

# Heterotransplante seriado de linhagem celular tumoral humana (KB) em ratos nude atímicos

## I — Estudos biológicos

LEONOR DENARO MACHADO<sup>1</sup>, TEREZINHA REGINA PRUPERE OGATA<sup>2</sup>, MARIA ANTONIETA LONGO<sup>2</sup>,  
MARIA LUÍZA V. MIRRA GIBELLI DAVID<sup>3</sup>, SUELY APARECIDA KFOURI<sup>3</sup>, JESUS CARLOS MACHADO<sup>4</sup>

Unitermos: Heterotransplante tumoral. Ratos nude.

Key words: Tumoral heterotransplant. Nude rats.

**RESUMO** — Os AA. relatam o comportamento biológico de tumores crescidos em ratos nude, pós-transplante de oito passagens sucessivas de linhagem celular tumoral humana (KB), enfatizando a possibilidade de utilização desse modelo experimental em estudos biológicos, fisiológicos e terapêuticos dos tumores assim gerados.

## INTRODUÇÃO

Linhagens celulares neoplásicas malignas humanas, cultivadas *in vitro*, quando transplantadas em animais nude atímicos, têm mostrado maior sucesso que heterotransplantes de tecidos tumorais frescos<sup>(3,4,8,11)</sup>.

Em ambos os casos, no entanto, tem-se constatado nesses animais o freqüente comportamento não metastático desses tumores, fato que tem motivado pesquisas no sentido de aplicar estratégias que favorecessem a obtenção de metástases. Uma delas, por exemplo, é a utilização de animais recém-nascidos nos quais a atividade celular natural killer (NK) é ainda incipiente<sup>(2,5,6,7)</sup>.

A obtenção das metástases ajudaria não somente a compreensão dos mecanismos favorecedores das mesmas, como também a aproximar mais o comportamento do tumor experimental, do seu comportamento no hospedeiro humano original.

No presente trabalho, relatamos o comportamento biológico de linhagem celular tumoral humana, que, transplantada em ratos nude atímicos, gerou a produção de tumores e massas metastáticas. Trata-se da linhagem KB, originária de carcinoma de boca, humano, mantida em cultura permanente desde 1954<sup>(1)</sup>.

Enfatizamos, ainda, a possibilidade do uso desse modelo experimental para estudos biológicos, fisiológicos e terapêuticos dos tumores assim gerados.

## MATERIAIS E MÉTODOS

**Células tumorais** — Células da linhagem KB, adquiridas do Instituto Adolfo Lutz, são mantidas *in vitro*, crescendo em monocamada, em meio Eagle suplementado com 10% de soro bovino fetal.

**Animais** — Para os heterotransplantes, foram usados ratos nude homocigotos (rnu/nu), atímicos, de ambos os sexos, cujas matrizes foram provenientes do CNRS (França) e que são mantidos em biotério próprio da Seção de Anatomia Patológica do Instituto Butantã em condições semiconvencionais. Oitenta e três animais adultos, entre um e dois meses de idade e 11 animais recém-nascidos, com idade não superior a dois dias, foram inoculados.

**Inoculações** — Para a primeira inoculação, realizada em animais adultos, as culturas celulares foram tripsi-

Trabalho realizado com auxílio da FAPESP, CNPq, FEDIB e FUN-DAP e apresentado no VI Congresso Regional Sul de Patologia, da Sociedade Brasileira de Patologistas, Londrina (Paraná), julho, 1986. Aprovado para publicação em 17.9.87.

<sup>1</sup> Chefe da Seção de Anatomia Patológica do Instituto Butantã.

<sup>2</sup> Assistentes da Seção de Anatomia Patológica do Instituto Butantã.

<sup>3</sup> Estagiários da Seção de Anatomia Patológica do Instituto Butantã.

<sup>4</sup> Diretor da Divisão de Patologia do Instituto Butantã.

nizadas (solução de tripsina 0,25% em PBS), lavadas em meio Eagle e a suspensão ajustada para  $1 \times 10^6$  células/ml, para serem inoculadas num volume final de 1ml/animal.

As demais inoculações foram sempre realizadas por passagem seriada do tumor, de um animal a outro. Para tanto, a massa tumoral em crescimento era extirpada em condições ótimas de assepsia, fragmentada numa placa de Petri contendo meio Eagle e os fragmentos de cerca de  $1\text{mm}^3$  inoculados nos animais, com auxílio de um trocar-te.

Todas as inoculações sucessivas, em número de oito, foram realizadas subcutaneamente, na região axilar do animal<sup>(9)</sup>.

*Avaliação do crescimento tumoral* — Os animais inoculados eram observados diariamente, no sentido de determinar o dia zero da visualização da massa tumoral em crescimento e sua evolução. Essa visualização se faz possível quando a massa tumoral alcança cerca de 0,5cm, no seu maior eixo.

Animais nos quais o crescimento da massa tumoral era excessivo, conduzindo-o a um estado de caquexia, eram sacrificados e submetidos à autópsia.

Seis animais portadores de massa tumoral foram preservados, a fim de se determinar o tempo de sobrevivência.

## RESULTADOS E CONSIDERAÇÕES

A inoculação de células KB em ratos adultos homozigotos para o gene nude (rnu/nu) provocou o crescimento de massa tumoral, no local da inoculação, em 82% dos casos, sem que tivesse havido invasão de tecidos subjacentes ao subcutâneo ou propagação à distância. Biópsias da massa tumoral puderam ser retransplantadas seriadamente, com sucesso, a outros animais geneticamente semelhantes.

A implicação das células NK como mecanismo de defesa exacerbado em animais nude<sup>(2,6,10)</sup> e a possível inexistência dessas células ao nascimento<sup>(5)</sup> foram o fato que nos levou à inoculação das células KB em animais recém-nascidos, embora experimentos semelhantes com outras linhagens celulares tumorais humanas não tivessem viabilizado crescimento tumoral. Em nossos experimentos, a inoculação de células KB em ratos nude recém-nascidos também apresentou percentagem de sucesso semelhante àquela de adultos (82%), embora o comportamento biológico do tumor tenha se mostrado diverso. Assim, em

56% dos animais inoculados houve, além do crescimento da massa no local da inoculação, o aparecimento de metástases múltiplas, mesmo sem a remoção da massa primitiva, fator esse, segundo alguns autores<sup>(10,12)</sup>, facilitante da metastatização.

As principais localizações metastáticas foram encontradas em pulmões, fígado, epíploon, linfonodos mesentéricos e axilares e baço. Formação de ascite hemorrágica foi encontrada em um dos casos. Excetuando-se as metástases hepáticas, material tumoral colhido por biópsias de outras metástases, inclusive de centrifugado de líquido ascítico, viabilizou crescimento tumoral em outros espécimens.

Inoculações de células KB, realizadas concomitantemente em animais heterozigotos para o gene nude (rnu/+), tanto adultos quanto recém-nascidos, não resultaram em qualquer manifestação de crescimento tumoral.

Nos animais nude inoculados ao nascimento, a massa tumoral do local da inoculação apareceu mais tardiamente e cresceu mais lentamente que nos adultos (tabela), parecendo haver relação inversa entre o tamanho da massa local e o aparecimento de metástases.

Em três animais adultos inoculados, observou-se fenômeno de regressão espontânea da massa tumoral. As massas, atingindo cerca de 7cm de diâmetro, sofreram um período estacionário de crescimento, após o que seu desaparecimento foi abrupto, restando macroscopicamente um nódulo endurecido no local anteriormente ocupado pela massa. Tais estudos serão objeto de publicação futura.

Os seis animais adultos portadores de massa tumoral, que foram preservados para se determinar o tempo de sobrevivência, chegaram a alcançar 108 dias, a contar da data da visualização da massa em crescimento. Nesse momento, o tamanho da massa era de cerca de 10cm no seu maior eixo e já não mais permitia a locomoção dos animais, que foram então sacrificados.

Concluindo, os resultados por nós obtidos demonstram que o modelo biológico experimental rnu/tumor

TABELA  
Tempo médio (em dias) para a visualização de crescimento de massa tumoral nas diversas passagens

	P0	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8
Adultos	30	11	15	9	13	16	13	13	10
Recém-nascidos	—	—	—	25	20	—	19	21	—

humano KB é um modelo promissor para estudos da morfofisiologia do tumor e dos mecanismos de defesa do hospedeiro, bem como para testes de drogas terapêuticas, a médio e longo prazo.

### SUMMARY

*The authors describe the biological behavior of tumors grown in nude rats transplanted in 8 serial passages with human tumor KB cell line, emphasizing the possibility of utilization of this experimental model in biological and physiological studies, as well as in therapeutic assays.*

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. EAGLE, H Propagation in a fluid medium of a human epidermoid carcinoma strain KB. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 89: 362, 1955.
2. FREEDMAN, VH & SHIN, S Use of nude mice for studies on the tumorigenicity of animal. In: FOGH, J The nude mouse in experimental and clinical research. New York, Academic Press, 1978. p. 371-384, v. 1.
3. GIOVANELLA, BC; STEHLIN, JS; WILLIAMS, LJ Heterotransplantation of human malignant tumors in nude thymusless mice. II. Malignant tumors induced by injection of cell cultures derived from human solid tumors. J. Natl. Cancer Inst. 52: 921-930, 1974.
4. \_\_\_\_\_ et al Heterotransplantation of human cancer into nude mice: a model system for human cancer chemotherapy. Cancer, 42: 2.269-2.281, 1978.
5. HANNA, N Expression of metastatic potential of tumor cells in young nude mice is correlated with low levels of natural killer cell-mediated cytotoxicity. Int. J. Cancer, 26: 675-680, 1980.
6. \_\_\_\_\_ et al Environmental and genetic factors determine the level of NK activity of nude mice and effect their suitability as models for experimental metastasis. Int. J. Cancer, 30: 371-376, 1982.
7. HERBERMANN, RB Natural cell-mediated cytotoxicity in nude mice. In: FOGH, J The nude mouse in experimental and clinical research. New York, Academic Press, 1978. p. 135-166, v. 1.
8. KYRIAZIZ, AP et al Growth patterns and metastatic behavior of human tumors growing in athymic mice. Cancer Res. 38: 3.186-3.190, 1978.
9. \_\_\_\_\_ Preferential sites of growth of human tumors in nude mice following subcutaneous transplantation. Cancer Res. 40: 4.509-4.511, 1980.
10. NEULAT-DUGA, I et al Metastases of human tumor xenografts in nude mice. Invasion Metas 4: 209-224, 1984.
11. SHARKEY, FE & FOGH, J Metastasis of human tumors in athymic nude mice. Int. J. Cancer 24: 733-738, 1979.
12. \_\_\_\_\_ et al Experience in surgical pathology with human tumor growth in the nude mouse. In: FOGH, J The nude mouse in experimental and clinical research. New York, Academic Press, 1978. p. 187-214, v. 1.

# TELE-CAN

# 270-1233

Para maiores informações, procure a Rede Feminina de Combate ao Câncer, da Fundação Antônio Prudente, pelo telefone (011) 278-0826, das 12 às 18 horas, ou à Rua Professor Antônio Prudente, 211 01509 - Liberdade - São Paulo