização da técnica de indução de glioblastoma em modelos murinos permitirá a realização de estudos de análise e segurança do 5-ALA sintetizado. Espera-se, com o presente estudo, padronizar modelos que possam contribuir com o desenvolvimento de um composto da molécula do 5-ALA que possa ser acessível e viável aos pacientes do SUS, visando melhor seu prognóstico e sua qualidade de vida.

METODOLOGIA:

Os ensaios de padronização da técnica em modelo xenográfico foram realizados em três fêmeas adultas (8 a 10 semanas de idade) de camundongos RAG^{-/-} (B6.129S7-Rag1tm1Mom), utilizando células tumorais da linhagem de glioblastoma humano NG97, mantidas e cultivadas em IMDM (*Iscove's Modified Dulbecco's Medium*) contendo 10% de soro fetal bovino, 50 mg/ml de L-glutamina, Penicilina e Estreptomicina (Gibco Inc., Billings, MT, USA), em estufa a 37 °C contendo 5% de CO₂. Após o cultivo, foram feitas alíquotas de 1x10⁵ células em 2 µL de PBS estéril para serem injetadas por cirurgia esterotáxica no córtex frontal na região motora M1/M12 em cada animal (Kramp & Camphausen, 2012), conforme descrito abaixo.

Previamente ao procedimento cirúrgico, os animais foram anestesiados com quetamina e xilazina (80 e 10 mg/kg, respectivamente), em solução administrada via intraperitoneal (150 µl em cada animal), promovendo uma duração do efeito anestésico de aproximadamente 20 minutos. Após a constatação da ação do efeito do anestésico por meio de conferência de sinais reflexos (aperto da pata e movimento das vibrissas – pelos sensoriais), foi

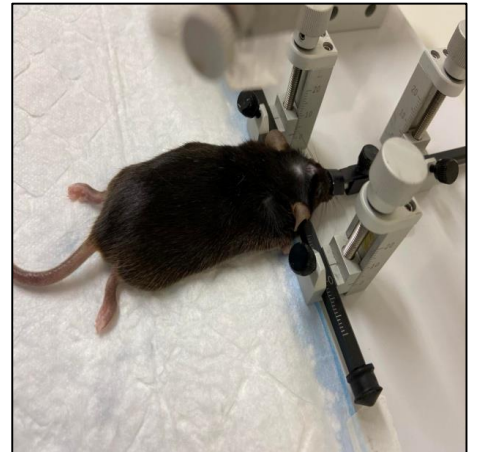


Figura 1 - Posicionamento do camundongo no esterotáxico. Fonte: própria.

realizada a tricotomia dos pelos da cabeça do animal com a utilização de um bisturi. Na sequência, o animal foi posicionado no estereotáxico (previamente ajustado conforme coordenadas: antero-posterior 0,63 mm; latero-lateral 2 mm; dorsoventral 2,2 mm (Paxinos & Franklin, 2001), em decúbito ventral, por meio de barras intra-auriculares e dos dentes incisivos inferiores, como mostra a Figura 1.

Durante o procedimento cirúrgico, o peróxido de hidrogênio foi utilizado para remoção do perióstio e exposição do crânio do animal. Também foi administrado solução salina nos olhos dos animais para evitar lesão ocular. Na sequência, foi realizada a trepanação da calota óssea para a passagem da agulha e, com uma microseringa Hamilton, foi injetado 1 µl da suspensão de células tumorais (NG97) e cronometrado 1 minuto. Após, foi feita a elevação da agulha 0,2 mm e foi injetado mais 1 µl (cronometrando mais 1 minuto) antes de fechar a incisão (Ferry & Gervasoni, 2021). O fechamento da região cirúrgica foi realizado com a administração de pequena quantidade de cola adesiva à base de etil-cianocrilato (Super Bonder) (Saska and Hochuli-Vieira, 2009). Também foi administrado aos animais, via intraperitoneal, durante 3 dias, o analgésico opioide Tramadol (5mg/kg em

100 µl, a cada 24 horas). Após o procedimento cirúrgico, os animais foram acompanhados diariamente durante 26 dias e os seguintes parâmetros foram observados: sinais de dor, alterações no peso, consumo de alimento e mortalidade do animal. O desenvolvimento e crescimento do tumor também foi avaliado após dissecação cerebral. Os animais foram mantidos juntos em uma mesma gaiola para evitar estresse adicional, uma vez que já estavam juntos desde o nascimento. A pesagem e a administração da ração foram realizadas para todos os animais no mesmo dia e horário. O protocolo experimental seguiu os princípios do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UNICAMP; 5758-1/2021).

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Os três animais foram acompanhados diariamente durante 26 dias após a inoculação das células tumorais. O animal 1 seguiu sem alterações significativas observáveis durante os primeiros dias após a inoculação das células tumorais. No 16º dia, foi possível observar a presença de sinais de dor: posição encolhida com pelos arrepiados, pouco movimento e olhos entreabertos. Apresentou também, perda de 500 gramas de peso corporal da inoculação, vindo à óbito no 17º dia; seu cérebro foi dissecado para avaliar se o tumor foi desenvolvido. O animal 2 apresentou convulsões e perda de 1,5 gramas de peso corporal no 22º dia, sendo imediatamente eutanasiado e seu cérebro dissecado; também apresentou dois tumores desenvolvidos na pele. O animal 3 não apresentou nenhum sinal clínico durante todo o período e, no 26º dia, foi eutanasiado e seu cérebro dissecado. O consumo total de ração pelos três animais até o 15º dia foi de 10 g/dia, em média 3,3 g/animal. No 16º dia, caiu para 7 g/dia (2,3 g/animal em média). O peso dos animais 1 e 2 se manteve até o dia em que começaram a apresentar os sinais clínicos.

Após a dissecação do cérebro dos animais, a presença/ausência do desenvolvimento de tumor foi avaliada. É importante ressaltar que a escolha de camundongos da linhagem RAG^{-/-}, foi baseada no fato desses animais apresentam órgãos linfoides pequenos e imunodeficiência combinada (ausência de linfócitos T e B). O uso dessa linhagem permite o desenvolvimento de tumor xenográfico em relação à linhagem de animais imunologicamente normais (selvagens). No entanto, não foi observado desenvolvimento evidente de tumor no cérebro do animal 1. Para o animal 2, foi observado o desenvolvimento de tumor de aproximadamente 4 mm, conforme mostra a Figura 2. Para o animal 3, apesar de não ter apresentado



Figura 2 - Tumor desenvolvido no cérebro do animal 2. Fonte: própria.



Figura 3 - Tumor desenvolvido no cérebro do animal 3. Fonte: própria.

nenhum sinal clínico, o tumor desenvolveu-se no cérebro, conforme mostra a Figura 3; entretanto, a posição da massa tumoral do animal 3 (parieto-occipital, anterior ao cerebelo), foi diferente da do animal 2, apesar da inoculação das células tumorais terem sido realizadas na mesma região cerebral (mesmas coordenadas esterotáxicas) dos três animais, conforme descrito na metodologia.

CONCLUSÕES:

Os resultados indicam que o modelo foi desenvolvido com sucesso. As informações obtidas indicam que a perda de peso e a redução do consumo de ração podem ser sinais de desenvolvimento do tumor. Treinamentos adicionais serão necessários para se obter condições mais estáveis como a posição do tumor e consequentes sinais clínicos, previamente ao início dos estudos com a molécula 5-ALA sintetizada.

BIBLIOGRAFIA

FERRY, Barbara, GERVASONI, Damien. Improving Stereotaxic Neurosurgery Techniques and Procedures Greatly Reduces the Number of Rats Used per Experimental Group – A Practice Report. **Animals**, v. 11, n.9, p.2662, 2021

GUYOTAT, Jacques, et al. 5-aminolevulinic acid–protoporphyrin IX fluorescence-guided surgery of high-grade gliomas: a systematic review. **Advances and technical standards in neurosurgery**, p. 61-90, 2016

KRAMP, Tamalee, CAMPHAUSEN, Kelvin. Combination radiotherapy in an orthotropic mouse brain tumor model. **JoVE (Journal of Visualized Experiments)**, n. 61, p. e3397, 2012

LACROIX, Michel, et al. A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival. **Journal of neurosurgery**, v. 95, n. 2, p. 190-198, 2001

MODREK, Aram S., et al. Brain stem cells as the cell of origin in glioma. **World journal of stem cells**, v. 6, n. 1, p. 43, 2014

PAXINOS, George, FRANKLIN, Keith. The mouse brain in stereotaxic coordinates. **Academic press**, San Diego, CA, USA, 2001

SANAI, Nader, et al. An extent of resection threshold for newly diagnosed glioblastomas. **Journal of neurosurgery**, v. 115, n. 1, p. 3-8, 2011

SASKA, Sybele, et al. Adesivos à base de cianoacrilato para síntese de tecido mole. **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 84, p. 585-592, 2009

STUMMER, Walter, et al. Counterbalancing risks and gains from extended resections in malignant glioma surgery: a supplemental analysis from the randomized 5-aminolevulinic acid glioma resection study. **Journal of neurosurgery**, v. 114, n. 3, p. 613-623, 2011

WELLER, Michael, et al. EANO guideline for the diagnosis and treatment of anaplastic gliomas and glioblastoma. **The lancet oncology**, v. 15, n. 9, p. e395-e403, 2014

ZHAO, Shi-Guang, et al. Increased expression of ABCB6 enhances protoporphyrin IX accumulation and photodynamic effect in human glioma. **Annals of surgical oncology**, v. 20, n. 13, p. 4379-4388, 2013