Monitoramento por microPET-CT dos efeitos do laser de baixa potência em tecido adiposo marrom e tecido tumoral

Área CR: Cultivo de células e desenvolvimento de modelos tumorais – microPET

Coordenador: Martha Simões Ribeiro, Centro de Lasers e Aplicações

ENUNCIADO DO PROBLEMA

Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), das 57 milhões de mortes ocorridas em 2008, 63% foram em decorrência de doenças crônicas não transmissíveis (DCNTs), principalmente diabetes mellitus (DM), doenças cardiovasculares (DCVs), cânceres e doenças respiratórias crônicas (1). Apesar de poderem ser prevenidos em 80 % dos casos, DM e DCVs contribuem para praticamente metade dessas mortes, arrastando consigo o peso socioeconômico de envolver, além da mortalidade e dos gastos no tratamento, a diminuição da qualidade de vida e da produtividade. Em 2005, o Brasil teve perdas de USD 2,7 bilhões na renda nacional por conta dessas doenças.

Os principais fatores de risco para DCVs e DM tipo 2 se agrupam em uma condição conhecida como síndrome metabólica (SM). Disglicemia, pressão arterial elevada, dislipidemia aterogênica e obesidade (particularmente na região abdominal) são fortes preditores para o seu desenvolvimento e progressão. Ainda não é possível determinar o que é causa ou consequência da SM, mas a literatura sugere que resistência à ação da insulina e adiposidade central são denominadores comuns entre indivíduos com síndrome metabólica (2). De alguma forma, essas duas condições contribuem para alterações metabólicas que levam ao DM2 e às DCVs.

A literatura destaca a importância de inibir vias inflamatórias na abordagem terapêutica da SM, considerando promissoras pesquisas que se desenvolvam no sentido de modular a inflamação observada nessa condição, mas que não levem ao prejuízo da resposta imune dos pacientes (3). Recentemente, nosso grupo mostrou que a terapia com luz de baixa potência (TLBP) é capaz de reduzir os níveis glicêmicos e diminuir o infiltrado inflamatório em tecido adiposo branco em camundongos obesos e hiperglicêmicos (4). Nesse sentido, um dos objetivos desta proposta é dar continuidade a essa abordagem terapêutica não invasiva e sem efeitos colaterais, com o objetivo de reduzir a inflamação característica da SM através da ativação do tecido adiposo marrom (TAM).

A literatura tem mostrado que o TAM quando ativado aumenta de forma relevante o gasto energético basal por meio da oxidação de cadeias carbônicas originadas principalmente das gorduras e dos carboidratos, consumindo essas fontes de energia para a geração de calor (5). Esse mecanismo é possível graças à presença de UCP1 (proteínas desacopladoras do tipo 1) associadas às ATP sintases mitocondriais dos adipócitos

marrons, que, ao invés de produzirem ATP utilizando a força eletromotriz do influxo de prótons, dissipam essa energia na forma de calor (6, 7).

Sabe-se que, em indivíduos obesos, a quantidade e a atividade do TAM estão diminuídas (8), sendo, portanto, de fundamental importância o desenvolvimento de estratégias direcionadas ao aumento da atividade metabólica desse tecido em obesos como tratamento da obesidade. Atualmente, não existem trabalhos na literatura utilizando a TLBP no tratamento da SM, nem na modulação da atividade metabólica do TAM.

Por outro lado, o câncer tem se tornado um problema de saúde pública mundial. Estima-se que no Brasil, no biênio 2016-2017, surjam 600 mil novos casos, representando a segunda maior causa de mortes por doença. Entre os tipos mais incidentes de câncer, há o câncer de próstata com 61 mil e o de mama feminina com 58 mil novos casos (9). Por se tratar de uma doença multifatorial, ela pode ser resultante de vários fatores, como os ambientais, os hormonais, hereditários ou da inter-relação entre eles.

Os tratamentos oferecidos atualmente para o câncer envolvem a cirurgia, a radioterapia ou a quimioterapia. A conduta terapêutica é de acordo com a etiologia do câncer, mas em muitos casos é necessário combinar mais de uma modalidade. No caso do câncer de mama, a intervenção cirúrgica e a radioterapia têm sido amplamente utilizadas, podendo deixar sequelas nos indivíduos.

A TLBP vem sendo utilizada com sucesso na prática clínica no tratamento da mucosite oral, que é inflamação que acomete pacientes oncológicos após radioterapia de cabeça e pescoço. De fato, recentemente o Ministério da Saúde aprovou o uso do laser para tratamento precoce da mucosite oral (10). No entanto, os efeitos da TLBP em câncer são controversos e dependentes do protocolo de irradiação (11). *In vitro*, Frigo e colaboradores não observaram nenhum efeito da TLBP, mas uma energia mais alta foi capaz de estimular o crescimento de melanoma induzido em camundongos (11).

Nosso grupo vem estudando há algum tempo os efeitos da TLBP em células tumorais, expostas ou não à radiação ionizante. Nós observamos que a TLBP desencadeia diferentes respostas quando aplicada a células normais e tumorais. Em fibroblastos, observou-se que a TLBP induziu proliferação celular, enquanto que para células de tumor de mama, a TLBP não promoveu nenhum efeito (12). Para células de melanoma, não foi possível observar aumento da viabilidade celular para várias energias testadas, mas observou-se que energias mais altas podem inibir a formação do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e a invasão celular (13).

Trabalhos que investiguem os efeitos da TLBP para evitar metástases *in vivo* não foram ainda reportados pela literatura. Nesse contexto, nossa proposta também visa explorar os efeitos da TLBP na regressão do tumor e prevenção de metástase em um modelo de tumor de mama murino.

Com o objetivo de estudar os efeitos da TLBP no TAM e tecido tumoral para monitoramento de um mesmo animal em tempo real e a longo prazo, iniciamos uma colaboração com a Dra. Lorena Pozzo, pesquisadora do Centro de Radiofarmácia (CR) do IPEN-CNEN/SP, que atua na área de quantificação e dosimetria de radionuclídeos em PET (do inglês, *Positron Emission Tomography*) e SPECT (do inglês, *Single-Photon Emission Computed Tomography*). O equipamento Albira microPET-CT, instalado no CR, possibilita o imageamento de camundongos através da tomografia por emissão de pósitrons associada à tomografia computadorizada.

OBJETIVOS

- Implementar um modelo de SM induzida em camundongos C57BL/6 através de dieta hiperlipídica;
- Implementar um modelo de tumor de mama em camundongas BALB/c através da inoculação de células 4T1 com alto poder metastático;
- Monitorar os efeitos da TLBP em TAM através do microPET-CT associado ao ^{18}F-FDG;
- Correlacionar a resposta do microPET-CT com a quantidade de UCP-1 no TAM;
- Monitorar os efeitos da TLBP em metástase de tumor de mama através do microPET-CT associado ao ^{18}F-fluorocolina.

METODOLOGIA

Modelo animal de obesidade e hiperglicemia

Ao longo do período experimental, serão utilizados 126 camundongos de linhagem C57BL/6, machos, com vinte dias de vida, a serem fornecidos pelo Biotério do IPEN. Desses animais, dezoito serão alimentados exclusivamente com ração padrão Nuvilab CR-1 (Nuvital, Quimtia), servindo como controle para o modelo de obesidade e hiperglicemia a ser desenvolvido. Os demais receberão dieta hiperlipídica para indução do quadro desejado fornecendo aproximadamente 40 % das calorias provenientes de

gorduras, uma vez que essa proporção calórica é conhecida por induzir obesidade e resistência à insulina em roedores (14).

Para comprovação da obesidade, o ganho de massa corporal será aferido semanalmente através de balança calibrada, e serão utilizados os pontos de corte após cálculo do índice de Lee (IL), que se encontra demonstrado na equação 1, e leva em consideração a massa corporal do animal e seu comprimento naso-anal (15):

$$IL = \left[\frac{\sqrt[3]{Massa\ corporal\ (g)}}{(Comprimento\ naso - anal\ (cm) \times 10)}\right] \times 1000 \qquad (1)$$

O estado hiperglicêmico será determinado através do teste de tolerância à glicose (TTG): após restrição alimentar de 6 h em período noturno, os animais receberão 1 g de glicose por quilograma de massa corporal através da injeção intraperitoneal de solução estéril de glicose diluída em soro fisiológico. Amostras de sangue da veia caudal serão coletadas imediatamente antes e nos tempos de 15, 30, 45, 60 e 90 min após a administração da solução. A glicemia será determinada com auxílio de glicosímetro portátil (OneTouch, Johnson & Johnson).

No decorrer do tempo experimental, os animais permanecerão acomodados individualmente em isoladores apropriados, recebendo água e ração (modificada ou padrão) *ad libitum*, em ciclo claro/escuro de 12 h/12 h. Todo o tratamento dos animais obedecerá aos princípios éticos em experimentação animal elaborados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, e foram aprovados pelo comitê de ética institucional (143/14/CEUA-IPEN/SP).

Modelo animal para tumor de mama

As células de tumor mamário que serão utilizadas neste trabalho são da linhagem 4T1. Essa linhagem é altamente invasiva, podendo causar metástase espontaneamente a partir de um tumor primário nos linfonodos, pulmão, ossos, entre outros locais de longa distância. Além disso, essa linhagem é bastante utilizada para indução de câncer em modelo animal devido às suas características semelhantes ao câncer de mama humano (16).

As células serão descongeladas e cultivadas em frasco de cultura previamente preparado contendo meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal

bovino, penicilina e estreptomicina e mantido em incubadora a 37ºC e 5% de CO_2 com a tampa entreaberta até alcançar a confluência.

Para a preparação do inóculo, as células serão tripsinizadas utilizando 5 mL de solução de tripsina EDTA e inseridas na incubadora de CO_2 por 5 min. Após esse período, as células serão transferidas para um tubo cônico de 15 mL contendo meio de cultura fresco e centrifugadas a 2000 rpm por 5 min. Depois da centrifugação, as células serão quantificadas em câmara de Neubauer através do teste de exclusão com azul de tripan e suspensas na concentração de $1x10^5$ células em 100 µL de PBS (solução salina tamponada com fosfato), pH 7,2.

Todos os procedimentos *in vivo* seguirão as normas vigentes do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e possuem a aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do IPEN-CNEN/SP (no. 75/11). Serão utilizados 70 animais BALB/c fêmeas com 8 semanas de idade e massa corporal de aproximadamente 30 g. Os animais serão previamente anestesiados via intraperitoneal com uma solução anestésica a base de cloridrato de quetamina (0,32 mL/Kg) e xilazina (0,2 mL/Kg) e tricotomizados. As células serão inoculadas via subcutânea na região da mama (17), utilizando uma seringa de 1 mL e agulha 27-G contendo o concentrado de células juntamente com PBS.

Os animais serão acompanhados diariamente após a inoculação através de palpação na região com o dedo indicador e polegar até a constatação da presença de um tumor. Após a constatação da presença do tumor, o mesmo será quantificado diariamente, sendo realizadas duas medidas perpendiculares utilizando um paquímetro. O valor do diâmetro médio é dado pela raiz quadrada do produto das duas medidas perpendiculares. Os animais serão tratados quando o tumor obtiver um diâmetro médio entre 14 e 16 mm (18).

Protocolo de irradiação

Após o modelo experimental ser estabelecido, iniciaremos o tratamento utilizando como fonte de luz LEDs de emissão vermelha (λ= 660 nm) e infravermelha (λ= 850 nm) desenvolvidos especialmente para este trabalho. A irradiância (mW/cm^2) e exposição radiante (J/cm^2) serão mantidas iguais para ambos comprimentos de onda. Os parâmetros de luz seguirão os trabalhos realizados por nosso grupo (4, 12). A irradiação será realizada diretamente, em contato, sobre a região abdominal e TAM, ou região tumoral, conforme o experimento. O número de irradiações será estabelecido de acordo com os resultados

obtidos em tempo real. Sempre haverá um grupo controle, que será manipulado como os grupos-teste, mas não receberá TLBP.

Monitoramento por microPET-CT

O TAM, quando ativado, é um tecido ávido pela captação de glicose, tornando possível sua detecção e localização anatômica por microPET-CT utilizando a glicose marcada com um radionuclídeo emissor de pósitrons, como é o caso da fluodesoxiglicose (^{18}F-FDG). Para monitoramento da progressão tumoral e metástase, será utilizado o radionuclídeo ^{18}F-fluorocolina (^{18}F-FCH), que possui maior especificidade por célula tumoral, principalmente tumor de próstata (19), mas que também pode detectar tumor de mama (20).

Uma das formas de ativar o metabolismo do TAM é através da exposição dos camundongos ao frio (21-23). Logo, para avaliarmos a funcionalidade desse tecido, os animais permanecerão em câmara fria a 15º C durante o período de biodistribuição do radionuclídeo (45 min). Para camundongos portadores de tumor mamário, esperaremos o mesmo tempo (45 min), mas em temperatura ambiente. As soluções de ^{18}F-FDG ou ^{18}F-FCH serão preparadas e aferidas em radiômetro de forma a apresentarem entre 200 e 300 μCi de atividade em 50 μL, a serem administrados pela veia caudal. As imagens obtidas serão trabalhadas com auxílio do software amide.exe 1.0.4 (Andreas Loening).

Análise imunohistoquímica

Lâminas silanizadas do TAM coletado após eutanásia dos animais, em dias experimentais a serem determinados, serão preparadas com o anticorpo primário anti UCP-1 (24). A contagem será realizada por examinador sem conhecimento prévio dos grupos, com auxílio de retículo quadriculado acoplado à ocular do microscópio. De posse da quantidade de UCP-1 e da quantificação da imagem de microPET-CT, verificaremos se é possível estabelecer uma correlação para a funcionalidade do TAM.

PRINCIPAIS CONTRIBUIÇÕES CIENTÍFICAS OU TECNOLÓGICAS DA PROPOSTA

O presente projeto tem como principal contribuição o desenvolvimento de uma estratégia terapêutica não invasiva baseada em luz para manejo da SM e do câncer, de forma que os pacientes acometidos por essas doenças possam ser beneficiados. Além

disso, o uso do microPET-CT permite o acompanhamento em tempo real e a longo prazo, o que possibilita ajustes para otimização do tratamento. A busca por novas modalidades terapêuticas, menos invasivas e de maior aceitação pelo paciente tem sido uma constante nas áreas da Saúde. Sendo assim, contribuições teórico-experimentais nesta linha de pesquisa são importantes, não só para aumentar o acervo de conhecimento, mas também para fornecer respaldo científico aos usuários da TLBP na prática clínica.

Esperamos que os resultados obtidos neste trabalho também contribuam para o aumento da produção científica e para o aprimoramento dos conhecimentos alcançados pelo nosso grupo de pesquisa na área de terapia óptica, especialmente em uma área promissora que apresenta desafios ainda não vencidos pela comunidade científica.

ORÇAMENTO DETALHADO

Material	**Valor (R$)**
Frasco de cultura celular 75 cm^2 (100)	840,00
Soro fetal bovino (500 mL)	400,00
Placa de cultura com 24 poços (200)	1350,00
Tiras reagentes para glicosímetro (500)	1260,00
Suportes mecânicos (poste, translador vertical, translador linear, porta lentes)	5200,00
Anticorpo UCP-1 (2 mL)	2180,00
Animais (200)	3000,00
	14.230,00

CRONOGRAMA FÍSICO

	1º semestre 2017	2º semestre 2017	1 º semestre 2018	2 º semestre 2018
Desenvolvimento do modelo de SM	X	X		
Desenvolvimento do modelo de tumor mamário	X	X		
Uso da TLBP e monitoramento por microPET-CT		X	X	X
Análise de UCP-1			X	X
Divulgação dos resultados em congressos e/ou periódicos científicos			X	X

INFRAESTRUTURA E EQUIPE

Os experimentos descritos anteriormente serão realizados junto ao Laboratório de Terapia Óptica (LATO, Centro de Lasers e Aplicações do IPEN-CNEN/SP) sob a coordenação da Profª. Dra. Martha S. Ribeiro, com a colaboração e interação dos alunos do grupo. Nosso laboratório possui as instalações necessárias para o desenvolvimento de pesquisas em terapia óptica não térmica em sistemas biológicos e temos total apoio do gerente do CLA, Prof. Dr. Niklaus U. Wetter. Os recursos animais e a infraestrutura para manutenção dos mesmos durante os experimentos serão fornecidos pelo biotério do IPEN-CNEN/SP. Além disso, haverá a colaboração da Profª. Dra. Lorena Pozzo para análise junto ao microPET-CT.

REFERÊNCIAS

1. (WHO) WHO. An estimation of the economic impact of chronic noncommunicable diseases in selected countries. http://www.who.int/chp/working_paper_growth%20model29may.pdf.2006.

2. Alberti KG, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleeman JI, Donato KA, et al. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. Circulation. 2009;120(16):1640-5.

3. Sun S, Ji Y, Kersten S, Qi L. Mechanisms of inflammatory responses in obese adipose tissue. Annu Rev Nutr. 2012;32:261-86.

4. Yoshimura TM, Sabino CP, Ribeiro MS. Photobiomodulation reduces abdominal adipose tissue inflammatory infiltrate of diet-induced obese and hyperglycemic mice. J Biophotonics. 2016.

5. Enerbäck S. Brown adipose tissue in humans. Int J Obes (Lond). 2010;34 Suppl 1:S43-6.

6. Saito M. Brown adipose tissue as a therapeutic target for human obesity. Obes Res Clin Pract. 2013;7(6):e432-8.

7. Seale P, Lazar MA. Brown fat in humans: turning up the heat on obesity. Diabetes. 2009;58(7):1482-4.

8. Virtanen KA, Lidell ME, Orava J, Heglind M, Westergren R, Niemi T, et al. Functional brown adipose tissue in healthy adults. N Engl J Med. 2009;360(15):1518-25.

9. Estimativa 2016. Incidência de câncer no Brasil. http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/index.asp?ID=12016.

10. Ministério da Saúde. PORTARIA Nº 516, DE 17 DE JUNHO DE 2015. http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/sas/2015/prt0516_17_06_2015.html2015.

11. Frigo L, Luppi JS, Favero GM, Maria DA, Penna SC, Bjordal JM, et al. The effect of low-level laser irradiation (In-Ga-Al-AsP - 660 nm) on melanoma in vitro and in vivo. BMC Cancer. 2009;9:404.

12. Ramos Silva C, Cabral FV, de Camargo CF, Núñez SC, Mateus Yoshimura T, de Lima Luna AC, et al. Exploring the effects of low-level laser therapy on fibroblasts and tumor cells following gamma radiation exposure. J Biophotonics. 2016.

13. Santos AJS. Efeitos da terapia com laser de baixa potência em melanoma. Ensaios in vitro. São Paulo, SP, Brazil: Dissertação de mestrado, IPEN-CNEN, SP; 2012.
14. Panchal SK, Brown L. Rodent models for metabolic syndrome research. J Biomed Biotechnol. 2011;2011:351982.
15. Lee M. Determination of the surface area of the white rat with its application to the expression of metabolic results. Am J Physiol -- Legacy Content. 1929;89(1):24-33.
16. Aslakson CJ, Miller FR. Selective events in the metastatic process defined by analysis of the sequential dissemination of subpopulations of a mouse mammary tumor. Cancer Res. 1992;52(6):1399-405.
17. Zhou M, Ku G, Pageon L, Li C. Theranostic probe for simultaneous in vivo photoacoustic imaging and confined photothermolysis by pulsed laser at 1064 nm in 4T1 breast cancer model. Nanoscale. 2014;6(24):15228-35.
18. Pulaski BA, Ostrand-Rosenberg S. Mouse 4T1 breast tumor model. Curr Protoc Immunol. 2001;Chapter 20:Unit 20.2.
19. Lapa P, Silva R, Saraiva T, Figueiredo A, Ferreira R, Costa G, et al. [PET/CT with 18F-Fluorocholine in Patients with Prostatic Cancer in Biochemical Recurrence]. Acta Med Port. 2016;29(3):182-92.
20. Vorselaars WM, Kluijfhout WP, Vriens MR, van der Pol CC, Borel Rinkes IH, Valk GD, et al. Detection of Synchronous Parathyroid Adenoma and Breast Cancer with (18)F-Fluorocholine PET-CT. Nucl Med Mol Imaging. 2016;50(2):180-2.
21. Wang X, Minze LJ, Shi ZZ. Functional imaging of brown fat in mice with 18F-FDG micro-PET/CT. J Vis Exp. 2012(69).
22. Lim S, Honek J, Xue Y, Seki T, Cao Z, Andersson P, et al. Cold-induced activation of brown adipose tissue and adipose angiogenesis in mice. Nat Protoc. 2012;7(3):606-15.
23. Razzoli M, Frontini A, Gurney A, Mondini E, Cubuk C, Katz LS, et al. Stress-induced activation of brown adipose tissue prevents obesity in conditions of low adaptive thermogenesis. Mol Metab. 2016;5(1):19-33.
24. Virtue S, Vidal-Puig A. Assessment of brown adipose tissue function. Front Physiol. 2013;4:128.