

## VARIAÇÃO DO COMPORTAMENTO BIOLÓGICO DO TUMOR HUMANO KB, HETEROTRANSPLANTADO SERIADAMENTE EM RATOS "NUDE" ATÍMICOS\*

Leonor DENARO-MACHADO\*\*  
Suely A. KFOURI\*\*  
Terezinha R. P. OGATA\*\*  
Jesus Carlos MACHADO\*\*  
Gilberto Alvarenga PAULA\*\*\*  
Lúcia Silva BARBOSA\*\*\*  
Regina F. G. FERREIRA\*\*\*  
Selma M. C. N. PETRELLA\*\*

RESUMO: Foram analisados, estatisticamente, os resultados obtidos de estudo de 18 passagens seriadas do tumor humano KB transplantado em ratos nude atímicos. Foram abordados os aspectos de crescimento ou regressão da massa tumoral, bem como a caquexia por vezes detectada no receptor.

UNITERMOS: Rato nude atímico. Tumor humano KB. Hetero-transplante.

### INTRODUÇÃO

Em animais "nude" atímicos, a pega inicial de heterotransplantes de tumores humanos é mais facilmente obtida a partir de linhagens de culturas celulares do que quando os transplantes são realizados com tecidos frescos oriundos de biópsias<sup>4,5,6,8,9</sup>. Por outro lado, a baixa transplantabilidade continuada desses heterotransplantes tem dificultado estudos sobre a variação do comportamento biológico dessas neoplasias transplantadas, bem como a análise dos mecanismos imunológicos de defesa desses animais frente ao tumor.

\* Trabalho realizado com auxílio do CNPq, FAPESP e FEDIB.

\*\* Instituto Butantan — Divisão de Patologia — Seção de Anatomia Patológica.

\*\*\* Instituto de Matemática e Estatística — USP, CEA do Departamento de Estatística.

Instituto Butantan — C.P. 65 — 01051 — São Paulo-SP — Brasil.

Dedicado ao Dr. Saul Schenberg em homenagem ao seu 70º aniversário.

Recebido para publicação em 21-6-1989; aceito em 16-10-1989.



No presente trabalho, apresentamos os resultados obtidos em uma série de 18 passagens de heterotransplantes de tumor humano KB (carcinoma epidermoide de boca) em ratos "nude" atímicos, realizados no período de 1985 a 1987, analisando-se principalmente o aspecto do desenvolvimento da massa tumoral, seja no crescimento ou regressão, com algumas considerações sobre a caquexia por vezes detectada no receptor.

Nosso objetivo principal foi o de avaliar, através da análise estatística dos resultados, o grau de associação existente entre as variáveis estudadas e a malignidade do tumor no decorrer das passagens seriadas.

## MATERIAIS E MÉTODOS

**Animais:** Foram utilizados, para os heterotransplantes, 134 ratos nude atímicos adultos ( $\geq 1$  mês de idade), de ambos os sexos. Esses animais foram mantidos antes e durante a fase de experimentação em condições especiais de biotério, em sala equipada com unidade de ventilação estéril e temperatura e umidade do ar aproximadamente constantes. Alimento e água eram previamente esterilizados e oferecidos "ad libitum".

**Tumor KB:** Os animais foram heterotransplantados com tumor humano KB, uma linhagem de carcinoma epidermoide de boca humano, mantido em cultura desde 1955<sup>7</sup>.

**Inoculações:** A primeira inoculação, designada como passagem zero (P0), foi realizada a partir de tripsinização da cultura e ajuste da suspensão celular para  $1 \times 10^6$  células/ml, tendo sido inoculado um volume final de 1 ml/animal. As demais inoculações foram realizadas por passagem seriada de fragmentos de cerca de  $1 \text{ mm}^3$  do tumor de um animal a outro, com auxílio de trocater, após excisão da massa em crescimento, em condições de assepsia e fragmentação da mesma em meio Eagle. Tais passagens seriadas foram codificadas de P1 a P18 e agrupadas para fins de análise estatística, de modo a conter aproximadamente o mesmo número de animais.

Todas as inoculações foram realizadas subcutaneamente na região axilar esquerda dos animais.

As seguintes variáveis foram analisadas no desenvolvimento do tumor transplantado.

### 1. Crescimento de massa tumoral

A primeira visualização objetiva de um abaulamento na região inoculada é tida como o início de crescimento do tumor transplantado. A incidência assim considerada dessa pega foi de 78%. O tempo decorrido (em dias) desde a inoculação até a visualização do abaulamento variou de 6 a 46 dias.

Quando a massa tumoral atinge um tamanho que dificulta a própria locomoção do animal (cerca de 4,5cm no seu maior eixo) (Foto 1), este é sacrificado e sua massa é extirpada e retransplantada em outros animais.



DENARO-MACHADO, L.; KFOURI, S.A.; OGATA, T.R.P.; MACHADO, J.C.; PAULA, G.A; BARBOSA, L.S.; FERREIRA, R.F.G.; PETRELLA, S.M.C.N. Variação do comportamento biológico do tumor humano KB, heterotransplantado seriadamente em ratos "nude" atímicos. *Mem. Inst. Butantan*, 51(4):169-176, 1989.

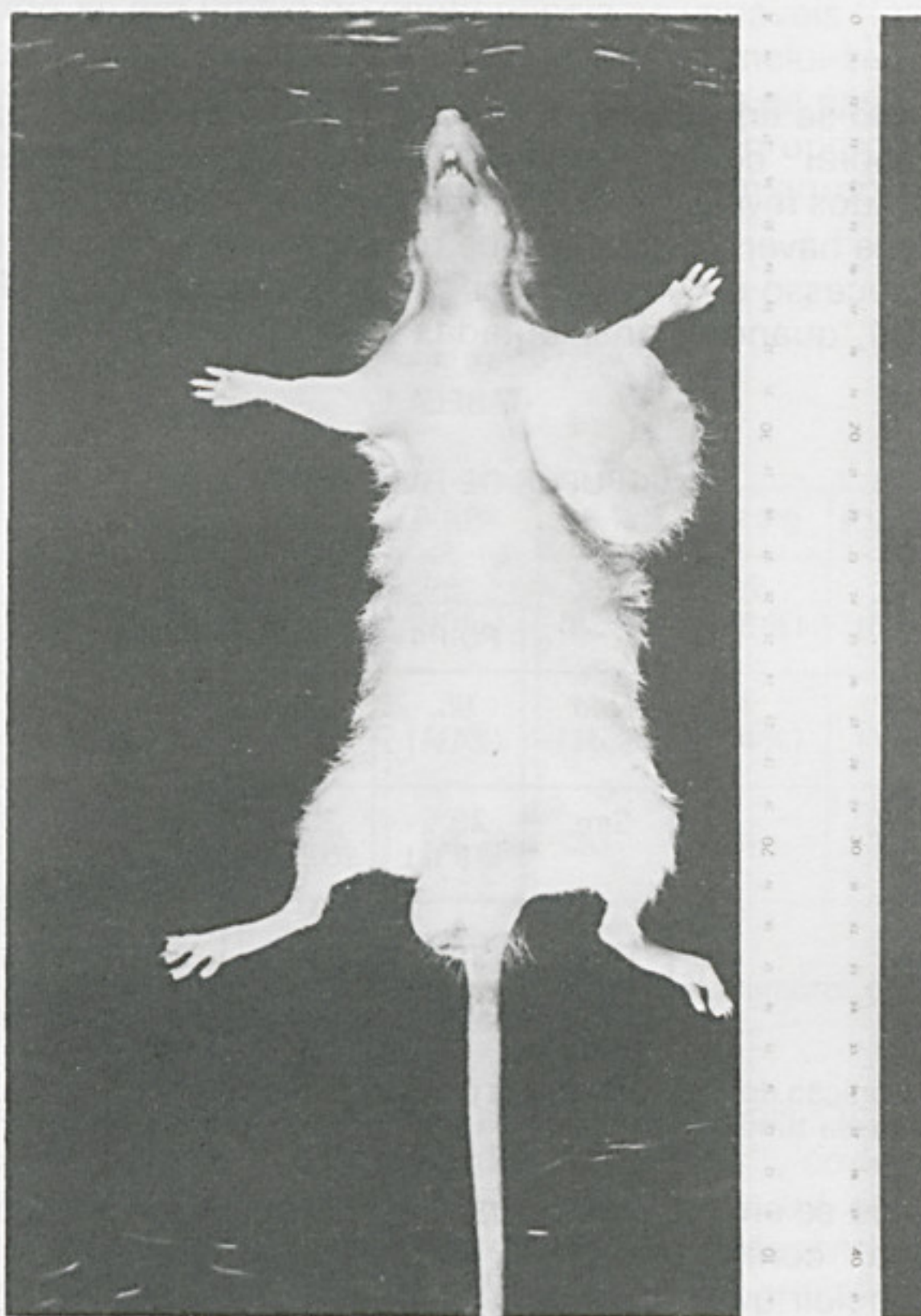


Foto 1: Exemplar de rato nude portador de massa tumoral (tumor KB), desenvolvida na região de inoculação do transplante.

## 2. Regressão:

Em cerca de 12% dos casos, após o crescimento constatado pelo abaulamento, atingindo em média 4,0cm no seu diâmetro maior, o tumor sofreu processo de regressão, culminando com o desaparecimento total da massa anteriormente detectada. O tempo (em dias) para a ocorrência de tal fenômeno, considerado desde o aparecimento da massa até o início de seu desaparecimento, variou de 21 a 78 dias.

## 3. Caquexia:

Trinta e quatro dos animais inoculados (25%) entraram em estado de caquexia e foram então sacrificados para análises complementares. Desse animais, 19 haviam apresentado massa e 15 não. O tempo decorrido para atingir esse estado variou de 22 a 108 dias, a contar do dia em que foram inoculados.

As variáveis acima descritas foram analisadas estatisticamente por testes de homogeneidade (qui-quadrado), em tabelas de contingência e testes para o risco relativo.



## RESULTADOS

Associando-se em tabela de contingência as variáveis "aparecimento de massa tumoral" contra "sucessão de passagens", a análise estatística desses resultados revela que há uma dependência entre esses dois fatores, ou seja, parece haver indícios de que passagens mais iniciais (P0-P6) tiveram menos sucesso de pega que passagens intermediárias (P7-P9) ou finais (P10-P18), quando transplantadas (Tabela I).

TABELA I

### GRUPOS DE PASSAGENS

		P0-P4	P5-P6	P7-P9	P10-P18	Total
Aparecimento da massa	Não	9 (24%)	12 (38%)	4 (14%)	4 (14%)	29 (22%)
	Sim	29 (76%)	20 (62%)	24 (86%)	32 (89%)	105 (78%)
	<b>Total</b>	<b>38</b>	<b>32</b>	<b>28</b>	<b>26</b>	<b>134</b>

$p = 0.04$

Tabela I: Distribuição dos ratos conforme o grupo de passagem e o aparecimento ou não da massa tumoral.

Associando-se em tabela de contingência as variáveis "tempo para aparecer a massa" contra "sucessão de passagens", as estimativas obtidas permitem concluir que o tempo para aparecer a massa tumoral aumenta nos grupos de passagens P5-P9, em relação ao grupo de passagem P0-P4, e diminui no grupo P10-P18 em relação aos grupos P5-P9 (Tabela II).

TABELA II

### GRUPOS DE PASSAGENS

		P0-P4	P5-P6	P7-P9	P10-P18	Total
Tempo p/aparecer a massa (em dias)	6-8	10 (34%)	3 (15%)	3 (13%)	11 (34%)	27
	9-12	8 (28%)	4 (20%)	7 (29%)	16 (50%)	35
	13-17	8 (28%)	8 (40%)	9 (38%)	5 (16%)	30
	<b>Total</b>	<b>29</b>	<b>20</b>	<b>24</b>	<b>32</b>	<b>105</b>

$p = 0.024$

Tabela II: Distribuição dos ratos conforme o grupo de passagem e o tempo para aparecer a massa.



DENARO-MACHADO, L.; KFOURI, S.A.; OGATA, T.R.P.; MACHADO, J.C.; PAULA, G.A; BARBOSA, L.S.; FERREIRA, R.F.G.; PETRELLA, S.M.C.N. Variação do comportamento biológico do tumor humano KB, heterotransplantado seriadamente em ratos "nude" atímicos. *Mem. Inst. Butantan*, 51(4):169-176, 1989.

Associando-se em tabela de contingência as variáveis "aparecimento da regressão" contra "sucessão de passagens", conclui-se não haver indícios de que a regressão da massa tumoral dependa da passagem utilizada no transplante (Tabela III). Note-se que a proporção de "não aparecimento de regressão" varia muito pouco de um grupo de passagem para outro.

TABELA III

GRUPOS DE PASSAGENS

		P0-P4	P5-P6	P7-P9	P10-P18	Total
Aparecimento da regressão	Não	26 (90%)	17 (85%)	23 (96%)	26 (81%)	92 (88%)
	Sim	3 (10%)	3 (15%)	1 (4%)	6 (19%)	13 (12%)
	<b>Total</b>	<b>29</b>	<b>20</b>	<b>24</b>	<b>32</b>	<b>105</b>

$p = 0.45$

Tabela III: Distribuição dos ratos que desenvolveram crescimento tumoral, conforme o grupo de passagem e a ocorrência ou não de regressão.

Associando-se em tabela de contingência as variáveis "tempo para aparecer a regressão" contra "sucessão das passagens", conclui-se que há indícios de que há dependência direta entre esses fatores, embora não tenha sido possível detectar como se comporta essa dependência, devido ao número insuficiente de ratos que apresentaram regressão (Tabela IV).

TABELA IV

GRUPOS DE PASSAGENS

		P0-P4	P5-P6	P7-P9	P10-P18	Total
Tempo p/aparecer a regressão (em dias)	21-55	0	3	0	4	7
	56-78	3	0	1	2	6
	<b>Total</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>6</b>	<b>13</b>

$p = 0.07$

Tabela IV: Distribuição dos ratos conforme o grupo de passagem e o tempo para aparecer a regressão.

O teste de homogeneidade em tabela de contingência entre as variáveis "aparecimento da regressão" e "tempo para aparecer a massa" não mostrou indícios de dependência entre essas duas variáveis (Tabela V).



DENARO-MACHADO, L.; KFOURI, S.A.; OGATA, T.R.P.; MACHADO, J.C.; PAULA, G.A; BARBOSA, L.S.; FERREIRA, R.F.G.; PETRELLA, S.M.C.N. Variação do comportamento biológico do tumor humano KB, heterotransplantado seriadamente em ratos "nude" atímicos. Mem. Inst. Butantan, 51(4):169-176, 1989.

TABELA V

TEMPO P/ APARECER A MASSA (EM DIAS)

		0-8	9-12	13-17	18-47	Total
Aparecimento da regressão	Não	21	30	28	13	92
	Sim	6	5	2	0	13
	<b>Total</b>	<b>27</b>	<b>35</b>	<b>30</b>	<b>13</b>	<b>105</b>

$p = 0.40$

Tabela V: Distribuição dos ratos conforme o tempo para aparecer a massa e o aparecimento ou não da regressão.

Da mesma forma, quando as variáveis "tempo para aparecer a massa" e "tempo para aparecer a regressão" são confrontadas num diagrama de dispersão (Fig. 1), conclui-se não haver indícios de que o tempo para aparecer a massa dependa linearmente do tempo para aparecer a regressão (correlação = - 0,063).

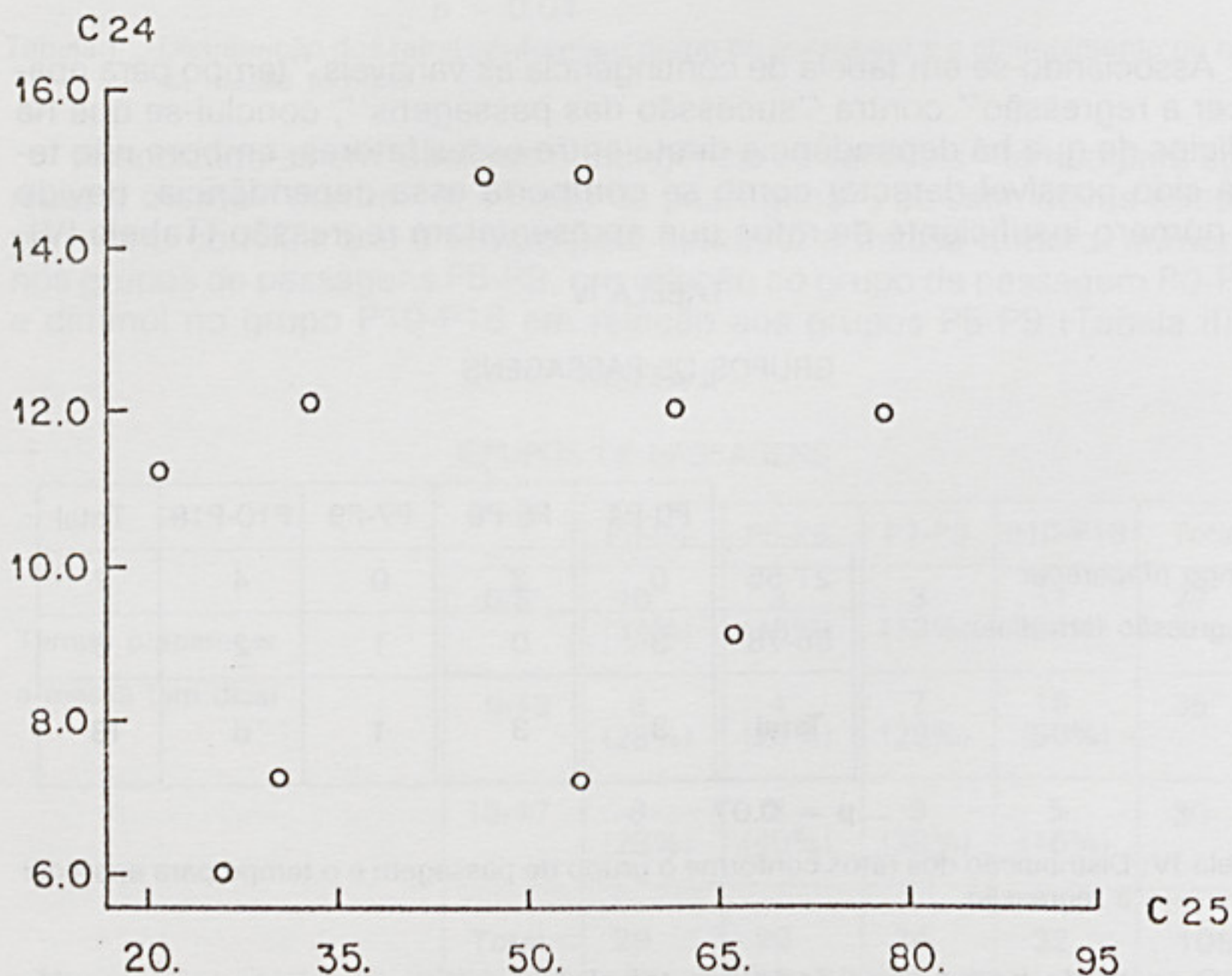


Figura 1: Diagrama de dispersão entre as variáveis "tempo para aparecer a massa" (C 24) e "tempo para aparecer a regressão" (C 25).



Com relação ao fator "caquexia", aplicando-se o teste não paramétrico para o risco relativo<sup>1</sup>, conclui-se que não há indícios de que a passagem em que o tumor foi inoculado, ou que o tempo para aparecer a massa tumoral, influenciem no aparecimento da caquexia.

## DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

O valor de um modelo biológico experimental depende de sua estabilidade, seja concernente às semelhanças existentes com o modelo original, seja concernente à sua manutenção e repetitividade a longo termo.

No modelo rato nude atímico transplantado com tumor humano a estabilidade consiste na permanência da identidade original do tumor humano e a repetitividade consiste em passar esse tumor no animal por período de tempo suficiente que permita investigações biológicas do transplante e do transplantado, ou mesmo estudos básicos terapêuticos.

Wallace et al, 71<sup>11</sup> estudaram o crescimento de células KB em hamsters recém-nascidos tratados com soro anti-timocítico anti-hamster (ATS) ou soro normal de coelho (NRS). Uma única injeção de ATS pode promover a formação de tumor KB metastático numa maior proporção de animais, enquanto que apenas poucos animais dos tratados com NRS desenvolviam pequenos tumores que ocasionalmente regrediam.

Sudo, 87<sup>10</sup> também relatou o transplante dessa mesma linhagem KB em camundongos nude, porém esplenectomizados e irradiados.

Nosso modelo experimental rato nude atímico/tumor humano KB sem nenhum outro artefato, vem sendo mantido em passagens seriadas em nosso laboratório desde 1985<sup>3</sup>, encontrando-se atualmente na passagem 29.

Este nosso estudo, concernente à estabilidade do modelo a longo termo, compara bioestatisticamente as diferenças observadas entre as passagens iniciais do tumor e as passagens mais avançadas.

Assim, essa análise indica que, à medida que o número da passagem aumenta, há uma maior probabilidade de aparecer a massa tumoral no animal transplantado, mostrando haver uma interação entre a estrutura antigênica da célula tumoral e a competência do microambiente do hospedeiro.

Corroborando ainda essa interação transplante/hospedeiro, pudemos verificar que em passagens intermediárias e finais o tempo requerido para o aparecimento do crescimento tumoral foi menor que nas passagens iniciais.

As regressões tumorais observadas (12%) podem ser explicadas pelos mecanismos de defesa individuais do hospedeiro, atuando contra o crescimento tumoral. Essa regressão não se mostrou dependente da passagem mais ou menos avançada do tumor, nem do tempo requerido para o aparecimento do crescimento tumoral, nem ainda há indícios de que o tempo para aparecer a massa tumoral dependa do tempo para aparecer a regressão.

No que tange o fator caquexia, presente na maioria dos ratos inoculados, após um período variável de 22 a 108 dias, não há indícios de que a passagem em que o tumor foi inoculado influencie sobre esse fator e nem há indícios de que o tempo levado para aparecer a massa tumoral influencie no aparecimento do estado de caquexia.

Os resultados no caso do crescimento da massa tumoral, vieram cor-



DENARO-MACHADO, L.; KFOURI, S.A.; OGATA, T.R.P.; MACHADO, J.C.; PAULA, G.A; BARBOSA, L.S.; FERREIRA, R.F.G.; PETRELLA, S.M.C.N. Variação do comportamento biológico do tumor humano KB, heterotransplantado seriadamente em ratos "nude" atímicos. *Mem. Inst. Butantan*, 51(4):169-176, 1989.

roborar achados histológicos que sugerem o aumento da malignidade do tumor seriadamente transplantado<sup>2</sup>.

Assim, à medida que as passagens seriadas se sucederam, os valores médios do volume cariométrico das células componentes do tumor, aumentaram significativamente e, da mesma forma, o número de mitoses aumentou consideravelmente.

ABSTRACT: The results obtained from the study of 18 serial passages of human tumor KB transplanted in athymic nude rats have been statistically analysed. Aspects of growth or regression of the tumoral mass, as well as the cachexy sometimes detected in the receptor, have been approached.

KEY WORDS: Athymic nude rat. Human tumor KB. Heterotransplant.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. DACHS, J. N. W. & PAULA, G. A. Testing for ordered rate ratios in follow-up studies with incidence density data. *Rebrape*, 2:125-137, 1988.
2. DENARO-MACHADO, L.; MACHADO, J. C.; LONGO, M. A.; OGATA, T. R. P.; DAVID, M. L. V. M. G.; KFOURI, S. A.; CARNEIRO, S. M. Heterotransplante de células KB em ratos nude atímicos II. Estudos morfológicos. *Acta Oncol. Bras.*, 8:21-25, 1988.
3. DENARO-MACHADO, L.; OGATA, T. R. P.; LONGO, M. A.; DAVID, M. L. V. M. G.; KFOURI, S. A.; MACHADO, J. C. Heterotransplante seriado de linhagem celular tumoral humana (KB) em ratos nude atímicos. I. Estudos biológicos. *Acta Oncol. Bras.*, 7:115-117, 1987.
4. GIOVANELLA, B. C.; STEHLIN, I. S.; WILLIAMS, L. I. Heterotransplantation of human malignant tumors in the nude thymusless mice. II. Malignant tumors induced by injection of cell cultures derived from human solid tumors. *J. Nat. Cancer Inst.*, 52:921-930, 1974.
5. GIOVANELLA, B. C.; STEHLIN, I. S.; WILLIAMS, L. I. et al. Heterotransplantation of human cancer into nude mice: a model system for human cancer chemotherapy. *Cancer*, 42:2.269-2.281, 1978.
6. GIOVANELLA, B. C.; YIN, S. O.; STEHLIN, I. S. et al. Development of invasive tumors in the "nude" mouse after injection of cultured human melanoma cells. *J. Nat. Cancer Inst.*, 48:1.531-1.533, 1972.
7. HARRY, E. Propagation in a fluid medium of a human epidermoid carcinoma, strain KB (21811). *Proc. Soc. exp. Biol.*, 89:362-364, 1955.
8. KYRIAZIZ, A. P. et al. Growth patterns and metastatic behavior of human tumors growing in athymic mice. *Cancer Res.*, 38:3.186-3.190, 1978.
9. SHARKEY, F. E. & FOGH, I. Metastasis of human tumor xenografts in nude mice. *Invasion and metastasis*, 4:209-224, 1979.
10. SUDO, K. Improvement of transplantability of human neoplastic cells to nude mice. *Jap. J. exp. Med.*, 57:189-192, 1987.
11. WALLACE, R.; VASINGTON, P. I.; PETRICCIANI, I. C. Heterotransplantation of cultured cell lines in newborn hamsters treated with antilymphocyte serum. *Nature*, 230:454-455, 1971.