



# PADRONIZAÇÃO DE MODELOS CDX (*CELL-LINE DERIVED XENOGRAFT*) EM CAMUNDONGOS PARA O ESTUDO DO CÂNCER PEDIÁTRICO

Palavras-Chave: CDX, CÂNCER PEDIÁTRICO, MEDICINA PERSONALIZADA

**Autores:**

**LUCAS ILDEFONSO BUSCARATTI, IB/CPB - UNICAMP**

**MSc ARYANNY PAULA SOUSA FERREIRA, IB/CPB - UNICAMP**

**Dr<sup>a</sup>. LARISSA AKEMI KIDO (coorientadora), CPB - BOLDRINI**

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. PRISCILA PINI ZENATTI (orientadora), IB/CPB - UNICAMP**

---

## INTRODUÇÃO:

Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), foram previstos para os anos de 2020 a 2022 aproximadamente 25 mil novos casos de câncer infanto-juvenil, sendo até 75% desses de tumores sólidos<sup>1</sup>, fração acometida majoritariamente por malignidades do sistema nervoso central (SNC), sendo o meduloblastoma um dos principais diagnósticos. Mesmo com o avanço da medicina nos últimos anos e a adoção de tratamentos multimodais para o câncer a partir da década de 60, as taxas de cura para algumas dessas neoplasias ainda estão estagnadas, situação que se deve, significativamente, à escassez de modelos para estudo do desenvolvimento desses tumores<sup>2</sup>. Mesmo que diversos métodos possam ser testados em cultura 2D ou ainda 3D, o modelo *in vivo* fornece possibilidades de complexidade fisiológica do microambiente tumoral que o cultivo celular ainda não consegue atingir, sendo imprescindível para o estudo da área e desenvolvimento da medicina personalizada. Uma potente alternativa para o estabelecimento de novas ferramentas são os CDX's (*cell-line derived xenograft*), no qual é possível resgatar a arquitetura tumoral *in vivo* a partir de linhagens celulares cultivadas. Seus usos possibilitam a obtenção de amostras virtualmente infinitas de xenotransplantes para estudos da biologia tumoral e *trials* de drogas, análises farmacocinéticas e hematológicas, avanços nos campos de histopatologia, e ainda, impede que as amostras sejam escassas por suas especificidades, visto que para alguns tumores, devido às terapias atuais, já não é possível obter material biológico com facilidade.

## OBJETIVO:

Este projeto propõe estabelecer protocolos de modelos xenográficos derivados de linhagem celular (CDX) de meduloblastoma DAOY no Centro de Pesquisa Boldrini.

## METODOLOGIA:

Primeiramente, células de meduloblastoma da linhagem DAOY foram cultivadas em meio de cultura Dulbecco MEM (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico. Após o estabelecimento da cultura, as células foram transduzidas através de um vetor gama-retroviral com os genes para expressão de GFP e Luciferase. A partir do êxito da transdução, as células GFP positivas foram submetidas ao *Sorting* e em seguida expandidas para as baterias de injeção da primeira geração de CDX (Figura 1). Os primeiros implantes foram realizados de maneira subcutânea na região abdominal em dois grupos diferentes, um grupo A (n=2) com uma injeção de 5 milhões de células e um grupo B (n=2) com uma injeção de 10 milhões de células (quantidade mais indicada pela literatura)<sup>3</sup>. As mesmas configurações experimentais foram realizadas em um grupo paralelo utilizando células não transduzidas (DAOY-WT), com o intuito de comparar se há uma possível interferência no crescimento após o procedimento de transdução, o que não foi observado.

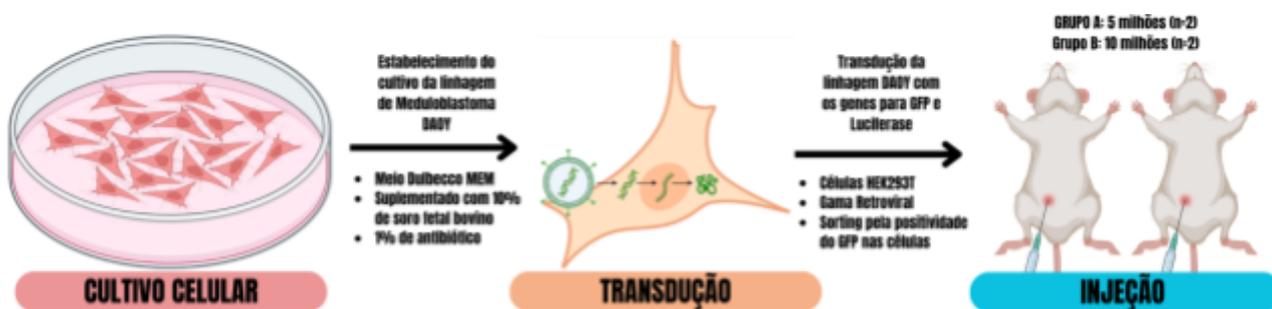


Figura 1. Estabelecimento da primeira geração de implantes

Após os implantes, os animais foram acompanhados semanalmente por meio da medição do peso corpóreo, do volume tumoral medido por paquímetro e pelo sistema *In vivo Imaging* (IVIS). Para a visualização do tumor via IVIS, os animais receberam uma injeção subcutânea de luciferina, substrato da enzima luciferase que, ao descarboxilar oxidativamente seu substrato, libera energia luminosa durante a reação. Após 10 minutos da injeção, os camundongos eram expostos à captura de imagem do equipamento, permitindo a visualização do crescimento tumoral no animal por meio da luminescência. Após atingir em uma das dimensões 15 mm, os animais foram eutanasiados e tiveram os seguintes órgãos coletados: fígado, baço, rins, coração, pulmões e cérebro para futuras análises histológicas. Além disso, o tumor foi coletado e processado em fragmentos de 3x3 mm, os quais foram utilizados para o estabelecimento de CDX's de segunda geração (Figura 2).

Para os implantes da segunda geração, foram selecionados dois locais diferentes, sendo eles os flancos (flanco direito e esquerdo) e o dorso dos animais. Sendo assim, foram agrupados em três grupos diferentes, um deles recebendo o implante com o fragmento padrão nos flancos (n=2), um segundo recebendo um fragmento padrão no dorso (n=3) e, por último, um grupo recebendo um fragmento dissociado na região do dorso (n=3). Todos os animais foram acompanhados semanalmente por meio do sistema IVIS até serem eutanasiados quando atingiram uma das dimensões do volume tumoral com 15 mm de comprimento.

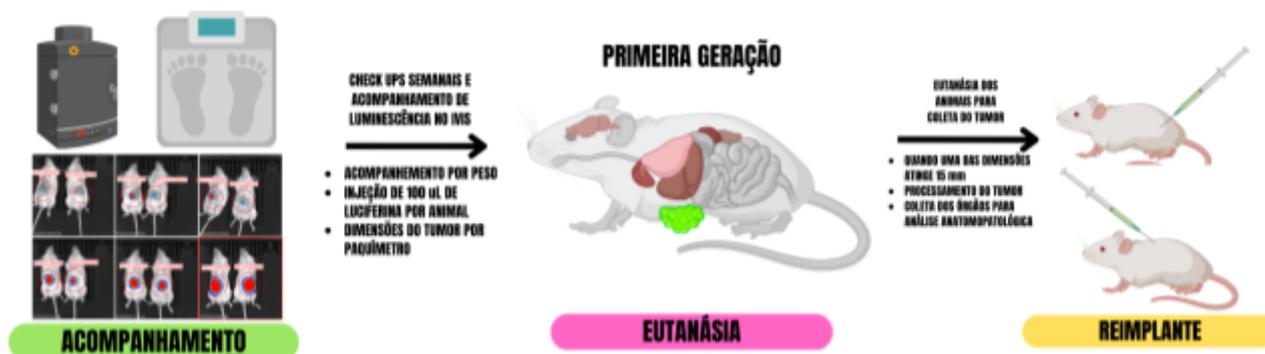


Figura 2. Acompanhamento e estabelecimento das próximas gerações de CDX

## RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Primeiramente, a partir das análises de radiância dos grupos experimentais de 5 e 10 milhões de células, os dados foram plotados (Figura 3) com novos resultados. Observando a curva de luminescência de ambos os grupos, os animais partem de um mesmo ponto e seguem com o crescimento até a sexta semana, na qual são eutanasiados. Após uma ANOVA comparando as médias da luminescência dos implantes, o valor-p resultante foi de 0,116721, o que não representa diferenças estatísticas significativas em um intervalo de confiança de 95%, demonstrando que implantes de 5 e 10 milhões tiveram a mesma eficiência quanto ao volume tumoral e tempo de crescimento<sup>3,4</sup>. No contexto do meduloblastoma e outros tumores de SNC, as amostras vindas de cirurgias e biópsias são pequenas, e reduzir a quantidade de células injetadas pode extrapolar o uso do modelo permitindo a dissociação dos tumores dos pacientes, contagem de células e um implante mais otimizado.

A expansão *in vivo* dessa linhagem a partir dos fragmentos gerados pelos CDXs de primeira geração permite uma economia nos insumos para a cultura celular, sendo relevante testar diferentes os diferentes locais

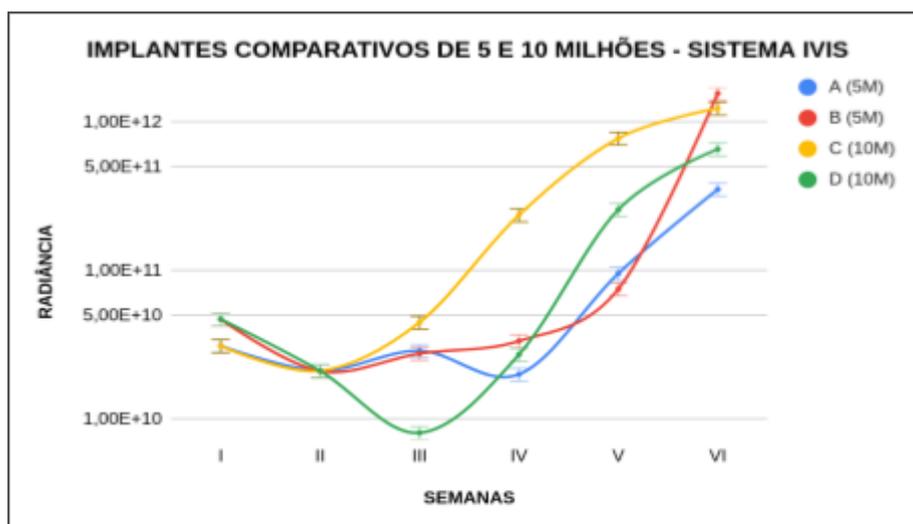


Figura 3. Comparação do crescimento tumoral em diferentes quantidades de células

usualmente implantados para analisar se há influência sobre o crescimento e tempo de pega. Nos grupos da segunda geração foi possível observar lugares mais eficientes para o crescimento tumoral (Figura 4). As curvas em azul e em vermelho representam os implantes com os fragmentos inteiros (3x3 mm) nos flancos e no dorso respectivamente, e elas saem do mesmo ponto, diferentemente da curva em amarelo, que sendo um implante no dorso em forma

dissociada, já no início aponta uma maior radiância. Quando feita uma ANOVA com as médias de luminescência das três curvas, os resultados não apresentaram diferenças estatísticas a partir do início do crescimento,

contudo, mesmo que a partir disso, as curvas adiante se comportam de maneira semelhante, nota-se um diferencial na variável tempo entre os implantes realizados nos flancos e o dorso, em que no primeiro local são necessárias 6 semanas até a eutanásia, enquanto no segundo essa é atingida em 4 semanas (Figura 5). Além disso, mesmo que as condições *fragmentado* e *dissociado* no dorso tenham um índice de radiância estatisticamente equivalentes, o volume tumoral atingido pelo grupo dissociado foi maior, possibilitando um maior número de amostras<sup>3,4</sup>.

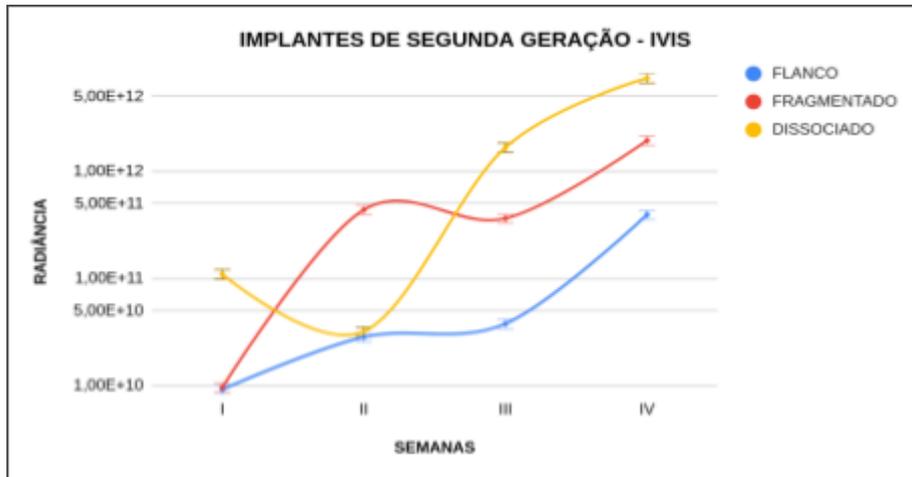


Figura 4. Comparação do crescimento tumoral dos diferentes locais de implante

Uma terceira conquista relevante para a otimização dos protocolos testados é em relação ao uso da matriz comercial utilizada. A literatura descreve que a proporção utilizada para os implantes é de 1:1, sendo uma das partes de matriz e a outra de meio de cultura utilizado para o cultivo específico da linhagem. Entretanto, após os experimentos, foi possível otimizar a proporção, alcançando implantes sem queda de eficiência com 1:2, reduzindo

para um terço da solução a quantidade matriz, componente que é significativamente caro para a realização dos experimentos.

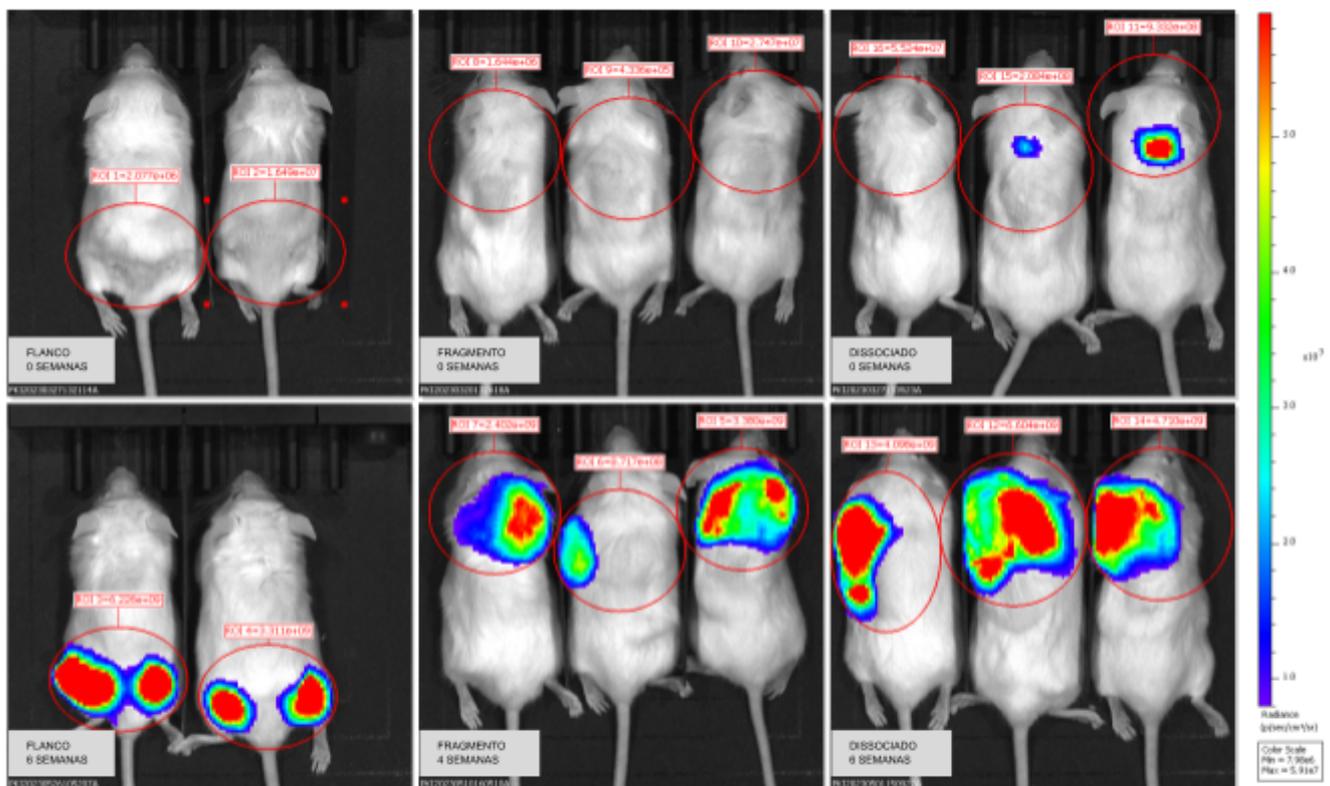


Figura 5. Imagens do sistema IVIS para o desenvolvimento dos implantes de 2ª geração

## CONCLUSÕES:

O presente trabalho propõe protocolos promissores que permitem uma injeção de 5 milhões de células tão efetiva quanto implantes com 10 milhões, uma proporção de matriz comercial e meio de cultura utilizada de 1:2 com a mesma eficiência de 1:1, além da economia de recursos de cultivo celular por realizar propagação *in vivo* a partir da segunda geração, fator que contribui fortemente para a economia de recursos e insumos no manejo das culturas celulares. Sendo assim, o estabelecimento de protocolos de CDX no Centro de Pesquisa Boldrini tem se mostrado promissor, oferecendo diversas vantagens quando comparados à literatura vigente. Esses resultados promoverão um novo modelo que possibilita estudos da biologia tumoral e *trials* de drogas, e servirão de base para desenvolvimento de modelos PDX (Patient Derived Xenograft) com células primárias dos pacientes em projetos futuros, incluindo o projeto PRONON “Medicina de precisão aplicada ao câncer infanto-juvenil” (SIPAR - 25000.211368/2019-41), que já está em andamento no laboratório e sua estrutura será voltada para o Sistema Único de Saúde (SUS).

---

## BIBLIOGRAFIA

- 1 GLOBAL BURDEN OF DISEASE STUDY 2013 COLLABORATORS, Theo et al. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 301 acute and chronic diseases and injuries in 188 countries, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet* (London,England), v. 386, n. 9995, p. 743–800, 22 ago. 2015.
- 2 HIRSCHFELD, Steven et al. Regulatory approvals of pediatric oncology drugs: Previous experience and new initiatives. *Journal of Clinical Oncology*. [S.l: s.n.], 15 mar. 2003
- 3 QUE, Zujun; LUO, Bin; ZHOU, Zhiyi; DONG, Changsheng; JIANG, Yi; WANG, Lin; SHI, Qihui; TIAN, Jianhui. Establishment and characterization of a patient-derived circulating lung tumor cell line in vitro and in vivo. *Cancer Cell International*, [S.L.], v. 19, n. 1, p. 2-4, 29 jan. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12935-019-0735-z>.
- 4 ZHUANG, Yongxian; GRAINGER, Jordan M.; VEDELL, Peter T.; YU, Jia; MOYER, Ann M.; GAO, Huanyao; FAN, Xiao-Yang; QIN, Sisi; LIU, Duan; KALARI, Krishna R.. Establishment and characterization of immortalized human breast cancer cell lines from breast cancer patient-derived xenografts (PDX). *Npj Breast Cancer*, [S.L.], v. 7, n. 1, p. 2-4, 18 jun. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41523-021-00285-x>.