

USO DA LARVA DO PEIXE ZEBRA COMO MODELO ANIMAL PARA ESTUDOS COM XENOENXERTO NA PESQUISA DO CÂNCER

Andressa de Melo Dias¹ Laura Hévila Inocência Leite²

RESUMO: Introdução: O emprego de xenoinxertos de células cancerígenas humanas em modelos animais constitui uma ferramenta robusta para investigar a progressão tumoral. Uma alternativa promissora surge nas larvas do peixe-zebra, cujo pequeno tamanho e transparência facilitam o rastreamento das células transplantadas. Dessa forma, torna-se possível abordar aspectos desafiadores, como o crescimento do tumor e os estágios iniciais da metástase. Metodologia: Trata-se de uma revisão integrativa da literatura, realizada no mês de novembro de 2023, contemplando artigos publicados nos últimos 5 anos. Resultados e discussão: A introdução de tumores no peixe-zebra tornou-se uma importante plataforma de modelagem na pesquisa do câncer. Esta abordagem emerge como uma ferramenta amplamente empregada em pesquisas sobre o câncer, permitindo avaliações in vivo e estudos em tempo real do câncer humano. A capacidade de observar rapidamente as respostas a terapias anticâncer, como quimioterapia, radioterapia e produtos biológicos, juntamente com a capacidade de analisar angiogênese e metástase em resolução de célula única, destaca o modelo de xenoinxerto em peixe-zebra como a escolha ideal para o desenvolvimento de estudos pré-clínicos. Conclusão: Conclui-se, portanto, a importância do uso das larvas de peixe-zebra na pesquisa do câncer, que permitirá a triagem intermediária de novos medicamentos a baixo custo, levando a um desenvolvimento mais rápido de terapias contra células cancerígenas e como uma ferramenta preditiva para auxiliar nas decisões clínicas, bem como contribuir para uma compreensão mais abrangente da biologia do câncer.

385

Palavras-chave: Larvas. Zebrafish. Xenoinxerto. Câncer.

Área Temática: Medicina

ABSTRACT: Introduction: The use of human cancer cell xenografts in animal models is a robust tool to investigate tumor progression. A promising alternative appears in zebrafish larvae, whose small size and transparency make it easier to track the transplanted cells. In this way, it becomes possible to address challenging aspects such as tumor growth and the early stages of metastasis. Methodology: This is an integrative review of the literature, held in November 2023, including articles published in the last 5 years. Results and discussion: The introduction of tumors into zebrafish has become an important modeling platform in cancer research. This approach emerges as a widely employed tool in cancer research, allowing for in vivo evaluations and real-time studies of human cancer. The ability to rapidly observe responses to anti-cancer therapies such as chemotherapy, radiotherapy, and biologics, along with the ability to analyze angiogenesis and metastasis at single-cell resolution, highlights the zebrafish xenograft model as the ideal choice for developing preclinical studies. Conclusion: Therefore, we conclude the importance of the use of zebrafish larvae in cancer research, which will allow the intermediate screening of new drugs at low cost, leading to a faster development of therapies against cancer cells and as a predictive tool to assist in clinical decisions, as well as contribute to a more comprehensive understanding of cancer biology.

Keywords: Larvae. Zebrafish. Xenograft. Cancer.

¹Universidade Federal do Cariri Barbalha, Ceará.

²Universidade Federal do Cariri, Barbalha, Ceará.

INTRODUÇÃO

O emprego de xenoenxertos de células cancerígenas humanas em modelos animais constitui uma ferramenta robusta para investigar a progressão tumoral e o potencial metastático. Embora os ratos sejam frequentemente utilizados como hospedeiros validados, enfrentam restrições significativas devido aos altos custos experimentais e baixo rendimento. Uma alternativa promissora surge nas larvas do peixe-zebra, cujo pequeno tamanho e transparência facilitam o rastreamento das células transplantadas. Dessa forma, torna-se possível abordar aspectos desafiadores, como o crescimento do tumor e os estágios iniciais da metástase, que apresentam dificuldades de avaliação em modelos de camundongos (CORNET, *et al.*, 2019).

O *Danio-rerio*, zebrafish, peixe-zebra ou paulistinha é um vertebrado que possui vários tecidos, órgãos e glândulas com funções semelhantes aos mamíferos, como sistema músculo-esquelético, cardiovascular, cerebral, gastrointestinal, dentre outros. Sendo assim, esse peixe tem tido grande relevância no campo das pesquisas experimentais com xenoenxertos cancerígenos, devido a versatilidade de estudos possíveis, como angiogênese tumoral, crescimento, invasão celular e metástase, além da facilidade de manutenção, já que é um modelo de alto rendimento e baixo custo (CHEN, *et al.*, 2021).

O xenoenxerto ou xenotransplante é a transferência de células ou tecidos de um animal de uma espécie para outro de uma espécie diferente e podem ser ortotópicos ou heterotópicos. Os xenoenxertos ortotópicos referem-se ao transplante de células tumorais do órgão de origem do câncer, enquanto os xenoenxertos heterotópicos consistem na inserção das células tumorais em um tecido diferente do local original (ASTELL; SIEGER, 2019). O xenotransplante mostrou-se vantajoso na larva do zebrafish, tendo em vista que o seu sistema imunológico adaptativo é desenvolvido somente após 30 dias de vida, fato que corrobora para a diminuição de rejeição do enxerto e exclui a necessidade de imunossuppressores (GAMBLE, *et al.*, 2021).

O ensaio de xenoenxerto larval em peixe-zebra apresenta várias vantagens experimentais em comparação com outros modelos, sendo a redução significativa de escala e tempo de grande relevância, pois possibilita a visualização de células individuais, a utilização de uma quantidade relativamente pequena de células humanas, a realização de testes de drogas em média e alta escala, e, mais crucialmente, resulta em uma notável redução no tempo do ensaio. Todas essas vantagens tornam o ensaio de xenoenxerto em peixe-zebra altamente atrativo para futuras aplicações em medicina personalizada (MARTINEZ-LOPEZ; POVOA; FIOR, 2021).

Portanto, o presente trabalho tem como objetivo, analisar a relevância do uso de

xenoinxertos de células cancerígenas humanas em larvas de peixe-zebra como uma ferramenta de investigação da progressão tumoral, tendo em vista a importância de estudos que tenham uma abordagem abrangente da dinâmica tumoral.

METODOLOGIA

Trata-se de uma revisão integrativa da literatura, realizada no mês de novembro de 2023. A busca por literaturas se deu por meio das bases de dados Public Medline (PubMed), Biblioteca Virtual de Saúde (BVS) e Scientific Electronic Library Online (Scielo), publicados nos últimos 5 anos.

A busca inicial se deu através da utilização dos Descritores em Ciências da Saúde (DeCS) em cruzamento com o operador booleano AND, da seguinte forma: “Zebrafish” AND “larva” AND “xenograft” AND “Cancer”, encontrando 88 artigos. Posteriormente, foram estabelecidos os critérios de inclusão, considerando: artigos publicados na íntegra em texto completo nos últimos cinco anos (2018-2023), resultando em 58 trabalhos. Em seguida, foram constituídos os critérios de exclusão, desconsiderando: estudos que não contemplassem o objetivo do estudo, artigos não disponíveis gratuitamente e revisões, sendo que artigos duplicados não foram contabilizados. Deste modo, foram selecionados 13 artigos para o desenvolvimento da pesquisa. 387

O estudo seguiu os princípios éticos e legais da pesquisa e não precisou aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa, por se tratar de estudo realizado em plataforma aberta para domínio público, respaldada pela Resolução nº 510, de 7 de abril de 2016, do Conselho Nacional de Saúde.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A introdução de tumores no peixe-zebra tornou-se uma importante plataforma de modelagem na pesquisa do câncer. Esta abordagem envolve células cancerígenas primárias derivadas de pacientes e linhas celulares de laboratório. Os xenoinxertos tradicionais derivados de pacientes (PDXs) são criados a partir de células tumorais ou massas isoladas durante uma biópsia ou procedimento de excisão e implantado em modelos animais e possuem um perfil biológico estável em termos de expressão genética e mutações, preservando a heterogeneidade do tumor primário do paciente. Com isso, os PDXs podem ser usados para verificação de eficácia tanto de medicamentos já utilizados, como de novas drogas (CHEN, *et al.*, 2021).

Nesse contexto, os xenoinxertos em larvas de peixe-zebra emergem como uma ferramenta amplamente empregada em pesquisas sobre o câncer, permitindo avaliações *in vivo*

e estudos em tempo real do câncer humano. A capacidade de observar rapidamente as respostas a terapias anticâncer, como quimioterapia, radioterapia e produtos biológicos, juntamente com a capacidade de analisar angiogênese e metástase em resolução de célula única, destaca o modelo de xenoenxerto em peixe-zebra como a escolha ideal para o desenvolvimento de estudos pré-clínicos (MARTINEZ-LOPEZ; POVOA; FIOR, 2021).

Um estudo acerca de neuroblastomas recidivantes, uma neoplasia com altas taxas de mortalidade infantil, utilizou larvas do peixe-zebra como um modelo para pesquisas pré-clínicas para a avaliação da eficácia e toxicidade de tratamentos com inibidores de histona desacetilase (HDAC). As larvas que foram enxertadas com PDXs de tumores primários e marcadas com fluorescência, desenvolveram neoplasia com progressão local e ambiente biológico mimetizado preservado, concluindo que o zebrafish oferece uma avaliação *in vivo* eficiente e confiável na pesquisa da eficácia de drogas antitumorais (WROBEL, *et al.*, 2020).

Os PDXs desempenham um papel crucial na avaliação das respostas de diferentes tipos de câncer, fomentando o desenvolvimento da medicina personalizada. Embora os modelos de camundongos tenham sido padrão nessa abordagem, as larvas do peixe-zebra surgem como uma alternativa promissora, oferecendo vantagens significativas, como a capacidade de realizar triagens de medicamentos de alto rendimento a um custo mais baixo, possibilitando experimentos *in vivo* com um grande número de réplicas e permitindo a tradução dos resultados para a prática clínica (HANEY; MOORE; BLACKBURN, 2020).

Os tumores cerebrais representam a principal causa de óbito em crianças com tumores sólidos, apresentando mau prognóstico. Um estudo *in vivo* baseado em culturas de células-tronco de glioma primário (GSC) utilizou-se de xenoenxerto ortotópico em larvas de peixe-zebra e monitorização por meio de imagens confocais. As células invadiram o tecido cerebral, estabelecendo-se no cérebro anterior/médio, demonstrando o alto potencial da larva do zebrafish em contribuir significativamente para a compreensão do comportamento celular e o desenvolvimento de tratamentos personalizados (LARSSON; KETTUNEN; CARÉN, 2022).

Os xenoenxertos em larvas de peixe-zebra oferecem um potencial significativo para estudar o comportamento tumoral e as respostas ao tratamento *in vivo*. Um estudo utilizou microinjeção de células de glioblastoma, o tumor cerebral primário mais comum em humanos, marcadas com fluorescência. As larvas foram examinadas diariamente por microscopia de fluorescência que revelou a formação predominante de microtumores no saco vitelino e no espaço perivitelino, com diferentes intensidades de fluorescência. A combinação de microscopia de

fluorescência e citometria de fluxo permitiu a avaliação precisa da proliferação e crescimento tumoral do glioblastoma humano no peixe-zebra, estabelecendo-o como um modelo valioso para a identificação de agentes antiproliferativos eficazes em um contexto pré-clínico (VARGAS-PATRON, *et al.*, 2019).

O câncer de pulmão é uma condição que representa uma das principais causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo. Existem dois principais tipos de câncer de pulmão: o de células pequenas e o de células não pequenas, sendo este último mais comum. A importância das pesquisas na área do câncer de pulmão é indiscutível, uma vez que a compreensão mais profunda da biologia molecular e genética desses tumores pode levar a avanços significativos no desenvolvimento de tratamentos mais eficazes e personalizados. Investigar as vias moleculares envolvidas no crescimento tumoral e na resistência a tratamentos convencionais permite a identificação de alvos terapêuticos específicos, possibilitando a criação de medicamentos mais direcionados e eficazes (JIN, *et al.*, 2018).

Os modelos de xenoinxerto derivado de paciente de peixe-zebra (zPDX) têm demonstrado um significativo potencial na predição da resposta ao tratamento de curto prazo em diversos casos de tumores. Contudo, há uma escassez de estudos que explorem esses modelos no contexto do câncer de pulmão de células não pequenas (NSCLC). Um estudo buscou comparar as respostas ao tratamento em pacientes com CPNPC (carcinoma pulmonar de células não pequenas) com aquelas observadas nos modelos zPDX correspondentes. As células tumorais, obtidas de líquido pleural ou biópsias de pacientes com CPNPC, foram injetadas no espaço perivitelino de larvas de peixe-zebra. Posteriormente, os mesmos agentes antineoplásicos administrados aos pacientes foram testados no modelo zPDX, ao longo de 3 dias. Observou-se uma taxa de consistência de quase 80% entre as respostas clínicas dos pacientes e as obtidas nos zPDXs, indicando uma correlação significativa. A alta concordância entre as respostas dos pacientes e as respostas correspondentes nos modelos zPDX ressalta o potencial considerável dessa abordagem como uma plataforma biológica para prever a eficácia do tratamento em pacientes com NSCLC (HUA, *et al.*, 2023).

Com o desenvolvimento dos tumores, a demanda por nutrientes e oxigênio aumenta, e a angiogênese é ativada como uma resposta adaptativa. Com isso, delinea-se a transição entre a fase avascular, marcada por um tumor latente, e a fase vascular, na qual ocorre o crescimento exponencial do tumor, que secreta substâncias químicas, como fatores de crescimento vascular, que estimulam a formação de novos vasos sanguíneos a partir dos vasos circunvizinhos. Essa

rede vascular recém-formada fornece uma fonte contínua de nutrientes, oxigênio e também facilita a disseminação de células cancerígenas para outras partes do corpo. Portanto, inibir a angiogênese é uma estratégia terapêutica explorada em alguns tratamentos contra o câncer. Ao bloquear a formação de novos vasos sanguíneos, a massa tumoral é privada de utilizar o suprimento necessário para seu crescimento e, assim, limitar sua progressão (LUO, *et al.*, 2022).

Um estudo utilizou-se de xenotransplantes introduzidos nos sacos vitelinos de larvas de peixe-zebra transgênicas para observar em tempo real o desenvolvimento do primeiro vaso sanguíneo, com o fito de desvendar o mecanismo da angiogênese tumoral. Descobriu-se que a sinalização relacionada à falta de oxigênio (hipóxia) não era necessária para a angiogênese, mas o gene que codifica o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) desempenha um papel crucial e a falta desse gene impediu o surgimento do primeiro vaso sanguíneo tumoral (LUO, *et al.*, 2022). O saco vitelino do peixe-zebra fornece um ambiente hipóxico, mimetizando microambientes tumorais humanos, estabelecendo o modelo de xenoenxerto no peixe-zebra como uma plataforma funcional para futuros estudos explorando suas vantagens para testes genéticos e farmacológicos (PRINGLE, *et al.*, 2019).

Dentre os mecanismos de inibição tumoral, a atividade citotóxica contra células cancerígenas resistentes aos quimioterápicos convencionais tem grande destaque nos experimentos científicos. O campo da pesquisa com peixe-zebra tem sido bastante explorado, devido à quantidade de espécies ainda não testadas. Diversos extratos têm demonstrado alta taxa de citotoxicidade em comparação a medicamentos anticâncer, como o etoposídeo. Um estudo utilizou um modelo de xenoenxerto em larvas de *Danio rerio*, aproveitando-se das vantagens da transparência, facilidade de administração, tamanho reduzido, curta duração e baixo custo dos experimentos. Os resultados demonstraram efeito significativo na redução do número de células cancerígenas em um organismo vivo, destacando o potencial do peixe zebra nos experimentos com fins de estratégia terapêutica no tratamento do câncer (TUZIMSKI, *et al.*, 2023).

A pesquisa sobre o câncer tem buscado identificar compostos que possam modular processos-chave na carcinogênese, nos processos metastáticos e na angiogênese, e para isso é essencial não apenas testar a atividade de terapêuticas em culturas de células cancerígenas, mas também confirmar suas propriedades *in vivo* em modelos animais. Estudos na área oncológica já ocorrem disseminadamente com experimentos em camundongos, entretanto, percebe-se a necessidade do uso de modelos animais de alto rendimento nos estágios iniciais, nos quais permitem a realização rápida de experimentos, fato que corrobora com o uso crescente do

zebrafish em todo o mundo (VARAS, *et al.*, 2020).

CONCLUSÃO

Conclui-se, portanto, a importância do uso das larvas de peixe-zebra na pesquisa do câncer, que permitirá a triagem intermediária de novos medicamentos a baixo custo, levando a um desenvolvimento mais rápido de terapias contra células cancerígenas e como uma ferramenta preditiva para auxiliar nas decisões clínicas, bem como contribuir para uma compreensão mais abrangente da biologia do câncer. O modelo de xenoinxerto em larvas de peixe-zebra oferece uma perspectiva única para investigar não apenas a eficácia de novos compostos terapêuticos, mas também para discernir os mecanismos subjacentes à resposta ao tratamento. Além disso, a sua natureza transparente possibilita a observação direta do comportamento tumoral, angiogênese e interações celulares em tempo real.

Além disso, o uso das larvas de peixe-zebra pode ter implicações diretas na prática clínica. A capacidade do modelo de prever respostas ao tratamento fornece informações valiosas, contribuindo para uma abordagem mais direcionada e eficaz no tratamento de pacientes com câncer. Assim, ao adotar as larvas de peixe-zebra como uma ferramenta de pesquisa fundamental, abrem-se perspectivas inovadoras para avanços significativos na compreensão e no combate ao

câncer. 391

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASTELL, K. R.; SIEGER, D. Zebrafish In Vivo Models of Cancer and Metastasis. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 10, n. 8, p. a037077, 15 out. 2019

CHEN, X. et al. Benefits of Zebrafish Xenograft Models in Cancer Research. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 9, 11 fev. 2021.

CORNET, C. et al. ZeOncoTest: Refining and Automating the Zebrafish Xenograft Model for Drug Discovery in Cancer. **Pharmaceuticals**, v. 13, n. 1, p. 1, 24 dez. 2019.

GAMBLE, J. T. et al. The Zebrafish Xenograft Models for Investigating Cancer and Cancer Therapeutics. **Biology**, v. 10, n. 4, p. 252, 24 mar. 2021.

HANEY, M. G.; MOORE, L. H.; BLACKBURN, J. S. Drug Screening of Primary Patient Derived Tumor Xenografts in Zebrafish. **Journal of Visualized Experiments**, n. 158, abr. 2020.

HUA, X. et al. Zebrafish patient-derived xenografts accurately and quickly reproduce treatment outcomes in non-small cell lung cancer patients. **Experimental Biology and Medicine** (Maywood, N.J.), v. 248, n. 4, p. 361-369, 1 fev. 2023.

JIN, Y. et al. Comparison of efficacy and toxicity of bevacizumab, endostar and apatinib in transgenic and human lung cancer xenograftzebrafish model. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 15837, 26 out. 2018.

LARSSON, S.; KETTUNEN, P.; CARÉN, H. Orthotopic Transplantation of Human Paediatric High-Grade Glioma in Zebrafish Larvae. **Brain Sciences**, v. 12, n. 5, p. 625, 10 maio 2022.

LUO, H. et al. The inhibition of protein translation promotes tumor angiogenic switch. **Molecular Biomedicine**, v. 3, n. 1, p. 18, 13 jun. 2022.

MARTINEZ-LOPEZ, M.; PÓVOA, V.; FIOR, R. Generation of Zebrafish Larval Xenografts and Tumor Behavior Analysis. **Journal of Visualized Experiments**, n. 172, 19 jun. 2021.

PRINGLE, E. S. et al. The Zebrafish Xenograft Platform—A Novel Tool for Modeling KSHV-Associated Diseases. **Viruses**, v. 12, n. 1, p. 12–12, 20 dez. 2019.

TUZIMSKI, T. et al. Determination of Selected Isoquinoline Alkaloids from *Chelidonium majus*, *Mahonia aquifolium* and *Sanguinaria canadensis* Extracts by Liquid Chromatography and Their In Vitro and In Vivo Cytotoxic Activity against Human Cancer Cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 7, p. 6360, 28 mar. 2023.

VARAS, M. A. et al. Exploiting Zebrafish Xenografts for Testing the in vivo Antitumorogenic Activity of Microcin E492 Against Human Colorectal Cancer Cells. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, 19 mar. 2020.

392

VARGAS-PATRON, L. A. et al. Xenotransplantation of Human glioblastoma in Zebrafish larvae: in vivo imaging and proliferation assessment. **Biology Open**, v. 8, n. 5, 13 maio 2019.

WROBEL, J. K. et al. Rapid In Vivo Validation of HDAC Inhibitor-Based Treatments in Neuroblastoma Zebrafish Xenografts. **Pharmaceuticals**, v. 13, n. 11, p. 345, 27 out. 2020.