

## Observações Sobre o Desenvolvimento de Fibrossarcoma Transplantado em Gerbil (*Meriones Unguiculatus*)

MARIA VANESSA LOTT PEREIRA<sup>1</sup>, MARIA ISABEL DORIA ROSSI<sup>2</sup>, MARIA ANGÉLICA GUZMÁN-SILVA<sup>2</sup>

Hospital Universitário Antonio Pedro — Niterói, RJ

### Resumo

O trabalho apresenta os resultados da observação do comportamento de um fibrossarcoma quimicamente induzido e transplantado em gerbil, no que diz respeito a suas características de crescimento, incidência, período de latência e reação do hospedeiro. A inoculação subcutânea de células tumorais em suspensão obtidas de animais portadores de fibrossarcoma intraperitoneal e tratados ou não com óleo mineral, grupo A e B, respectivamente, deu origem, com alta frequência nos dois grupos, a tumores com características semelhantes ao tumor primitivo. Porém o tempo de latência foi significativamente menor no grupo A. O ritmo de crescimento do tumor foi similar entre os grupos e a análise de todos os dados retratou uma curva inicialmente exponencial, tendendo a convexa no decorrer do tempo, o que foi também demonstrado por um crescente tempo de duplicação da área tumoral. Durante o período experimental os animais portadores de fibrossarcoma apresentaram perda de peso corporal livre do tumor, sendo este fato interpretado como uma manifestação inicial de caquexia, associada à progressão das neoplasias. O peso dos tumores no dia do sacrifício apresentou correlação significativa com a área tumoral e permitiu a elaboração de uma reta de regressão linear, que pode ser usada para inferir o peso de tumores do mesmo tipo a partir de medidas externas da área.

**Unitermos:** Transplante, Fibrossarcoma, Gerbil

### Introdução

A obtenção de modelos experimentais de indução e manutenção de tumores vem propiciando no decorrer deste século a ampliação do conhecimento científico sobre causas, mecanismos patogênicos, comportamento biológico e conduta terapêutica referentes a diversas neoplasias.

O Laboratório de Patologia Experimental do Departamento de Patologia e Apoio Clínico, Faculdade de Medicina, Universidade Federal Fluminense — LABPE/UFF — adotou o gerbil (*Meriones unguiculatus*) como modelo animal para estudos em oncologia experimental, pois, além da facilidade na criação e manuseio, em recente trabalho GUZMÁN-SILVA *et al.*<sup>1</sup>, reiteram os dados de MECKLEY e ZWICKER<sup>2</sup> de que esta espécie apresenta baixa incidência de neoplasias até os dois anos de idade, permitindo seu uso até essa idade limite em pesquisas sobre câncer.

Estudos sobre carcinogênese experimental no gerbil jovem demonstraram boa incidência de tumores em animais tratados com diferentes carcinógenos administrados em doses e vias distintas<sup>3,4,5</sup>. Transplantes homólogos de fibrossarcoma (FS) também foram realizados com sucesso sem a utilização de imunossuppressores indicando que esta espécie apresenta boa receptividade para transplantes com até 100% de crescimento dos tumores nos animais receptores<sup>6,7</sup>.

Modelos experimentais de manutenção de neoplasias por sucessivos transplantes propiciam condições vantajosas para estudo de aspectos importantes da biologia de tumores, como sua taxa de crescimento facilitando, também, testes com substâncias antitumorais<sup>3,8</sup>.

Este trabalho apresenta resultados da observação do comportamento de um FS quimicamente induzido e transplantado no gerbil jovem no que diz respeito a suas características de crescimento, incidência, período de latência e reações do hospedeiro.

<sup>1</sup> Prof. Assistente do Departamento de Nutrição e Dietética da UFF. <sup>2</sup> Prof. Assistente do Departamento de Patologia e Apoio Clínico da UFF. Agradecimentos: Ao Prof. Pedro Carvalho Rodrigues, do Departamento de Saúde da Comunidade da UFF, pela valiosa orientação na análise estatística dos dados. Endereço para correspondência: <sup>3</sup> Av. Marquês de Paraná, 303, Niterói, RJ. CEP 24030.



## Material e métodos

**Animais:** 17 fêmeas gerbil "outbred", da colônia do LABPE/UFF, com idade entre 8 e 12 semanas, alojadas individualmente em gaiolas de fundo não telado, com leito de maravalha, recebendo água e ração (Labina, PURINA Ltda.) "ad libitum".

**Transplante homólogo de FS:** no subcutâneo (sc) do dorso previamente depilado de animais receptores foi inoculado  $1 \times 10^6$  células tumorais em suspensão. Esta foi obtida de fêmeas gerbil portadoras de FS intra-abdominal a partir da inoculação intraperitoneal (ip) de MEM, pH=7,4 ("Minimum Essencial Medium, Sigma Chemical Co.") e recuperação após 1 minuto de massagem. Os FS utilizados para transplante sc encontravam-se entre a 20ª e a 27ª geração de transplantes sucessivos ip em fêmeas<sup>4,7</sup>. Alguns dos animais haviam recebido associadamente ao transplante óleo mineral (OM) ip, visando a obtenção de tumor ascítico (ROSSI *et al.*, dados não publicados) e deles foi obtida a suspensão tumoral para 10 dos 17 transplantes sc realizados (grupo A). Os 7 restantes foram feitos a partir de animais que não foram tratados com OM (grupo B).

**Protocolo:** após o transplante os animais foram examinados diariamente, sob anestesia com éter, até a detecção de tumor palpável (tempo de latência) e daí, 3 vezes por semana, para verificação das seguintes características:

a. crescimento da massa tumoral: avaliada através da área em  $\text{cm}^2$ , obtida pela razão entre o maior e o menor diâmetro do tumor, medido com paquímetro. Método adaptado de STEEL *et al.*<sup>8</sup>. O Tempo de Duplicação (TD) da área tumoral, estimado a partir das observações do crescimento, foi também determinado pois permite comparar o ritmo de crescimento de tumores com diferentes dimensões<sup>9</sup>;

b. peso corporal;

c. consumo de ração: determinado pela diferença entre a quantidade ofertada e a quantidade rejeitada.

No 28º dia pós-transplante (pt) todos os animais inoculados foram sacrificados com sobredose de éter e submetidos a necrópsia completa. Os tumores encontrados foram medidos e pesados após dissecação.

**Tratamento Estatístico:** Teste não paramétrico de Wilcoxon<sup>10</sup> foi utilizado para comparação do tempo de latência entre os grupos. Teste de Fischer<sup>10</sup> para comparação da incidência de tumores. Teste de Student<sup>11</sup> para comparação do consumo de ração entre os animais portadores e não-portadores de tumor. Correlação e reta de regressão linear<sup>11</sup> para a relação área x peso dos tumores.

## Resultados

A inoculação de células tumorais no gerbil deu origem com elevada frequência a massas sc com característi-

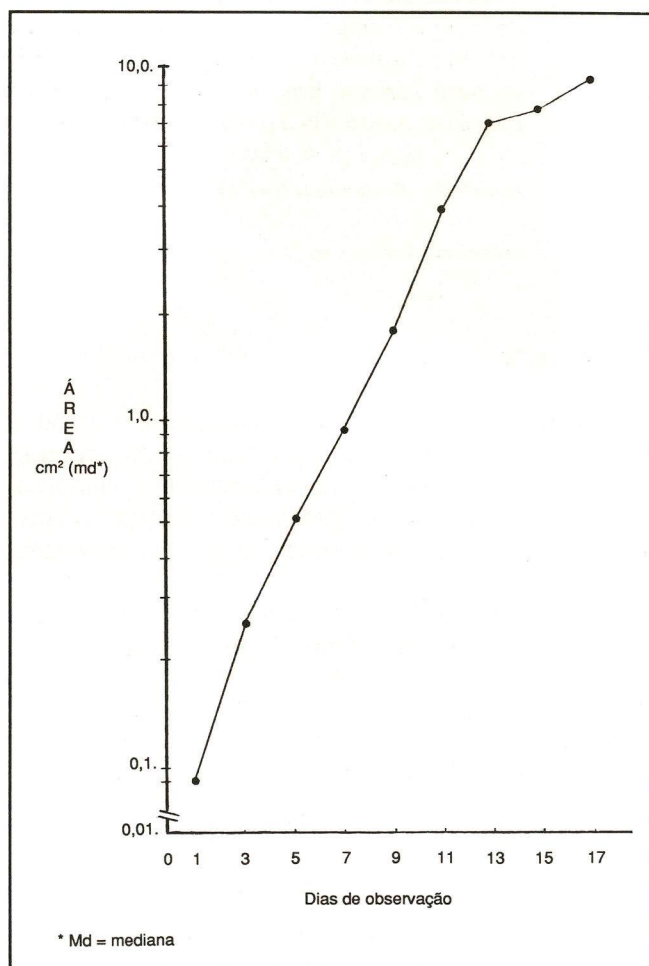
cas morfológicas semelhantes as do FS primitivo descrito por ROSSI *et al.*<sup>4</sup>. Na tabela 1 apresentamos as observações sobre incidência e tempo de latência destes tumores. Considerando o número de animais inoculados verificamos uma boa incidência de FS nos dois grupos não sendo significativa a diferença entre eles (Fischer  $p=0,49$ ). No entanto o tempo de latência foi

**Tabela 1** — Incidência e Latência de Fibrossarcomas Transplantados em Gerbil

Animais	Incidência positivos/inoculados	Latência dias pt (mediana)
Grupo A*	7/10	10
Grupo B*	4/7	19

\* doadores tratados com OM

\*\* doadores não tratados com OM



**Figura 1** — Curva de crescimento de FS sc transplantados em gerbil. Mediana das áreas em função dos dias de observação.



**Tabela 2** — Número de Animais Estudados em Função dos dias de observação

Dias	Nº de animais
1 — 9	11
11 — 13	8
15	7
17	5

**Tabela 3** — Tempo de Duplicação (TD) da área\* do Fibrossarcoma sc

Dias	TD (h)
1	27
3	50
5	57
7	55
9	38
11	71
13	504
15	244

\* mediana

significativamente menor no grupo A (Wilcoxon = 0,012).

Quanto ao crescimento do tumor verificamos não haver diferença significativa no ritmo de crescimento entre os grupos A e B e, portanto, a curva apresentada na figura 1 foi elaborada com os dados dos 11 tumores obtidos. Para a confecção dessa curva foram utilizados os valores medianos das áreas, pois os dados individuais de crescimento apresentaram variação muito alta. A fim de eliminar as diferenças encontradas no tempo de latência consideramos como dia 1 o da primeira detecção do tumor, independente do dia pt. As demais medidas correspondem aos dias subsequentes nos quais os animais foram examinados até a data do sacrifício. A tabela 2 indica o número de animais estudados em função de cada dia de observação.

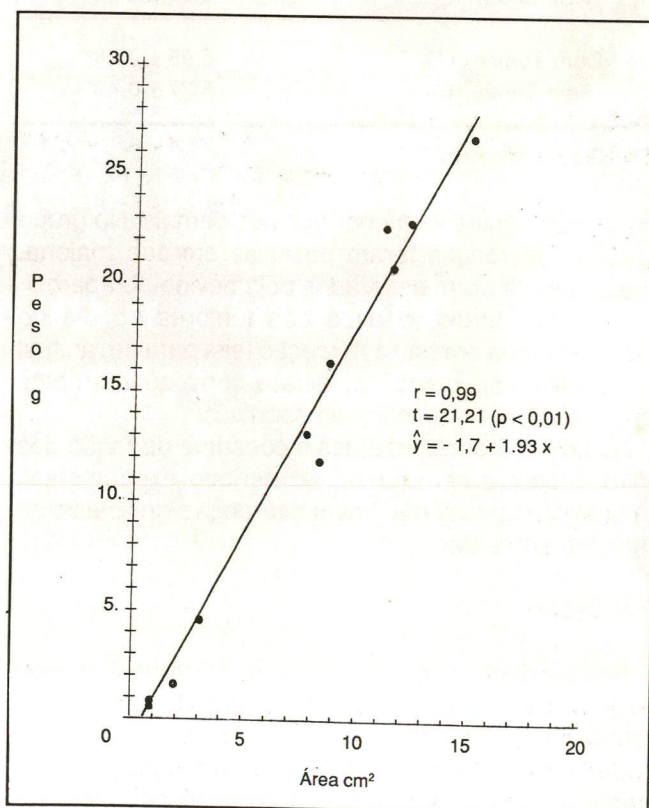
A obtenção de uma curva de crescimento exponencial em escala semilogarítmica permitiu a utilização do TD da área tumoral como parâmetro para a avaliação da taxa de crescimento do FS<sup>9</sup>. Na tabela 3 apresentamos o TD da área do FS em função dos dias de observação. Verificamos que este tumor apresentou um ritmo de crescimento mais intenso nos primeiros dias com TD de 28 h, seguindo-se, após o 3º dia, etapas de crescimento mais lento e constante até o 7º, com TD médio de 54 h. Em torno do 9º dia o crescimento se acentuou com duplicação da área tumoral em 38 h. A partir do 11º dia este ritmo diminuiu marcadamente, o que foi demonstrado pelo TD bem mais elevado.

No 28º dia pt necrópsia completa foi realizada em

todos os animais inoculados. Nenhum foco metastático foi constatado sendo a presença de linfonodos mesentéricos aumentados e hemorrágicos as únicas alterações macroscópicas observadas em dois animais portadores de FS. Os tumores apresentavam-se macroscopicamente como nódulos consistentes, bem definidos, com pouca infiltração nos tecidos subjacentes e, ao corte, áreas de necrose e hemorragia foram visualizadas com freqüência. Em alguns animais cujas massas tumorais sc atingiam aproximadamente 6 cm<sup>2</sup> de área, ulcerações na epiderme determinadas por compressão e traumatismo foram observadas.

O peso dos tumores no dia do sacrifício dos animais apresentou correlação significativa com a área tumoral ( $r=0,99$  e  $p<0,01$ ) e permitiu a elaboração da reta de regressão linear apresentada na figura 2.

Verificando as reações do hospedeiro apresentamos na tabela 4 as diferenças entre o ganho de peso no período experimental e o peso dos tumores em animais portadores de FS sc no dia do sacrifício. Observamos que no grupo A, cujos tumores tiveram menor tempo de latência e, portanto, mais tempo para se desenvolver, a maioria dos animais apresentou valores negativos indicando perda de peso corporal livre do tumor. Os valores positivos encontrados para dois animais podem ser justificados em função do crescimento da massa tu-

**Figura 2** — Correlação entre área (cm<sup>2</sup>) e peso (g) de FS subcutâneos transplantados em gerbil. Reta de regressão linear (—). Dados experimentais (•).



**Tabela 4** — Diferença entre o Ganho de Peso Corporal e Peso do Tumor em Gerbil Portador de Fibrossarcoma sc

Animais	Ganho de Peso Corporal durante experimento (g)	Peso do Tumor dia sacrifício (g)	Diferença (g)
<b>Grupo A</b>			
1	20,70	22,70	- 2,00
2	21,60	26,80	- 5,20
3	16,40	4,70	+11,70
4	13,30	11,65	+ 1,65
5	13,10	16,10	- 3,00
6	11,20	12,90	- 1,70
7	13,60	20,50	- 6,90
<b>Grupo B</b>			
1	20,60	22,40	- 1,80
2	8,20	0,70	+ 7,50
3	7,50	1,40	+ 6,10
4	5,50	0,60	+ 4,90

**Tabela 5** — Consumo de Ração (g/dia) no Período Experimental

Animais (n =)	Média ± DP
Com Tumor (11)	5,95 ± 0,38*
Sem Tumor (6)	5,77 ± 0,49*

\* t = Não significativo

moral, que nestes foi menor que nos demais. No grupo B essas diferenças foram positivas em sua maioria. Estes valores eram esperados pois devido ao aparecimento mais tardio, o peso dos tumores no dia do sacrifício ainda era baixo. Exceção feita para um animal que apresentou menor latência e conseqüentemente uma massa tumoral maior ao sacrifício.

Na tabela 5 apresentamos o consumo de ração dos animais com e sem tumor, no período experimental, na qual verificamos não haver diferença significativa de ingestão entre eles.

## Discussão

Nossos dados sobre incidência de FS transplantados no gerbil parecem estar de acordo com a literatura onde esta espécie é apontada como tendo muito boa receptividade para transplantes<sup>3,6,12</sup>. Tal fato está possivelmente associado a características genéticas, pois várias espécies da família *Cricetidae* da qual fazem parte gerbil e hamster, apresentam poucos genes de histocompatibilidade favorecendo a "tolerância" a transplantes tanto homólogos como heterólogos<sup>3,12,13</sup>.

Apesar do limitado número de observações, principalmente no grupo B, verificamos que não houve diferença significativa quanto à incidência entre os dois grupos estudados, porém o tempo de latência foi significativamente menor no grupo A. As razões que levaram ao aparecimento mais rápido dos tumores neste grupo não nos parecem suficientemente claras uma vez que o sobrenadante oleoso, obtido no lavado ip dos animais doadores, foi desprezado antes da inoculação sc e, portanto, praticamente nenhum óleo foi administrado. O possível efeito bloqueador da fagocitose em macrófagos atribuído a alguns tipos de emulsão oleosa e que poderia facilitar a fixação de células tumorais, não é comum a todas e depende de uma determinada concentração de óleo, que não foi a ministrada nos animais receptores deste grupo<sup>14,15</sup>. Além disso três dos quatro animais portadores de tumor do grupo B eram da mesma ninhada e, portanto, características genéticas podem ter influenciado para o tempo de latência mais longo. Face ao exposto consideramos inoportuno, no momento, especular sobre os possíveis mecanismos que levaram às diferenças no tempo de latência do FS transplantado sendo necessária a ampliação das observações.

Embora houvesse variações individuais no crescimento do FS, fato freqüentemente relatado para diferentes neoplasias<sup>16</sup>, o tipo de curva obtida indica que o mesmo é inicialmente exponencial (em escala semilogarítmica) e que, no decorrer do tempo, conforme aumenta a massa do tumor, há um decréscimo no ritmo de crescimento e a curva se torna mais convexa. Estas observações correspondem em linhas gerais aos dados descritos para tumores experimentais<sup>8,9</sup> e, portanto, a



curva pode ser usada como um parâmetro para crescimento tumoral. O TD crescente do FS reitera estas observações e como descrito na literatura parece ser um bom indicador do ritmo de crescimento<sup>9,17</sup>. O decréscimo no ritmo de crescimento observado no decorrer do tempo pode ter várias causas, porém, nos parece estar relacionado com as áreas de necrose freqüentemente encontradas nas massas tumorais após dissecação. Considerando que o crescimento total de um tumor representa a diferença entre produção e perda celular<sup>16</sup> maiores esclarecimentos sobre os mecanismos de crescimento do FS poderão ser obtidos através do emprego de métodos para avaliação das frações celulares em proliferação, seu ritmo de divisão ou outros fatores interferentes como, por exemplo, a vascularização do tecido tumoral.

A reta de regressão linear construída em função da alta correlação entre a área e o peso dos tumores no dia do sacrifício pode ser interpretada como uma "curva de calibração"<sup>8</sup> a qual permite inferir o peso de tumores do mesmo tipo a partir de medidas externas da área.

Com relação às características do hospedeiro a perda de peso corporal livre do tumor identificada na maioria dos animais portadores de FS, aliada ao fato de que um ganho ponderal era esperado em função do crescimento normal para a idade, sugerem que o "déficit" total de peso talvez seja maior do que os valores apresentados na tabela 4. Desde que todos os animais sofreram a mesma manipulação no decorrer do experimento e que o consumo de ração entre eles não apresentou diferença significativa, interpretamos estes "déficits" ponderais como uma manifestação inicial de caquexia, em geral associada à progressão das neoplasias e cujos mecanismos não estão bem esclarecidos<sup>18,19,20</sup>.

## Summary

*The authors report the study of a chemically induced and transplantable fibrosarcoma in the gerbil. This tumor was maintained by successive intraperitoneal passages using tumor cell suspension in association or not with mineral oil. The incidence, latency period, growth pattern and host response were determined after subcutaneous implantation of  $1 \times 10^6$  tumor cells. The latency period was significantly lower in animal receiving cell suspension derived from donors treated with mineral oil. Nevertheless incidence and overall tumor growth was similar in both groups. The kinetic analysis of tumor growth, showed an initial exponential proliferative phase, with a tendency to convex upwards. This was also demonstrated by an increasing duplication time of the tumor area. Gerbils bearing subcutaneous fibrosarcoma lost body weight during the experimental period. Tumor weight showed a significant linear relationship with tumor area, and at least for this tumor, an estimation of*

*tumor weight might be obtained from external measurements of the area.*

**Uniters:** *Transplantation, Fibrosarcoma, Gerbil*

## Referências Bibliográficas

- Guzmán-Silva MA, Rossi MID, Guimarães JSP. Observações preliminares sobre a patologia espontânea do gerbil (*Meriones unguiculatus*). Arq. Flum. Med. Vet. (no prelo)
- Meckley PE, Zwicker GM. Naturally occurring neoplasms in the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). Lab. Anim, 1979; 13: 203-206.
- Handler AH, Magalini SI, Pav D. Oncogenic studies on the Mongolian gerbil. Cancer Res., 1966; 26: 844-847.
- Rossi MID, Guzmán-Silva MA, Guimarães JSP. Estudo do gerbil (*Meriones unguiculatus*) como modelo em oncologia experimental. II. Indução de neoplasias subcutâneas. Rev. Bras. Cancerol., 1986; 32(2): 156.
- Guzmán-Silva MA, Guimarães JSP. Análise morfológica comparativa de carcinogênese química cutânea entre camundongos e gerbils. Rev. Bras. Cancerol., 1986; 32(1): 31-42.
- Gleiser CA, Pointer JM, Jardine JH, Raulston GL. Transplantable tumor cell line derived from a spontaneous fibrosarcoma in a gerbil. JNCI, 1979; 62(6): 1579-1583.
- Rossi MID, Guzmán-Silva MA, Guimarães JSP. Estudo do gerbil (*Meriones unguiculatus*) como modelo em oncologia experimental. III. Transplante homólogo de neoplasias quimicamente induzidas. Rev. Bras. Cancerol., 1986; 32(2): 156.
- Steel GG, Adams K, Barret JC. Analysis of the cell population kinetics of transplanted tumors of widely-differing growth rate. Br. J. Cancer, 1966; 20: 784-800.
- Steel GG, Lamerton LF. The growth rate of humans tumors. Br. J. Cancer, 1966; 20: 74.
- Campos H. Estatística Experimental não paramétrica. 4ª ed. Piracicaba, São Paulo, ESA. "Luiz de Queiroz", USP, 1983.
- Vieira S. Metodologia Científica para a Área de Saúde. Sarvier, 1984.
- Billingham RE, Silvers WK. Skin transplants and the hamster. Scientific American, 1963; 208: 118-127.
- Karavodin LM, Ash LR. Weak graft-versus-host response in the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). Lab. Anim. Sci., 1977; 27(6): 1035-1036.
- Stiffel C, Mouton D, Biozzi G. Kinetics of the Phagocytic Function of the Reticuloendothelial Macrophages in vivo. In: Vanfurth, R. ed. Mononuclear Phagocytes, Blackwell, Oxford, 1970; pp 335.
- Cooper GN, Houston B. Effects of simple lipids on the phagocytic properties of peritoneal macrophages. II. Studies on the phagocytic potencial of cell populations. Aust. J. Exp. Biol. Med., 1964; 42: 429-442.
- Steel GG. Cytokinetics of neoplasias. In: Cancer Medicine Holland, JF & Frei III, E. eds. Lea & Febiger, Philadelphia, 2ª ed., 1982; pp 177-189.
- Lala PK. Age-specific changes in the proliferation of Ehrlich ascites tumor cells grown as solid tumors. Cancer Res., 1972; 32: 628-636.
- Ohnuma T. Systemic effects of cancer. In: Cancer Medicine Holland, JF & Frei III, E. eds., Lea & Febiger, Philadelphia, 1982; 2ª ed., pp 1220.
- Belizário JE, Katz M, Raw I. Caracterização dos mediadores endógenos da caquexia neoplásica. In: II Encontro Nacional de Pesquisa em Câncer. Instituto Nacional do Câncer. Rio de Janeiro, 1987. Ministério da Saúde. Campanha Nacional de Combate ao Câncer.
- Viera-Matos AN, Rettori D. Evolução da caquexia produzida pelo tumor Sp4 (Adenocarcinoma de mama) nos ratos WAB/NOT. In: II Encontro Nacional de Pesquisa em Câncer. Instituto Nacional do Câncer. Rio de Janeiro, 1987. Ministério da Saúde. Campanha Nacional de Combate ao Câncer.
- Maurly CPJ. Tumor Necrosis Factor: an Overview. Acta. Med. Scand., 1986; 220: 387-94.