

# Heterotransplante de células KB em ratos nude atímicos

## II — Estudos morfológicos

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

**Unitermos:** Heterotransplantes. Ratos nude. Morfologia óptica. Morfologia eletrônica.

**Key words:** Heterotransplants. Nude rats. Optical morphology. Electronic morphology.

**RESUMO** — Estudos morfológicos de microscopia óptica e eletrônica foram realizados em tumores crescidos em ratos nude atímicos, pós-transplantes de linhagem celular tumoral humana de carcinoma epidermóide de boca (KB), desde a 1.<sup>a</sup> inoculação realizada, até a 8.<sup>a</sup> passagem seriada do tumor nesses animais. Os autores descrevem o aumento do volume celular e nuclear, bem como a elevação do número de mitoses e uma maior velocidade de crescimento da massa tumoral, à medida que as passagens seriadas do tumor se sucedem. Também foi observado que, com o progredir dessas passagens, a reação inflamatória por parte do hospedeiro aumenta.

## INTRODUÇÃO

Relatos de transplantes de linhagens celulares de tumores humanos em animais nude atímicos ressaltam a preservação das características biomorfológicas e fisiológicas originais dessas linhagens<sup>(2,3,4)</sup>.

A linhagem celular tumoral humana KB (carcinoma epidermóide de boca) estabelecida *in vitro* desde 1954<sup>(1)</sup> vem sendo transplantada com sucesso, em ratos nude atímicos, na Seção de Anatomia Patológica do Instituto Butantã.

No presente trabalho são relatados os estudos morfológicos de microscopia óptica e eletrônica realizados nas massas tumorais primitivas e metastáticas desenvolvidas nos animais transplantados, em oito passagens seriadas do tumor.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Utilizamos, neste estudo, 78 biópsias de tumores desenvolvidos em ratos nude adultos e recém-nascidos, heterotransplantados com células da linhagem KB, desde a 1.<sup>a</sup> inoculação (P0) até a 8.<sup>a</sup> passagem seriada do tumor (P8).

Após a autópsia do animal, seguindo sua morte natural ou sacrifício, foram retirados fragmentos da massa tumoral primitiva, de eventuais metástases e dos demais órgãos que foram submetidos ao exame histopatológico, após serem tratados pelos processos usuais da rotina histológica (fixação em formalina 10% tamponada e coloração HE).

Da mesma forma, pequenos fragmentos da massa tumoral foram preparados para exame ao microscópio eletrônico, sendo para tanto fixados por duas horas em glutaraldeído a 2% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,3, e uma hora em tetróxido de ósmio a 1%, no mesmo tampão. Após passagem *overnight* em acetato de uranila 0,5%, seguiu-se desidratação em série etanólica e embebedimento em resina *Epon*. Cortes finos (0,25  $\mu$ m) foram contrastados com acetato de uranila 2% e citrato de chumbo segundo Reynolds<sup>(5)</sup>. O exame das preparações foi realizado em microscópio eletrônico *Zeiss EM 9S*.

Trabalho realizado com auxílio da FAPESP, CNPq, FEDIB, FUNDAP e CNRS, na Seção de Anatomia Patológica do Instituto Butantã. Aprovado para publicação em 26/10/87.

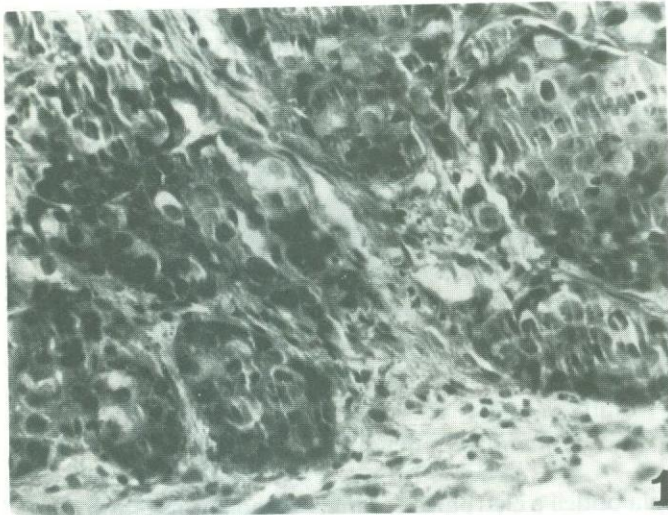
1. Chefe da Seção.

2. Diretor da Divisão de Patologia.

3. Assistente da Seção.

4. Estagiário da Seção.





**Fig. 1** — Corte histológico de massa tumoral transplantada inicialmente (P0). Os blocos de células tumorais exibem características epidermóides, sendo predominantes elementos de citoplasma mais escuro e praticamente sem figuras de mitose (HE, 200x).

Cortes semifinos ( $0,5\mu\text{m}$ ) das mesmas inclusões foram também preparados para exame ao microscópio óptico e corados com solução de azul de toluidina 1% e Azur II 1% (1:1).

Da análise das preparações histológicas, foram levantadas as médias dos valores cariométricos de 100 células das passagens P0, P2, P6, P7 e P8. Para essa análise, foi utilizada ocular cariométrica 8x e objetiva 100x. A esses valores foi aplicado o teste estatístico *t* de Student, para um nível de significância  $P \leq 0,01$  (99%), de acordo com a fórmula de Valletti e Lison:

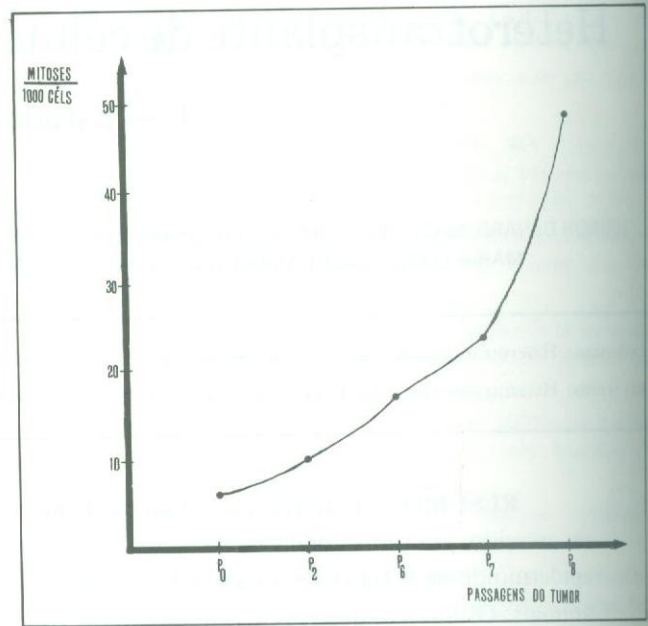
$$V\mu^3 = \frac{\Pi}{6} \cdot \left[ \frac{DI + DII}{2} \right]^3$$

onde V é o volume nuclear, DI é o diâmetro maior do núcleo e DII é o diâmetro menor do núcleo.

Para essas mesmas passagens do tumor, foi calculado o índice mitótico em 1.000 células, ao qual foi aplicado o teste estatístico de duas médias.

## RESULTADOS

O aspecto anatomopatológico do primeiro tumor desenvolvido era de um carcinoma espinocelular, moderadamente diferenciado, caracterizado por proliferação de células que se assemelhavam às espinhosas, sendo estas polimorfos, com arranjo em faixas, de citoplasma eosinófilo mais claro ou escuro, núcleos hiper cromáticos,



**Gráfico 1** — Curva demonstrativa do aumento do índice mitótico em relação ao avanço das passagens seriadas, pela contagem de 1.000 células em cada passagem assinalada

cos, nucléolo proeminente e pequeno número de mitoses (fig. 1).

Com o decorrer das passagens seriadas e sucessivas, o tumor sofreu algumas alterações morfológicas detectáveis. As mitoses se tornaram mais frequentes e aberrantes (gráfico 1). Esse aumento do número de mitoses foi estatisticamente significativo para  $P \leq 0,01$  (99%). Às células de citoplasma mais escuro, que predominavam nas primeiras passagens, foram se entremendo outras maiores, com citoplasma de aspecto mais claro e por vezes vesiculoso (fig. 2). Aplicado o teste estatístico *t* de Student para os valores cariométricos, houve significância para  $P \leq 0,01$  (99%) (gráfico 2).

Nas passagens P0, P1 e P2, quase não se notava reação inflamatória peritumoral. A partir da passagem P3, o processo inflamatório na periferia do tumor era por vezes discreto, por vezes exuberante e caracterizava-se por infiltrado linfoplasmocitário e histiocitário, além de presença de proliferação fibrosa.

Em dois dos 16 casos de inoculação do tumor em sua passagem P3, em animais recém-nascidos, foram detectadas metástases generalizadas, localizadas no peritônio, fígado, linfonodos mesentéricos, hilares e subaxilares. Macroscopicamente, essas metástases caracterizavam-se por massas de tecido mole, acinzentado, que recobriam o peritônio e o fígado. No tórax, havia a mas-



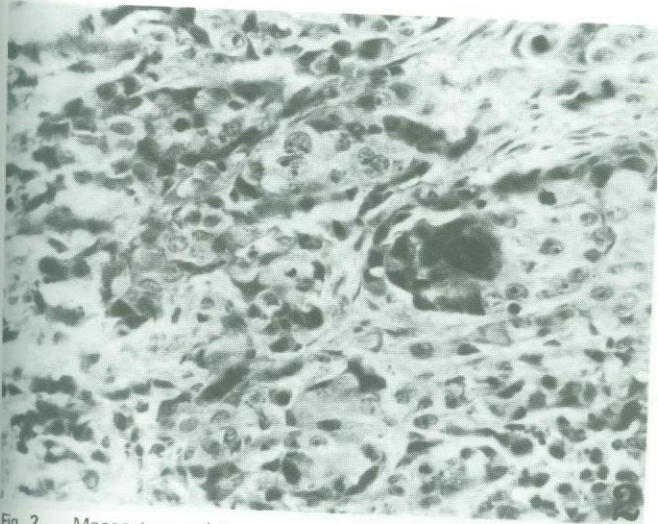


Fig. 2 — Massa tumoral transplantada (P8). As células tumorais dispostas em blocos mostram menor número de células de citoplasma escuro, maior número de mitoses e elementos de maior volume aparente (HE, 200x).

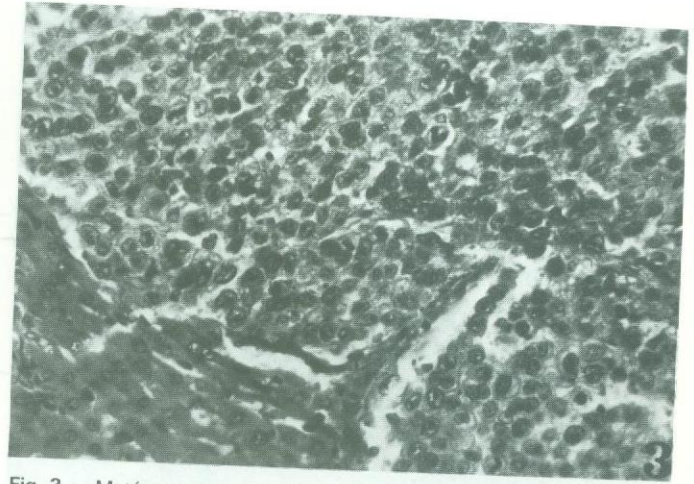


Fig. 3 — Metástase hepática (P3). As células são relativamente homogêneas. O polimorfismo nuclear não é intenso. Chama a atenção a presença de elevado número de mitoses (HE, 200x).

sa primitiva na região subaxilar esquerda, com comprometimento de linfonodos hilares e subaxilares. O fígado apresentava massas irregulares com diâmetros variando de 0,2 a 1cm. Havia também comprometimento de linfonodos mesentéricos. Em um desses casos, ascite sero-hemorrágica também foi notada.

Histologicamente, as metástases lembravam a sua origem carcinomatosa epidermóide, sendo, no entanto, mais indiferenciadas, onde predominavam células de citoplasma claro e com grande número de mitoses (fig. 3). A ascite também apresentou células tumorais semelhantes às descritas para metástase.

Um caso, dos 16 inoculados com a passagem P3, e dois casos, dos 15 inoculados com a passagem P4, apresentaram metástases pulmonares, localizadas em lobo pulmonar, circunscritas e de aspecto microscópico semelhante ao já descrito.

Houve regressão espontânea do tumor em três casos da passagem P3, que serão objeto de publicação à parte.

Ao microscópio eletrônico, o núcleo das células mais claras apresentava cromatina dispersa e um ou dois nucléolos grandes; o citoplasma, rico em ribossomos, apresentava poucas faixas de retículo endoplasmático rugoso (fig. 4). Em secções orientadas mais favoravelmente, aparelho de Golgi moderadamente desenvolvido podia ser observado. As mitocôndrias eram pequenas e numerosas. Tonofilamentos não eram comuns. Desmosomos eram raros e, quando presentes eram atípicos e po-

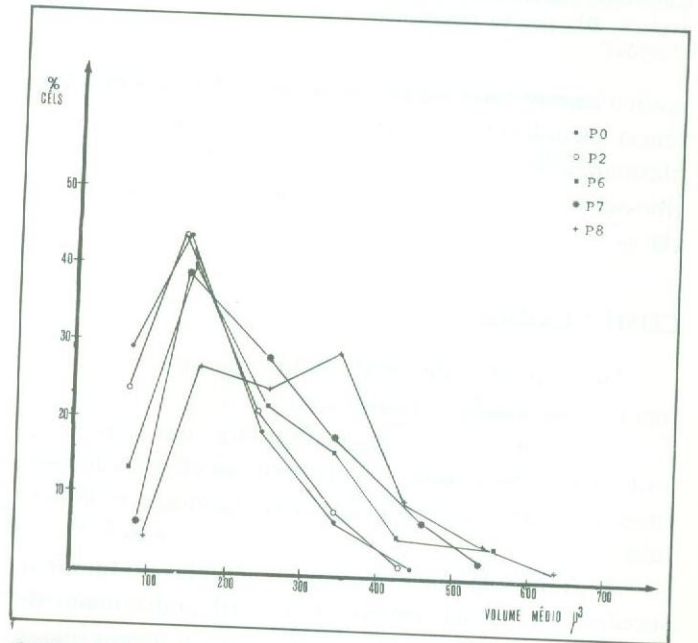
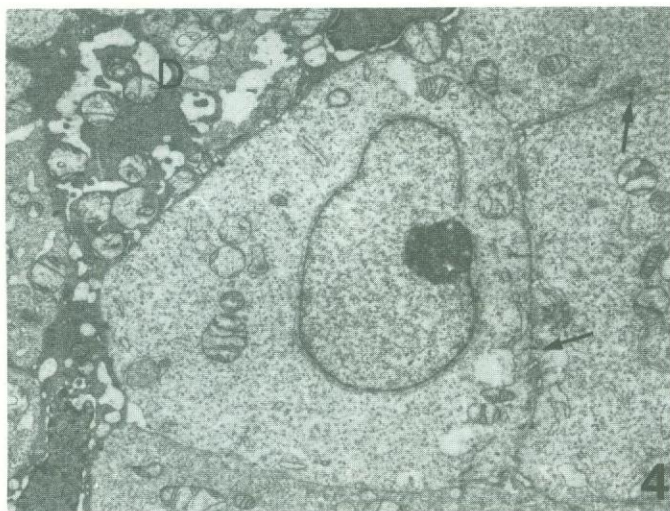


Gráfico 2 — Valores médios do volume cariométrico revelados pela medição de 100 células em cada passagem assinalada

brememente desenvolvidos. Projeções citoplasmáticas semelhantes a espículas ou rígidos microvilos podiam ser vistos, direcionados para os espaços livres extracelulares, fazendo lembrar a origem espinocelular dessas células. Essas projeções não eram conectadas por complexos junccionais.

As células mais escuras eram menores que as mais claras; seu perfil nuclear, geralmente irregular, apresentando cromatina compacta e um ou dois nucléolos bem desenvolvidos. Cisternas dilatadas do retículo endoplas-





**Fig. 4** — Eletromicrografia de célula tumoral "clara". Citoplasma com numerosos polirribossomos livres. As setas apontam desmossomos atípicos. **D** porção citoplasmática de uma célula tumoral escura (7.000x).

mático rugoso e mitocôndrias inchadas davam uma aparência vacuolizada ao citoplasma (fig. 5). A matriz citoplasmática, nessas células, tinha uma densidade maior de ribossomos livres e era mais eletrodensa que nas células claras.

## COMENTÁRIOS

Os resultados até então obtidos permitem-nos enumerar as seguintes conclusões:

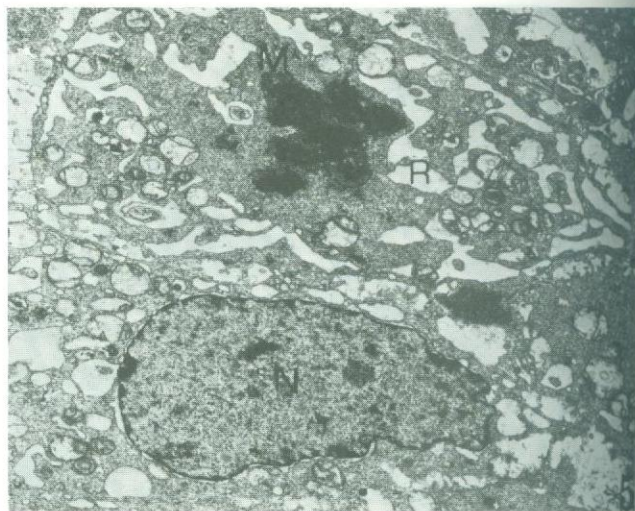
1) O componente celular do tumor, nas suas sucessivas passagens seriadas, não perdeu sua identidade morfológica primitiva de carcinoma epidermóide espinocelular;

2) À medida que as passagens seriadas do tumor se sucediam, as células pareciam adquirir poder maior de crescimento, revelado pelo tempo cada vez menor que se necessitava para a visualização da massa tumoral;

3) À medida que as passagens seriadas do tumor se sucediam, as células iam aumentando gradativamente de volume, como se pode verificar pelo gráfico 2;

4) Também, na sucessão dessas passagens seriadas, o número de mitoses aumentou consideravelmente (gráfico 1);

5) O fato da existência de uma reação inflamatória crescente, a partir da passagem 3, parece demonstrar que as células tumorais pudessem ter adquirido graus maiores de antigenicidade, suscitando, assim, a reação do organismo hospedeiro;



**Fig. 5** — Eletromicrografia de células tumorais "escuras". **M** figura mitótica. Notem-se cisternas dilatadas do retículo endoplasmático rugoso (**R**) e mitocôndrias inchadas. **N** núcleo com cromatina mais compacta que nas células tumorais claras (7.000x).

6) As alterações de coloração do citoplasma das células tumorais de mais escuro para predominantemente mais claro podem indicar indiferenciação celular. Isso será analisado posteriormente, com aplicação de metodologia utilizando anticorpos monoclonais específicos para queratina.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Professor Assistente Doutor Paulo Eduardo Pereira Leite, do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, pela análise estatística dos resultados.

Agradecem também aos pesquisadores científicos Ronaldo Zucattelli Mendonça e Vera Cristina Bugelli Cainelli Gebara, do Laboratório Especial de Imunologia Viral, do Instituto Butantã, pelo auxílio prestado no desenvolvimento dos testes estatísticos aplicados.

## SUMMARY

*Morphological studies of optical and electronic microscopy were done in tumors grown in athymic nude rats transplanted with human tumor cell line derived from epidermoid mouth carcinoma (KB), since the first inoculation till the 8<sup>th</sup> serial passage of the tumor in these animals. The authors describe the increase of the cellular and nuclear volume, as well as the increase of the number of mitoses and a greater speed of growth of the tumoral mass throughout the serial passages. Also, with the progress of the passages, it has an increase of the inflammatory reaction of the host.*



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. EAGLE, H Propagation in a fluid medium of human epidermoid carcinoma, strain KB. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 91: 362-364, 1956.
2. GIOVANELLA, BC; STEHLIN, JS; WILLIAMS, LJ Heterotransplantation of human malignant tumors in nude thymusless mice. II. Malignant tumors induced by injection of cells cultures derived from human solid tumors. J. Natl. Cancer Inst. 52: 921-930, 1974.
3. LOZZIO, BB et al Reproducible metastatic growth of K 562 human myelogenous leukemia cells in nude mice. J. Natl. Cancer Inst. 63: 295-299, 1979.
4. OZZELO, L & SORDAT, M Behavior of tumors produced by transplantation of human mammary cell lines in athymic nude mice. Eur. J. Cancer, 16: 553-559, 1980.
5. REYNOLDS, ES The use of lead citrat at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. J. Cell Biol. 17: 208-212, 1963.

**O que acontece quando você disca (011) 270-1233, de segunda a sexta-feira, das 8 às 18 horas.**

Na hora que você liga, uma voluntária da **Rede Feminina de Combate ao Câncer** atende e pede o número da informação que você escolheu (de 1 a 60, lembre-se).

A resposta à sua consulta é uma gravação que dura até 2 1/2 minutos e que, no final, desliga o seu telefone, automaticamente.

- |   |  |   |
|---|--|---|
| 01 - O que é câncer?  | 21 - Os efeitos do fumo em não-fumantes e os direitos que estes têm. | 42 - O que é "Teste Papanicolau", que toda mulher deve fazer uma vez por ano? |
| 02 - Palavras do capelão de um hospital.                                | 22 - O fumo e os problemas dentários.                                | 43 - Câncer da vagina e doenças venéreas.                                     |
| 03 - Câncer no adulto.  | 23 - O perigo do fumo na gravidez.                                   | 44 - Câncer da mama no homem.   |
| 04 - Câncer no cérebro.   | 24 - Diálogo sobre fumar e ter saúde.                                | 45 - Câncer da próstata.  |
| 05 - Câncer da boca.  | 25 - Câncer e álcool.  | 46 - Câncer do pênis e doenças venéreas.                                      |
| 06 - Câncer da garganta.  | 26 - Tumores dos olhos.  | 47 - Quimioterapia.   |
| 07 - Câncer da tireóide.  | 27 - Leucemia na criança.  | 48 - Métodos não aprovados para o tratamento do câncer.                       |
| 08 - Câncer da tireóide após tratamento radioativo de cabeça e pescoço. | 28 - Linfomas na criança.  | 49 - Perguntas que o povo faz sobre o câncer - I.                             |
| 09 - Câncer da laringe.   | 29 - Tumor do rim da criança.  | 50 - Perguntas que o povo faz sobre o câncer - II.                            |
| 10 - Reabilitação da fala após o câncer da laringe.                     | 30 - Neuroblastoma da criança.                                       | 51 - Câncer do baço.  |
| 11 - Câncer do esôfago.   | 31 - Aumento do baço na criança.                                     | 52 - Mieloma.   |
| 12 - Câncer do estômago.  | 32 - Doença de Hodgkin.  | 53 - Leucemia do adulto.  |
| 13 - Câncer do fígado.  | 33 - Câncer dos ossos e na coluna vertebral.                         | 54 - Novos tratamentos.   |
| 14 - Câncer do pâncreas.  | 34 - Câncer da pele.   | 55 - Imunologia.  |
| 15 - Câncer do rim.   | 35 - Melanoma maligno (verrugas, pintas, etc.).                      | 56 - AIDS.  |
| 16 - Câncer da bexiga.  | 36 - Linfomas e melanomas múltiplos.                                 | 57 - Câncer do sistema nervoso.   |
| 17 - Descoberta precoce do câncer no intestino.                         | 37 - Câncer da mama.   | 58 - Infecção na criança com câncer.  |
| 18 - Câncer no intestino e no ânus.                                     | 38 - Câncer do seio - Aprenda a examinar os seios.                   | 59 - Raios laser e câncer.  |
| 19 - Que é câncer do pulmão?  | 39 - Mamografia.   | 60 - Tomografia computadorizada.  |
| 20 - Sintomas e tratamento do câncer no pulmão.                         | 40 - Câncer do ovário.   |   |
|   | 41 - Câncer do útero.  |   |