

## AValiação de Modelos *in vivo* de Caquexia Oncológica Induzida por Xenotransplante de Células de Neuroblastoma em Culturas 2D e 3D

Gabriela E. Sbardellotto<sup>1,2\*</sup>, Lara M. F. Guimarães<sup>2\*</sup>, Claudiana Lameu<sup>2\*</sup>

1 – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP

2 – Instituto de Química, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP

[esteves.gabriela@usp.br](mailto:esteves.gabriela@usp.br)

**Resumo:** Caquexia é uma síndrome metabólica multifatorial que se desenvolve frequentemente em quadros clínicos crônicos como no câncer. O quadro caquético está associado à perda de peso corporal acentuada, estresse psicológico, incapacidade física e diminuição da qualidade de vida, por isso é responsável por piorar o prognóstico dos pacientes. Com o objetivo de melhorar a compreensão da caquexia oncológica, estudamos dois modelos experimentais utilizando camundongos imunodeficientes BALB/c nude xenoenxertados com a linhagem celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y em culturas 2D (monocamada) ou 3D (tumoresferas). Foi observada significativa perda de peso nos grupos xenotransplantados quando comparado com o grupo controle (sem tumor), que não foi revertida, apesar da aumentada ingestão de ração pelos animais do grupo tumoresferas. O desenvolvimento tumoral do grupo 3D foi mais lento e gradual do que o do grupo 2D, possibilitando um maior tempo para o estabelecimento da síndrome caquética. A perda de massa do tecido adiposo branco (TAB) e do fígado foi significativa nos grupos portadores de xenoenxerto em comparação ao grupo controle; já a perda de massa muscular esquelética tibialis anterior foi significativa apenas no grupo tumoresferas. Nossos dados indicam que os modelos de xenoenxerto de monocamada e tumoresferas induzem quadros caquéticos-like de estágios distintos, moderado e severo, respectivamente. Nós sugerimos que essa diferença seja devido a presença de células fenotipicamente diferentes na massa tumoral a depender do modo de cultura empregado para desenvolvimento do tumor e indução do quadro caquético.

**Palavras-chave:** *caquexia; modelos; neuroblastoma.*

### *Evaluation of in vivo models of cancer-induced cachexia via neuroblastoma cell xenograft in 2D and 3D cultures*

**Abstract:** Cachexia is a multifactorial metabolic syndrome that often develops in chronic conditions such as cancer. The cachectic picture is associated with marked body weight loss, psychological stress, physical disability and decreased quality of life, which is why it is responsible for worsening the prognosis of patients. To improve the understanding of oncological cachexia, we studied two experimental models using immunodeficient BALB/c nude xenografted mice with the human neuroblastoma cell line SH-SY5Y in 2D (monolayer) or 3D (tumorspheres) cultures. Significant weight loss was observed in the xenotransplanted groups when compared to the control group (no tumor), which was not reversed, despite the increased feed intake by the animals in the tumorsphere group. Tumor development in the 3D group was slower and more gradual than that in the 2D group, allowing a longer time for the establishment of cachectic syndrome. The loss of white adipose tissue (WAT) and liver mass was significant in the xenograft-bearing groups compared to the control group; the loss of tibialis anterior skeletal muscle mass was significant only in the tumorsphere group. Our data indicate that the monolayer and tumorsphere xenograft models induce cachectic-like conditions of distinct, moderate and severe stages, respectively. We suggest that this difference is due to the presence of phenotypically different cells in the tumor mass, depending on the culture method used for tumor development and cachectic induction.

**Keywords:** cachexia; models; neuroblastoma.

## Introdução

A caquexia é uma síndrome metabólica multifatorial que se desenvolve frequentemente em quadros clínicos crônicos, como o câncer. O quadro caquético atinge grande parte dos pacientes oncológicos e é responsável por piorar o prognóstico, sendo responsável direto pelo óbito de 22% desses pacientes. A caquexia está associada à perda de tecido muscular, onde a perda de tecido adiposo pode, ou não, ocorrer, resultando em perda de peso corporal acentuada, estresse psicológico, incapacidade física e diminuição da qualidade de vida<sup>1, 2, 3</sup>.

Considerando cada vez mais a necessidade de se entender e estudar a caquexia no câncer, modelos pré-clínicos têm sido propostos. Um modelo de grande relevância é o modelo com xenoinxertos de tumores humanos ou linhagens tumorais, os quais possibilitam a criação de um microambiente tumoral próximo ao do presente no paciente humano<sup>4</sup>.

Muitos estudos relatam o envolvimento das células-tronco tumorais (cancer stem cells – CSCs) na agressividade do tumor<sup>5</sup>. As CSCs são células capazes de se auto renovar, de se diferenciar em várias células especializadas diferentes, de migrar e invadir outros tecidos para formar metástases<sup>6, 7</sup>. Células tumorais cultivadas em suspensão e na presença de fatores de crescimento formam tumoresferas, um modelo 3D *in vitro* que enriquece a cultura com CSCs. Os modelos 3D são capazes de apresentar uma maior heterogeneidade celular, o que condiz melhor com a realidade do tumor<sup>4</sup>. Essas culturas de células 3D apresentam diferenças tanto morfológicas quanto fisiológicas quando comparadas às culturas de células 2D que crescem em monocamada<sup>8</sup>, além de reproduzirem condições mais severas como uma maior resistência às drogas anticâncer, por exemplo<sup>9</sup>.

## Experimental

### *Cultivo Celular*

Foi cultivada em laboratório a linhagem celular derivada de neuroblastoma humano (SH-SY5Y ATCC®CRL2266TM) para posterior injeção nos animais. Para isso, utilizou-se o meio DMEM high glucose, suplementado com 10% de soro bovino fetal e 1% antibióticos (penicilina e estreptomicina). A cultura celular foi mantida a 37 °C em atmosfera 5% de CO<sub>2</sub> e a troca do meio foi realizada a cada três dias.

### *Indução de Tumoresferas*

Para a indução da formação de tumoresferas, frascos T75 foram tratados previamente com ácido plurônico (2%) por 24h para evitar a adesão das células. Após o tratamento dos frascos, foram semeadas 3.10<sup>6</sup> células (SH-SY5Y) por frasco utilizado por um período de 96h com meio definido (β-FGF 20 ng/ml; EGF 20 ng/ml; B27 1x e antibióticos à 1% - penicilina/estreptomicina).

### *Implantação dos Tumores*

Para a implantação dos tumores, foram utilizados 15 camundongos machos atímicos nude (BALB/c nude) com aproximadamente seis semanas de idade. Cerca de 3X10<sup>6</sup> células derivadas das culturas 2D (monocamada) e 3D (tumoresferas), foram ressuspensas em 50% Matrigel e 50% PBS e injetadas subcutaneamente nos animais.

### Protocolo Experimental Animal

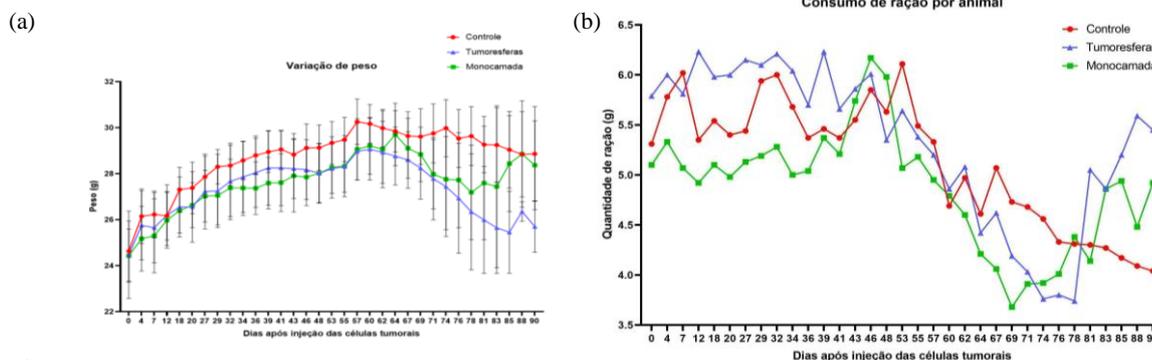
A experimentação animal teve aprovação da Comissão de Ética do Uso de Animais do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (CEUA 133/2019). Os animais foram divididos em 3 grupos: nu/nu controle; nu/nu xenotransplantado com células cultivadas em cultura 2D (monocamada) e nu/nu xenotransplantados com células cultivadas em cultura 3D (tumoresferas). O consumo de água e de ração foi administrado *ad libitum*. Foi realizado o acompanhamento dos animais a cada 48h para monitoramento de peso, do consumo de alimento e do peso e tamanho tumoral assim que este se tornou visível e palpável. O experimento teve duração de 90 dias.

### Eutanásia

Os camundongos foram eutanasiados com isoflurano assim que atingiram o ponto final humanitário (endpoint), estabelecido pela IACUC. O endpoint humanitário foi calculado com base no volume tumoral, surgimento de úlceras, peso e análise comportamental de cada animal. Após a eutanásia do animal, foi realizada a perfusão com PBS seguida de PFA nos animais para preservação e armazenamento dos órgãos e tecidos. Em seguida, realizou-se a coleta dos órgãos (mantidos em paraformaldeído numa temperatura de aproximadamente 4 °C) para posterior análise.

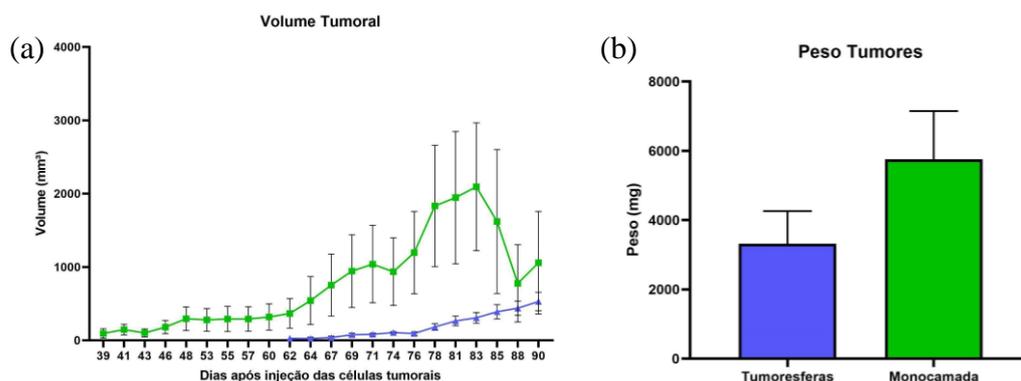
### Resultados e Discussão

Os três grupos analisados iniciaram o período do experimento com um peso médio de aproximadamente 24,5 g. No decorrer dos dias após a injeção das células tumorais, foi possível observar que o grupo controle manteve um maior peso com média de 28,71 g  $\pm$  0,2307, enquanto os grupos monocamada e tumoresferas mantiveram uma média de 27,64 g  $\pm$  0,2101 e 27,30 g  $\pm$  0,2133, respectivamente. A partir da análise dos dados, obteve-se um p-valor  $\leq$  0,05 entre o grupo controle e os grupos xenotransplantados, ou seja, verificou-se uma diferença significativa na variação de peso. As médias do grupo controle, monocamada e tumoresferas com seus respectivos erros padrão foram: 5,104 g  $\pm$  0,1057, 4,877 g  $\pm$  0,09655 e 5,325 g  $\pm$  0,1277. Apesar da maior média de ingestão de ração pelo grupo tumoresferas, quando esse valor é relacionado com a variação de peso apresentada acima, é possível dizer que o maior consumo de alimento não foi capaz de atenuar o efeito da perda de peso apresentado pelo grupo. A partir da análise dos dados, obteve-se um p-valor  $\leq$  0,05 entre o grupo tumoresferas e o grupo monocamada, ou seja, verificou-se uma diferença significativa na ingestão de ração. Na comparação entre o grupo controle e os grupos xenotransplantados, obteve-se um p-valor não significativo. Os resultados obtidos encontram-se na **Figura 1**.



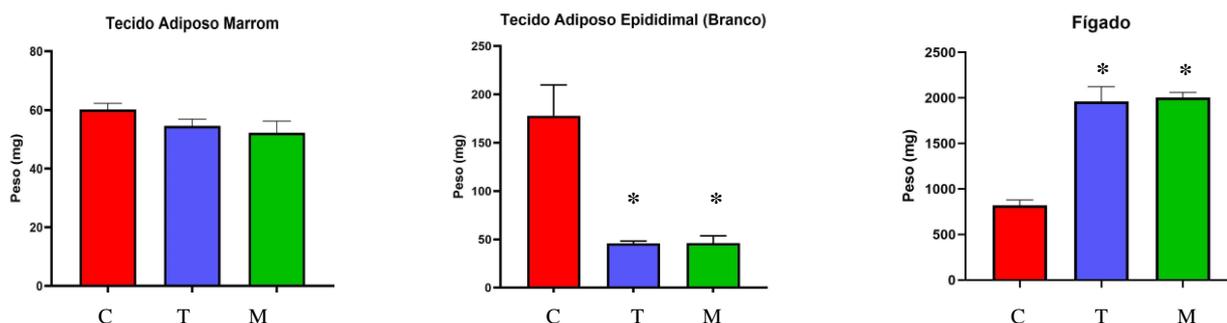
**Figura 1** - Valores do peso (a) e ingestão alimentar (b) obtidos dos grupos controle (vermelho), 3D (azul) e 2D (verde). Os dados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão (EP) e foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn e foram considerados significativos quando  $p \leq 0,05$ ;  $n = 5$  em cada grupo.

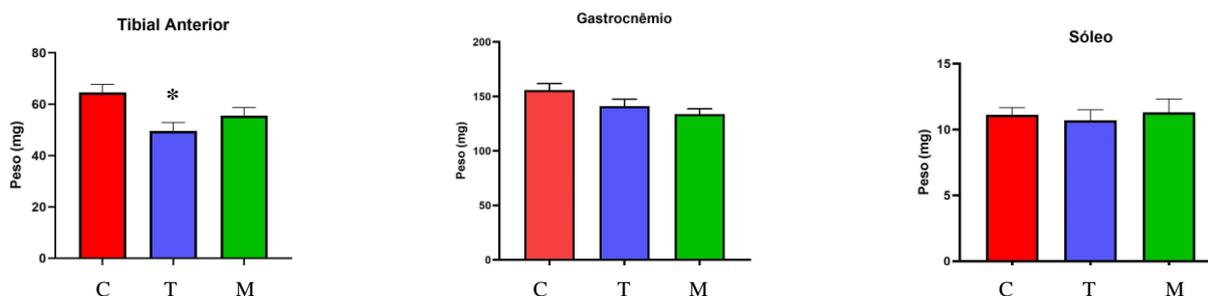
A análise do volume e do peso tumoral foi realizada para comparar o desenvolvimento tumoral dos grupos monocamada e tumoresferas. Após a injeção da mesma quantidade de células tumorais nos dois grupos, foi possível observar que o tumor se tornou visível e palpável em torno do 39º dia para o grupo monocamada, enquanto que, para o grupo tumoresferas, o tumor teve um desenvolvimento mais lento e gradual, tornando-se visível e palpável apenas a partir do 62º dia. Além disso, o volume médio atingido pelos tumores no grupo monocamada ( $840,6 \text{ mm}^3 \pm 138,0$ ) foi bem maior do que o volume médio atingido pelos tumores no grupo tumoresferas ( $327,5 \text{ mm}^3 \pm 81,89$ ). A partir do 83º dia, é possível notar que houve uma queda significativa no valor médio do volume tumoral do grupo monocamada. Isso ocorreu pois os animais atingiram o ponto final humanitário e foram eutanasiados, diminuindo o valor médio do grupo. Portanto, é possível dizer que o grupo monocamada foi eutanasiado principalmente por fatores de tamanho e aparência tumoral do que pelo fator peso. A partir da análise dos dados, obteve-se um valor-p significativo apenas para o parâmetro volume tumoral. Quanto ao peso, não houve variação significativa. Os resultados encontrados estão representados na **Figura 2**.



**Figura 2** - Efeito dos diferentes tipos de cultura celular no surgimento e crescimento tumoral in vivo. (A) Volume tumoral [ $\frac{1}{2}$  (comprimento  $\times$  largura<sup>2</sup>), mm<sup>3</sup>]. As linhas representam a média  $\pm$  S.E., os dados foram analisados utilizando teste de Mann-Whitney e foram considerados estatisticamente significativos quando  $p \leq 0,05$ ;  $n = 5$  em cada grupo; (B) peso dos tumores (mg). As barras representam a média  $\pm$  S.E., os dados foram analisados utilizando teste t não pareado, e considerado estatisticamente significativo com  $p \leq 0,05$ ;  $n = 5$  em cada grupo.

Dos tecidos analisados e pesados, apenas notou-se uma diferença significativa ( $p$ -valor  $\leq 0,05$ ) entre o grupo controle e os grupos xenotransplantados quanto ao tecido adiposo branco (TAB) e o fígado. Já com relação aos tecidos musculares esqueléticos, apenas notou-se uma diferença significativa ( $p$ -valor  $\leq 0,05$ ) entre os grupos tumoresferas e controle no músculo tibial anterior (**Figura 3**).





**Figura 3** - Valores do tecido adiposo marrom (TAM), tecido adiposo branco (TAB), fígado, músculo tibial, músculo gastrocnêmio e músculo sóleo obtidos do controle (grupos vermelho), 3D (azul) e 2D (verde). Os dados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão (EP) e foram analisados pelo teste One-Way ANOVA e foram considerados estatisticamente significativos quando  $p \leq 0,05$ ;  $n = 5$  em cada grupo.

## Conclusões

É possível observar que no modelo de caquexia oncológica feito com células 3D teve uma perda de peso mais acentuada, o tumor teve um desenvolvimento mais lento e com menores variações de tamanho entre os tumores dos animais o que abre a possibilidade para estudar caquexia severa, provavelmente pelo maior número de CSCs na massa tumoral. Enquanto que modelo de indução de caquexia oncológica com células em 2D, embora tenha havido perda de peso significativa, a perda de massa muscular não foi observada, indicando que esse é deve ser um modelo útil para o estudo da caquexia moderada.

## Agradecimentos

Agradecemos ao apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (processos FAPESP 2015/19128-2 e 2021/09867-3).

## Referências

- Evans, W. J., Morley, J. E., Argilés, J., Bales, C., Baracos, V., Guttridge, D., ... Anker, S. D. (2008). Cachexia: A new definition. *Clinical Nutrition*, 27(6), 793–799. doi:10.1016/j.clnu.2008.06.013
- Peixoto da Silva, S., Santos, J. M. O., Costa e Silva, M. P., Gil da Costa, R. M., & Medeiros, R. (2020). Cancer cachexia and its pathophysiology: links with sarcopenia, anorexia and asthenia. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*. doi:10.1002/jcsm.12528;
- Argiles JM, Busquets S, Stemmler B, Lopez-Soriano FJ. Cancer cachexia: understanding the molecular basis. *Nat Rev Cancer*. 2014;14:754–62 ;
- Liu, X., & Raju, P. (2011). In Vitro Cancer Model for Drug Testing. *Comprehensive Biotechnology*, 543–549. doi:10.1016/b978-0-08-088504-9.00502-x
- ARNAUD-SAMPAIO, V. F. et al. The P2X7 Receptor in the Maintenance of Cancer Stem Cells, Chemoresistance and Metastasis. **Stem Cell Reviews and Reports**, v. 16, n. 2, p. 288–300, 2020;
- Yu, Z., Pestell, T. G., Lisanti, M. P., & Pestell, R. G. (2012). *Cancer stem cells. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 44(12), 2144–2151. doi:10.1016/j.biocel.2012.08.022;
- Kobayashi, N. C. C., & Noronha, S. M. R. de. (2015). *Cancer stem cells: a new approach to tumor development. Revista Da Associação Médica Brasileira*, 61(1), 86–93. doi:10.1590/1806-9282.61.01.086;
- Edmondson, R., Broglie, J. J., Adcock, A. F., & Yang, L. (2014). *Three-Dimensional Cell Culture Systems and Their Applications in Drug Discovery and Cell-Based Biosensors. ASSAY and Drug Development Technologies*, 12(4), 207–218. doi:10.1089/adt.2014.573;
- Balla, M. M. S., Yadav, H. D., & Pandey, B. N. (2019). Tumorsphere Assay Provides A Better In Vitro Method for Cancer Stem-like Cells Enrichment in A549 Lung Adenocarcinoma Cells. *Tissue and Cell*. doi:10.1016/j.tice.2019.07.003.