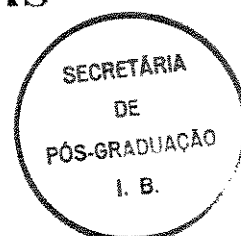


UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
UNICAMP
INSTITUTO DE BIOLOGIA



IRANDAIA UBIRAJARA GARCIA 165

**"ESTUDO DA PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA
IMUNOLÓGICO DURANTE O PERÍODO PRÉ-
TUMORAL NA CARCINOGENESE PANCREÁTICA
EXPERIMENTAL"**

9412380

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo (a) candidato (a) Irandaia Ubirajara Garcia e aprovada pela Comissão Julgadora

Orientador de Tese : Maria Juana Escribano

Orientador de Programa : Humberto de Araújo Rangel

CAMPINAS - SP
1994



Dissertação apresentada ao Instituto
de Biologia da Universidade Estadual
de Campinas, para obtenção do título
de Doutor em Imunologia.

Os trabalhos experimentais que fazem parte desta tese foram realizados no Laboratório do Groupe de Recherche sur les Antigènes de Differentiation et la transformation Néoplasique, dirigido pela Dra. Maria Juana Escribano, integrado a Unitée d'Immunochimie et Differentiation Cellulaire (direção do Dr. Pierre Burtin) no Institut de Recherches Scientifiques sur le Cancer (IRSC) - Villejuif - França

À Juliana, Raphael
e Marcos

Aos meus pais, José Pereira e
Maria Coeli, pela dedicação e carinho que
tanto me impulsionou na formação educacional.

" Plus les choses sont compliquées plus il
faut dégager quelques idées simples".

François Jacob. (Institut Pasteur)
Prêmio Nobel de Medicina 1965

AGRADECIMENTOS

- Ao Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biologia da UNICAMP, por ter possibilitado a realização desta tese de doutorado.
- Ao prof. Dr. Humberto de Araújo Rangel pela dedicação e simpatia com a qual sempre orientou o programa desta tese.
- Ao prof. Dr. Benedito Vidal pela dedicação na crítica e análise histológica.
- Ao prof. Dr. Paulo M. F. de Araújo pelos ensinamentos iniciais na área de Imunologia, pelo companheirismo e incentivo constante na realização desta tese.
- Agradeço ao prof. Dr. Norair S. dos Reis pelo apoio nas análises histológicas.
- A amiga Profa. Dra. Laurecir Gomes pela amizade e apoio durante os momentos difíceis de convivência deste trabalho.
- As pessoas as quais de uma maneira ou de outra contribuíram para a para a realização desta tese e que torna-se difícil exprimir a minha gratidão a todos os nomes quero dizer simplesmente obrigada...

- O meu agradecimento especial aos membros da banca de Análise Prévia desta tese, a qual muito contribuiu para o melhoramento da parte escrita mostrando dedicação, capacidade e desempenho na correção desta :

Professor Dr. Silvio dos Santos Carvalhal

Professor Dr. Henrique L. Lenzi

Professor Dr. Francisco Gomes de Alcântara

Professora Dra. Leonilda M.B. dos Santos

Professora Dra. Júlia Keiko Sakurada

Professor Paulo M. F. de Araújo

Professor Dr. Antônio Ari Gonçalves

Professor Humberto A. Rangel (Orientador de Programa)

Professora Dra. Maria J. Escribano (Orientador de Tese)

Professor Dr. Milton T. M. de Arroda

REMERCIEMENTS

Cette thèse a été réalisée dans le laboratoire d'Immunochimie de l'Institut de Recherches Scientifiques sur le Cancer.

- Tout d'abord je tiens à exprimer ma gratitude à Mme Maria Juana Escribano qui a assuré la direction scientifique de cette thèse et qui a bien voulu m'accueillir dans son laboratoire et m'a ainsi fait profiter de son expérience et son esprit critique. Qu'elle soit ici remerciée de m'avoir fait découvrir la Cancérologie et de l'intérêt qu'elle a témoigné pour mon travail.
- Je suis très reconnaissante à Monsieur le professeur Pierre Burtin de l'intérêt et l'aide qu'il a toujours porté à mon sujet de recherche.
- Je tiens à remercier Mme Simone Orbach, qui a toujours suivi avec intérêt l'avancement de mes travaux et sans cesse encouragée et conseillée tout au long de mon travail.
- Je remercie très chaleureusement le professeur Jacques Bara pour ses conseils, son appui et la gentillesse dont il est toujours fait preuve.

- Je remercie l'équipe de Mme Brigitte Loridon-Rosa pour son aide précieuse sur la confection et l'interprétation des coupes histologiques.
- Je remercie Mme M. Zinghedeau pour s'occuper gentilement des hamsters.
- Qu'il me soit permis de remercier également toutes les personnes de l'Institut ayant contribué directe or indirectment à l'élaboration de cette thèse.
- Enfin que Philippe, Jean Louis , Takeda et François trouvent ici l'expression de ma profonde reconnaissance pour leur soutien et leur amitié.
- Pour terminer, je suis remercie L'Association pour la Recherche sur le Cancer(ARC), pour contribué financièrement a cette recherche.

ÍNDICE

I - INTRODUÇÃO	01
II - OBJETIVOS	08
III - MATERIAIS E MÉTODOS.....	10
1 . Reagentes Gerais.....	11
2 . Reagentes Biológicos	12
2.1. Soro de Camundongo Anti-Linfócito "T" de Hamster	12
2.2. Obtenção e Purificação de IgG de Hamster.....	13
2.3. Soro de Coelho Anti-IgG de Hamster	13
2.4. Conjugados Policlonais	13
3. Animais	14
4. Indução de Tumores	14
5. Preparação do Pâncreas para Análise Histológica e Imumohistoquímica	14
5.1. Hematoxilina-Eosina	15
5.2. Hemalun.....	16
5.3. Leishman.....	16
5.4. Tricrômico de Masson	16
5.5. Azul de Orto-Toluidina.....	16

6. Análises Imunohistoquímicas.....	17
6.1. Reação de Imunofluorescência Indireta.....	17
6.2. Reação de Immunoperoxidase Indireta	18
7. Análises das Imunoglobulinas Séricas através da Fixação Imune em Nitrocelulose.....	19
8. Obtenção e Análise Diferencial de Células Periféricas	20
9. Obtenção e Análise Diferencial de células Peritoneais.....	20

IV - RESULTADOS22

1a PARTE

ASPECTOS HISTOLÓGICOS E IMUNOHISTOLÓGICOS DO PÂNCREAS DE ANIMAIS NORMAIS. MODIFICAÇÕES MACROSCÓPICAS E MICROSCÓPICAS DO PÂNCREAS DOS ANIMAIS TRATADOS POR NITROSAMINAS.....23

1.Aspectos histológicos e Imunohistológicos do Pâncreas de Animais Normais.....	24
2.Avaliação dos Aspectos Histopatológicos e Imunopatológicos do Pâncreas em Animais Tratados	30
2.1.Aspectos Gerais Macroscópicos	30
2.2.Alterações Histológicas do Tecido Acinar	32
2.3.Alterações Histológicas do Tecido Conjuntivo.....	35
2.4.Formação do tecido tipo adiposo	39
2.5.Hiperplasias e Lesões Teciduais Pancreáticas	39

2A PARTE :

RESPOSTA IMUNOLÓGICA DURANTE A CARCINOGENESE: ASPECTOS CELULARES44

1. Quantificação de Células Periféricas e Peritoneais45

2. Participação Celular no Tecido Pancreático48

2.1. Cinética do Infiltrado Celular48

2.2. Participação do Macrófago, Mastócito e Plasmócito51

2.3. Participação do Linfócito "T"54

2.3.1. No Tecido Normal54

2.3.2. No tecido dos Animais Tratados54

3a PARTE :

RESPOSTA IMUNOLÓGICA HUMORAL DURANTE A CARCINOGENESE: DEMONSTRAÇÃO DA PRESENÇA DE AUTO-ANTICORPOS CIRCULANTES EM ANIMAIS TRATADOS61

1. Análise das Imunoglobulinas Totais presentes no soro dos Animais62

1.1. Animais Normais62

1.2. Animais Tratados62

2. Cinética da presença de Imunoglobulinas nos Tecidos	
Pancreáticos durante a Carcinogênese	65
2.1. Pâncreas de Animais Normais	65
2.2. Pâncreas de Animais Tratados	65
3. Análise da Presença de Auto-Anticorpo no soro dos Animais	69
3.1. Pesquisa de auto-anticorpos no soro de animais normais dirigidos contra pâncreas de animais normais e tratados	69
3.2. Pesquisa de auto-anticorpos no soro de animais tratados dirigidos contra estruturas pancreáticas	69
3.2.1. Dirigidos contra tecidos pancreáticos normais	69
3.2.2. Dirigidos contra suas próprias estruturas pancreáticas	71
 V - DISCUSSÃO	 75
 VI- RESUMO	 91
 VII- SUMMARY	 93
 VIII- RESUMÉ	 95
 IX- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	 97

No homem o câncer do pâncreas é uma doença praticamente 100% mortal, e tem sido observado nos últimos anos um aumento na sua incidência (Gudjonsson, 1987). O tempo de sobrevivência após o diagnóstico é de 4 a 6 meses. Os métodos de detecção permitem hoje um diagnóstico mais seguro(Bose et al., 1993), mas ainda estes não influenciam na melhora do prognóstico do doente e nem diminuem de modo significativo as curvas de mortalidade. Entretanto, os esforços para obter uma melhor terapia ou aperfeiçoar métodos de diagnóstico precoce da doença, devem ser feitos insistentemente no sentido de reverter os quadros graves e incuráveis ainda apresentados.

O câncer de pâncreas apresenta-se, frente a sua incidência, com uma dominância masculina (Faivre et al., 1990). Esta observação também foi verificada em estudos em animais de experimentação, quando vários tratamentos em ratos, com modelos utilizando agente carcinogênico, desenvolveram tumores, em porcentagem maior, em animais machos (Longnecker et al., 1990). Observou-se também que, em humanos, há um aumento importante na sua incidência, com o aumento da idade (Maruchi et al., 1979).

O tumor pancreático se desenvolve quase sempre de uma maneira assintomática no início , e as primeiras manifestações clínicas são vagas e não específicas. A detecção pode ser feita pela presença de alguns marcadores séricos , como verificado por diferentes autores (Fitzgerald et al., 1978 ; Schultz et al., 1979 ; Röthlin et al., 1992).

Quando se fala em câncer do pâncreas subentende-se neoplasia do pâncreas exócrino (Fitzgerald, 1976; Cubilla et al., 1980; Morohoshi et al., 1983; Chen et al., 1985), devido ao fato de que os tumores do pâncreas endócrino são, em geral, de bom prognóstico e não formam adenocarcinomas. Duas estruturas principais constituem o pâncreas exócrino: as células acinares que fabricam as enzimas pancreáticas e os canais de secreção (ductos). Tendo como base as observações histológicas, pensou-se, tradicionalmente, que os adenocarcinomas pancreáticos tinham origem nas suas células ductais. Entretanto, decorrente de estudos biológicos e funcionais da massa tumoral, admite-se, atualmente que eles podem originar-se

de células acinosas. No momento, os mecanismos celulares e moleculares responsáveis pela transformação tumoral ainda permanecem mal elucidados (Bockman, 1981; Parsa et al., 1985).

Pesquisas realizadas em linhagens de hamster Syrian Golden têm demonstrado que este animal é um modelo capaz de fornecer valiosas informações sobre a natureza da carcinogênese pancreática humana. Após tratamento com agentes químicos, o pâncreas desse animal apresenta lesões histopatológicas bem semelhantes às produzidas em humanos, tanto do ponto de vista fisiológico, como histopatológico (Pour et al., 1974, 1981).

Certas nitrosaminas têm sido demonstradas ser potentes agentes carcinogênicos do pâncreas. Em 1974, Kriiger e cols. descreveram, pela primeira vez, a indução de tumores pancreáticos em hamster, através da administração de BHP (n-nitrosobis(2-hidroxiopropil)amina). Assim, dentro de um esquema especial de inoculação, pode-se induzir adenocarcinomas pancreáticos com este produto (Bojan et al., 1980 ; Flacks et al., 1980). Geralmente não tem sido trabalhados modelos usando estes agentes carcinogênicos com a utilização de baixas doses . Sabe-se, porém, que através de doses altas, pode-se obter uma grande incidência de tumores com períodos de latência muito curtos (Lawson et al. , 1982).

O mecanismo de diferenciação celular pela administração de nitrosaminas parece estar relacionado com a metilação do DNA das células pancreáticas (Lawson et al., 1982). Por outro lado, a demonstração, por nosso grupo, da presença de antígenos do tipo oncofetal, em lesões pré-tumorais (Escribano et al.,1985; Carré-Llopis et al.,1986b; Eriguhi et al., 1987; Heredia et al., 1988; Takeda et al., 1992), sugere que as transformações neoplásicas podem ser iniciadas muito antes que o tumor possa ser diagnosticado pela histologia convencional.

Nos últimos anos, nosso grupo de trabalho tem demonstrado que existe uma família de antígenos associados à diferenciação e ao desenvolvimento do pâncreas exócrino. Estes antígenos expressam-se durante a vida fetal, exibindo maior intensidade no momento do

crescimento exponencial do tecido exócrino. Logo que aparecem as primeiras transformações neoplásicas, estes antígenos são novamente sintetizados, principalmente, dentro das etapas que precedem a constatação histológica do tumor. Anteriormente, esta família de antígenos foi descrita em um modelo de carcinogênese experimental em hamster (Benedi et al., 1984) e, mais tarde, família similar foi descrita no homem (Escribano et al., 1986). Um dos antígenos, entre estas famílias, foi particularmente bem estudado, graças à obtenção de um anticorpo monoclonal murino de alta afinidade (Mab J-28). Este antígeno tem massa molecular correspondente a 110.000 daltons, expressa-se seletivamente em células acinares do período fetal, sendo chamado de proteína FAP(pur feto-acinar-pancreatic) . Foi demonstrado que a FAP é um bom marcador sérico do câncer de pâncreas (Fujii et al., 1987). Em linhagens humanas, derivadas de adenocarcinomas pancreáticos, foi constatada a presença da FAP (Mazo et al., 1991), permitindo, assim, demonstrar, mais tarde, que, na neoplasia esta proteína sofre provavelmente uma mutação genética (Miralles et al., 1993). No momento, está sendo conduzida uma clonagem do gene responsável por esta proteína, a qual poderá ajudar na compreensão dos mecanismos moleculares da transformação tumoral, possibilitando o teste de hibridação "in situ". A obtenção da amplificação genética, a qual poderá ajudar também na detecção precoce desta doença.

A eventual interferência do sistema imunológico nos mecanismos de transformação e, posteriormente, de progressão neoplásicas é um antigo assunto de debate, o qual reaparece, na atualidade, diante das esperanças das terapias genéticas e imunológicas em câncer. Assim, durante muito tempo foi estudada a possível participação de diferentes populações de células mononucleares, com características linfóides, presentes durante a evolução tumoral, tanto em humanos quanto em modelos carcinogênicos, em murinos (Vaux Saint-Cyr et al., 1977; Shimokawara et al., 1982; Eremin et al., 1982). Também, durante este tempo, discutiu-se o mecanismo que determinava a aparente anergia destas células frente ao crescimento tumoral (Nind et al., 1973).

A presença de infiltrados de linfócitos em tumor, chamados de TIL (Tumor Infiltrating Lymphocytes), tem sido despertada como um assunto de grande interesse para a compreensão das bases imunoterápicas nas neoplasias. Existem evidências de que estes tenham um papel importante na evolução do tumor. Estudos, feitos em modelos murinos, têm demonstrado que estes linfócitos atuam como um potencial mediador na regressão de tumores (Zbar et al., 1971; Ibayashi et al. , 1985; Mills et al., 1981). Uma análise da participação destas células, tem sido feita com o objetivo de verificar o seu poder efector em relação ao crescimento tumoral (Tuttle et al., 1993).

O infiltrado celular "TIL" tem sido observado em alguns tumores, com predominância de células T ativadas (Galili et al., 1979 ; Tuttle et al., 1992)ou populações citotóxicas e supressoras (Roth et al., 1982; Mukherji et al., 1990; Takemura et al., 1991).

A presença destas células no hospedeiro, durante a evolução do tumor, tem sido considerada como sinal de prognóstico favorável aos tratamentos imunoterápicos (Underwood, 1974-Rev.). Atualmente , com uma nova metodologia de trabalho, utilizando a aplicação destas células em diferentes neoplasias, foi observada uma maior sobrevida dos pacientes. Notavelmente, tem sido possível uma regressão de tumores , com diferentes estratégias metodológicas, utilizando-se estes linfócitos , ou produtos destas células(Rosenberg, 1990 ; Bubenick et al., 1993).

Análises histológicas de neoplasias pancreáticas, desenvolvidas por nosso grupo de trabalho, revelaram que durante a evolução tumoral em hamster , tanto com o produto carcinogênico BOP (N-nitroso-bis(2-oxopropil)amina) ou o BHP (N-nitroso-bis(hidroxi-propil)amina), há um considerável aumento de infiltrados linfocitários (Carré-Llopis et al., 1986a; Eriguhi et al., 1987). Esta resposta parece estar presente desde o início das lesões e é similar à encontrada em carcinoma pancreático humano. Isto sugere a participação de respostas ligadas ao sistema imunológico do hospedeiro durante a evolução dos tumores possivelmente através de uma resposta antigênica.

Outras células mononucleares do sistema imune têm sido estudadas quanto às

suas possíveis participações efetivas durante o crescimento tumoral, tais como; células NK e células LaK (Fridman, 1991). Em diferentes tipos tumorais, estas células estão presentes também na massa celular que envolve estes tumores e são capazes de exercerem atividades de agressão às células em transformação, quando colocadas "in vitro", ou em presença de diferentes linhagens tumorais. Entretanto, quando estas células são utilizadas em imunoterapia, mostram uma atividade efetora com vezes menor que as células TIL(Crozumarie, 1991).

O papel do macrófago foi analisado por diferentes autores, admitindo-se que ele esteja associado aos mecanismos de imunossupressão, os quais criam condições para o desenvolvimento do processo de invasão tumoral em diferentes tecidos (Ting et al., 1980). Mastócitos também foram observados em diferentes tecidos neoplásicos, sendo aventada a hipótese de estarem associados a mecanismos anafiláticos, importantes no crescimento tumoral (Lynch et al., 1977; Rosenbaum et al., 1977; Burtin., 1986). Investiga-se, atualmente, a possível participação deles no processo inflamatório que acompanha as transformações neoplásicas (Cidre et al., 1990 ; Flynn et al., 1991).

Estudos de inibição do crescimento tumoral foram investigados durante alguns anos, utilizando-se animais de experimentação, através da estimulação da resposta imune humoral e celular(Vaux Saint-Cyr et al., 1977; Rosenberg, 1977 ; Manson et al., 1991).

No decorrer dos estudos da evolução das neoplasias, em humanos e modelos murinos, foram observadas alterações nos níveis séricos de imunoglobulinas, e também a presença de imunoglobulina, "in situ", na massa tumoral (Feldman, 1972; Vaux Saint-Cyr et al., 1977; Witz, 1977; Hadda et al. , 1984 ; Manson, 1991). Estudos foram realizados em animais portadores de tumores, utilizando-se esquemas de soroterapia, como possíveis estratégias à imunoterapia de tumores (Rosenberg et al., 1977). Atualmente, discute-se qual é o verdadeiro mecanismo efetor destas imunoglobulinas presentes nos tumores. Em princípio, elas poderiam ser importantes no desenvolvimento das lesões do tecido tumoral, com uma atuação efetiva no prognóstico da evolução neoplásica. Poderiam também participar nos mecanismos favorecedores do crescimento tumoral, a despeito de uma aparente resposta

imune do hospedeiro (Doll et al., 1970). Atualmente, existe consenso de que praticamente todos os tumores são imunogênicos(North, 1985; Manson, 1991), entretanto, há bastante divergências quando se trata de explicar porque as respostas imunes não são compatíveis com o progressivo aumento da massa tumoral. Estas respostas precisam ser melhor investigadas , e é necessário definir o que determina a inibição ou o crescimento tumoral. Certamente, estes dados contribuirão para melhor explicar a eficácia de tratamentos imunoterápicos ou auxiliarão no imunodiagnóstico geral das neoplasias.

Na expectativa de se estabelecer uma correlação entre participação do sistema imunológico e a evolução do processo pré-tumoral pancreático, foram definidos os seguintes objetivos:

II- OBJETIVOS

Objetivos do nosso trabalho :

- 1) Avaliar um novo procedimento metodológico de indução química de carcinogênese em pâncreas de hamster Golden Syrian , utilizando BHP, visando um melhor estudo das transformações precoces no processo neoplásico pancreático.
- 2) Correlacionar aspectos histopatológicos da neoplasia pancreática quimicamente induzida, com as possíveis respostas imunológicas do hospedeiro, estudando a participação dos infiltrados linfocitários peritumorais "TIL" , bem como a participação de outras células do Sistema Imune.
- 3) Estudar a participação das imunoglobulinas durante o processo neoplásico pancreático, analisando as suas variações humorais e suas participações durante as alterações dos tecidos.

O conjunto de análises paralelas feitas neste trabalho poderão contribuir com os aspectos básicos estabelecidos para novas fronteiras de terapias no combate e sobrevivência em câncer humano.

III - MATERIAIS E MÉTODOS

1. REAGENTES GERAIS:

BHP - N-nitroso-Bis(hidroxi-propil)amina

BOP- N-nitroso-Bis(oxopropil)amina.

(ASH Stevens INC - Detroit Research -USA)

Hematoxilina-Eosina - Hematoxilina de Harris-Shorr

(Gassalem-France)

Hemalun - Hemalun-eosina-safran - (Gassalem- France)

Leishman - Corante Azul Metileno Eosina -(Gurr-microscopy materials)

Tricrômico de Masson- (Prolabo- USA)

Azul de Orto-toluidina - (RAL-Societè Chimique -
Pointet Girard - France)

Bálsamo histológico - (Eukitt- O. Kindler Gmbh & Co.
Freiburg - R.F.A.)

Fosfato Monobásico de Sódio -(Prolabo- France)

Fosfato Bibásico de Potássio-(Prolabo- France)

Hidroximetil aminometano - (Sigma Chemical USA)

Soro Albumina Bovina (BSA) - (Sigma Chemical USA)

Pronase E - (Sigma Chemical-USA)

Paraformaldeído- (Merck)

Formalina - (Merck)

Glicerol-fosfato - (Merck)

Água Oxigenada -(Merck)

Metanol (p.a.) - (Merck)

Amino-etil-Carbazol -(Merck)

Dimetil-formamida -(Merck)

4- Cloro-1-naftol- (Merck)

Etanol (p.a.) - (Merck)

Xileno (p.a.)- (Merck)

Papel de Nitrocelulose - BA 85 0,45um- Ref. Nº. 401180
(Schleicher & Schuell)

2. REAGENTES BIOLÓGICOS :

2.1. SORO DE CAMUNDONGO ANTI-LINFÓCITOS "T" DE HAMSTER.

Obtenção :

Do timo de hamsters normais e jovens (17 semanas) foi obtida uma suspensão de células após homogeneização em uma solução tampão fosfato -PBS- em pH 7,2 , passada em um tamis.

As células foram lavadas tres vezes em tampão fosfato e centrifugadas a 1500 rpm durante 10 min. O centrifugado celular foi ressuspenso em tampão, completado de adjuvante-completo-de-Freund e injetado intra-peritonealmente em 10 camundongos BALB/c uma vez por semana, durante um período de 3 semanas. Cada injeção inoculada a cada camundongo continha $1,0 \times 10^7$ timócitos. Os animais foram sacrificados uma semana após a última injeção. Os soros obtidos foram aliquotados e acondicionados a (-20°C) . A especificidade do anti-soro foi controlada por reações imunohistoquímicas com células tímicas e áreas de células "T" em cortes do baço de hamsters normais.

Estes soros foram submetidos a absorção prévia com IgG ($\gamma 1, \gamma 2$) de hamster em 4°C , durante uma noite, utilizando 1ml de soro para 1mg de imunoglobulinas totais.

Nas reações controles estes soros foram também submetidos a uma absorção com timócitos de hamsters normais, utilizando 1ml de soro para 1×10^5 timócito em contacto a 4°C durante uma noite.

2.2. OBTENÇÃO E PURIFICAÇÃO DE IgG DE HAMSTER :

Os soros normais obtidos de cinco hamster foram submetidos a cromatografia de afinidade para obtenção de IgG1 e IgG2 destes animais, segundo uma separação em Cromatografia de Afinidade em coluna Sepharose - proteína A como descrito em (Escribano et al. , 1982). Para cada ml de soro de hamster normal foi obtido um total de 1mg de IgG ($\gamma 1, \gamma 2$).

2.3. SORO DE COELHO ANTI-IGG DE HAMSTER :

Foram utilizados soros de uso geral do laboratório obtidos por diferentes componentes do grupo. Estes soros foram obtidos conforme descrito em (Haddada et al., 1984).

Estes soros foram absorvidos com IgG ($\gamma 1, \gamma 2$) purificadas de hamster , durante a noite a 4°C, e utilizados nas reações de controle.

2.4. CONJUGADOS POLICLONAIS :

Soro de carneiro anti-IgG (H) de camundongo ligado a Isotiocianato de Fluoresceína.
(Diagnostic Pasteur- France)

Soro de cabra anti- IgG (H) de coelho ligado à peroxidase. (Diagnostic Pasteur- France)

.3. ANIMAIS :

Foram utilizados 35 (25 experimentais e 10 normais controles) hamster Golden Syrian, machos, adultos, mantidos em colônia singênica por 14 anos (Zuinghedau et al., 1979). Foram fornecidos pelo Biotério do I.R.S.C.(Institut de Recherches Scientifiques sur le Cancer) Villejuif- França.

4 . INDUÇÃO DE TUMORES :

BHP - N-nitroso-bis(hidroxi-propil)amina. Grupos de animais foram injetados por via intra-peritoneal, utilizando uma dose de 20mg por kilograma de peso uma vez por mês durante 3 meses. Grupos de 5 animais escolhidos ao acaso, foram sacrificados por sangramento sob anestesia em éter nas 30a, 35a, 39a, 44a e 55a semanas, após a 1a. injeção de BHP.

BOP - N-nitroso-bis(2-oxopropil)amina. Animais para induzir adenocarcinoma foram analisados em nosso laboratório de acordo com a indicação (Eriguchi et al., 1987). Secções foram gentilmente doadas pelo autor para análises comparativas em Câncer Bem-Diferenciado.

5 . PREPARAÇÃO DO PÂNCREAS PARA ANÁLISE HISTOLÓGICA E IMUNOHISTOQUÍMICA :

Preparo dos tecidos :

O pâncreas dos animais sacrificados foi processado para histologia convencional e para

as análises imunohistológicas. As amostras foram lavadas em solução tampão e congeladas a (-20° C) para cortes `a fresco em criostato . Os cortes processados a uma espessura de 5 µm , foram fixados em solução éter/acetona (1:2) e submetidos às reações imunohistológicas usadas nos testes preliminares. O restante das amostras foi fixado em formalina (Sol. neutra-tamponada 10%), embebido em parafina e após seccionado em espessuras de 5 µm (Sainte-Marie et al., 1962).

As secções foram rotineiramente processadas em técnicas de desparafinação e reidratação e submetidas a colorações e montagens em bálsamo .

Análise Histológica :

* Métodos de coloração - As secções de tecidos foram submetidas a diferentes métodos de colorações:

5.1. Hematoxilina-Eosina:

Esta coloração foi utilizada rotineiramente em todas as análises histológicas com o objetivo de estudar os aspectos estruturais dos tecidos pancreáticos bem como as diferentes afinidades pelos grupamentos ácido-básico deste corante.

Foi utilizada a técnica de coloração clássica.

5.2. Hemalun :

As secções que foram submetidas às reações imunohistoquímicas foram contra-coradas em hemalun-eosina-safran segundo os métodos clássicos com diferentes tempos de incubação.

5.3. Leishman :

Secções foram coradas em Leishman com o objetivo de analisar as diferentes populações celulares pertencentes ao sistema imunológico, as quais sofreram migrações para os tecidos pancreáticos de animais tratados.

Os cortes histológicos foram incubados com o corante durante um período de 3 minutos, posteriormente foram adicionadas gotas de água corrente de torneira, durante um período de incubação de 15 minutos. Após este período, os cortes foram lavados em água corrente de torneira, secados e analisados em microscopia ótica.

5.4. Tricrômico de Masson :

Nas análises do tecido conjuntivo as secções foram coradas em Tricrômico de Masson, segundo a técnica clássica.

5.5. Azul de Orto-toluidina :

Foi utilizado este corante com o objetivo de estudar além das estruturas do tecido pancreático, a presença de mastócitos nos tecidos pancreáticos.

Os cortes foram submetidos a uma incubação com o corante preparado 0,1% em um

pH de 4,5 em ácido acético, durante um período de 20 minutos e após lavados em água corrente de torneira, secados e analisados em microscopia ótica.

6. ANÁLISES IMUNOHISTOQUÍMICA :

6.1. REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA :

As secções obtidas em criostato foram utilizadas para análises preliminares das reações de imunofluorescência.

Outras secções do pâncreas foram desparafinadas, rehidratadas e incubadas com uma solução de soro albumina bovina a 2% (BSA) em tampão fosfato à temperatura ambiente durante 5 min.

Após, as secções foram incubadas com soro de camundongo anti-linfócito "T" de hamster em uma diluição de 1/100, durante 30 min., a 4^o C. Foram feitas lavagens com PBS durante 10 min. Em seguida foi adicionado soro de coelho anti-IgG de camundongo ligado à Isotiocianato de fluoresceína, em uma diluição de 1/200 durante um período de 1 hora a 4^o C. Após as incubações foram feitas lavagens sucessivas com tampão durante 10 min e montadas em glicerol-tampão fosfato. Os tecidos foram examinados ao microscópio de fluorescência Zeiss equipado com lâmpada de mercúrio HBO 200 (Osram).

6.2. REAÇÃO DE IMUNOPEROXIDASE INDIRETA :

** Pesquisa de imunoglobulina "in situ" :*

As secções dos tecidos pancreáticos foram desparafinadas e submetidas a uma incubação com Sol. de Água Oxigenada 0,5% em metanol p.a. durante 15 min. à temperatura ambiente. A seguir, foram submetidas aos processos histológicos convencionais de reidratação. As secções foram incubadas com sol. de Pronase E a 0,25% em PBS durante 5 min, sendo lavadas exaustivamente em PBS durante 15 min. Em seguida, foram incubadas com sol. de BSA a 2% em PBS, durante 10 min. à temperatura ambiente. Após lavagem em PBS as secções foram incubadas com soro de coelho anti- IgG de Hamster, diluído 1:100 em PBS, durante 30 min. em câmara úmida à temperatura ambiente. Após este período as secções foram lavadas exaustivamente em PBS e submetidas à incubação com soro de cabra anti-IgG de coelho marcado com peroxidase em uma diluição de 1:100 em PBS, durante 1 hora à temperatura ambiente, em câmara úmida. O substrato foi preparado no momento de uso, adicionando-se uma sol."A" de Ácido Acético a 3% em sol."B" de Amino-etil-Carbazol 1,2% em Dimetil-formamida, formando uma solução "C". A esta solução "C" após filtração, foram adicionados 6 µl de Água Oxigenada. As secções foram imersas nesta solução final durante um período de 10 min à 37° C. Após lavagem em água corrente estas foram contra-coradas em Hemalun durante 1 min. Lavadas em água corrente de torneira os cortes foram montados em bálsamo e submetidos às análises microscópicas.

As secções de tecidos pertencentes aos animais normais foram rotineiramente submetidas aos mesmos tratamentos durante as análises.

Também foram realizadas reações controle com o antissoro específico (Anti-IgG de hamster), sendo previamente absorvidos com IgG purificadas de hamster, e submetidos às mesmas condições técnicas de análises.

*** Pesquisa de imunoglobulina sérica dirigida contra o tecido pancreático:**

Outras secções do pâncreas de animais normais ou tratados, submetidas às análises de IgG presentes no soro com especificidade ao tecido pancreático, foram processadas segundo a técnica mencionada anteriormente. Os cortes foram previamente incubados com soro de hamster normal ou tratado, em uma diluição 1:100 em PBS durante 30 min. à temperatura ambiente, antes da incubação com soro de coelho anti- IgG de hamster.

**7. ANÁLISES DAS IMUNOGLOBULINAS SÉRICAS ATRAVÉS DA
FIXAÇÃO IMUNE EM NITROCELULOSE:
(Dot-Blot - Semiquantitativo)**

Para a avaliação das imunoglobulinas IgG totais no soro de animais normais e tratados, foi utilizada a técnica de DOT-BLOT, que consiste na fixação das imunoglobulinas em papel de nitrocelulose (NIF- modificado segundo Imperial et al., 1988).

Os soros de animais normais e tratados foram diluídos em series logarítmicas até 12 vezes à partir de uma diluição 1/500 em PBS , sendo aplicados um volume de 1.0 µl em cada ponto. Foram lavados exaustivamente com PBS e incubados com solução de BSA 2% durante 30 min, temperatura ambiente, sob leve agitação.

Soro de coelho Anti-IgG ($\gamma 1$, $\gamma 2$) de hamster, diluído 1/1000, foi adicionado aos pontos fixados sendo incubado durante um período de 2 hrs., à temperatura ambiente e com leve agitação, conforme modificação (Escribano et al.,1982). Lavados exaustivamente em PBS durante 10 min.

A seguir, foi adicionado soro de cabra anti- IgG(H) de coelho marcado com peroxidase na diluição 1/100 durante 1 hora, a temperatura ambiente , com leve agitação.

O substrato da peroxidase foi preparado no momento de uso, adicionando-se uma solução "A" (4 cloro-naftol 0,3% em metanol) em uma solução "B" de PBS mantendo uma proporção de 1:5 nesta solução "B". Em seguida à esta mistura foram adicionados 3 µl de água oxigenada. Durante um período de 8 min. à temperatura ambiente. Após foi lavado exaustivamente em PBS em seguida em água destilada . Secados naturalmente, foram submetidos às leituras.

Foram efetuadas paralelamente análises controles em soro de hamster normais e padrões controles usando ora um ora outro antissoro, ou seja; trabalhados separadamente.

8. OBTENÇÃO E ANÁLISE DIFERENCIAL DE CÉLULAS PERIFÉRICAS:

Previamente, os animais normais e os animais tratados (30a, 35a, 39a, 44a, 55a semanas) foram anestesiados com clorofórmio e sangrados por via braquial. Foram confeccionados os esfregaços sanguíneos em lâminas de vidro, após estes foram secados e submetidos à coloração pelo Leishman durante 3 min. e após adicionado água de torneira e incubados por 15 min . Foram lavados em água de torneira , secados e contados em microscopia ótica um total de 100 leucócitos , observando-se assim a proporção dos tipos diferentes destas células , analisando-se seus aspectos morfológicos.

9. OBTENÇÃO E ANÁLISE DIFERENCIAL DE CÉLULAS PERITONEAIS

Populações de células da cavidade abdominal de animais normais e animais tratados

(30a, 35a, 39a, 44a, 55a semanas) foram obtidas à partir de suspensões de lavados peritoneais, obtidas pelo inóculo de PBS em massagens abdominais durante 3 min. As células foram fixadas em soluções de Paraformaldeído a 1% em tampão PBS. Após um período de 15 min., o "pellet" foi retirado e espalhado em uma lâmina . Após secagem as células foram coradas pelo Leishman durante 3 min , adicionadas de água de torneira e incubadas 15 min. Em seguida o esfregaço foi lavado exaustivamente em água de torneira, secados `a temperatura ambiente e contadas ao microscópio ótico um total de 100 células, anotando a proporção das diferentes populações celulares.

1ª PARTE

- ASPECTOS HISTOLÓGICOS E IMUNOHISTOLÓGICOS DO PÂNCREAS DE ANIMAIS NORMAIS.**
 - MODIFICAÇÕES MACROSCÓPICAS E MICROSCÓPICAS DO PÂNCREAS DOS ANIMAIS TRATADOS POR NITROSAMINAS.**
-

1. ASPECTOS HISTOLÓGICOS E IMUNOHISTOLÓGICOS DO PÂNCREAS DE ANIMAIS NORMAIS:

A) Coloração pela Hematoxilina-Eosina:

O epitélio pancreático exócrino, em animais normais, mostrou ser constituído de uma compacta massa de grupos celulares acinares (ácinos), corada, uniformemente, com a presença de ductos, vasos sanguíneos de diferentes calibres distribuídos uniformemente em diversas áreas do estroma pancreático(Figura 1). Nesta coloração, em torno dos grupos de células acinosas (ácinos) ou dos vasos, o tecido conjuntivo apresentou-se com característica amorfa, o qual se estendeu por todos os espaços entre os lóbulos, até os compartimentos dos grupos acinares. Espaçadamente, estavam presentes algumas células mononucleares, entre os lóbulos e lóbulos, as quais foram bem evidenciadas por esta coloração. Entretanto, era relativamente constante a presença destas células no tecido conjuntivo que contornava todo o pâncreas, com o comparecimento esporádico de alguns polimorfonucleares, observando portanto raros neutrófilos e eosinófilos.

B) Coloração pelo Tricrômico de Masson :

Foi observado, através desta coloração, a presença de tecido conjuntivo nos septos, entre os lobos, bem como no contorno do órgão (cápsula), ou nas adjacências dos vasos, caracterizados pela coloração azul. Somente os animais normais, apresentaram este tecido um pouco mais espesso.

Entre os lóbulos ou entre os ácinos, este tecido apresentou-se como uma camada extremamente fina e levemente corada (**Figura 2**).

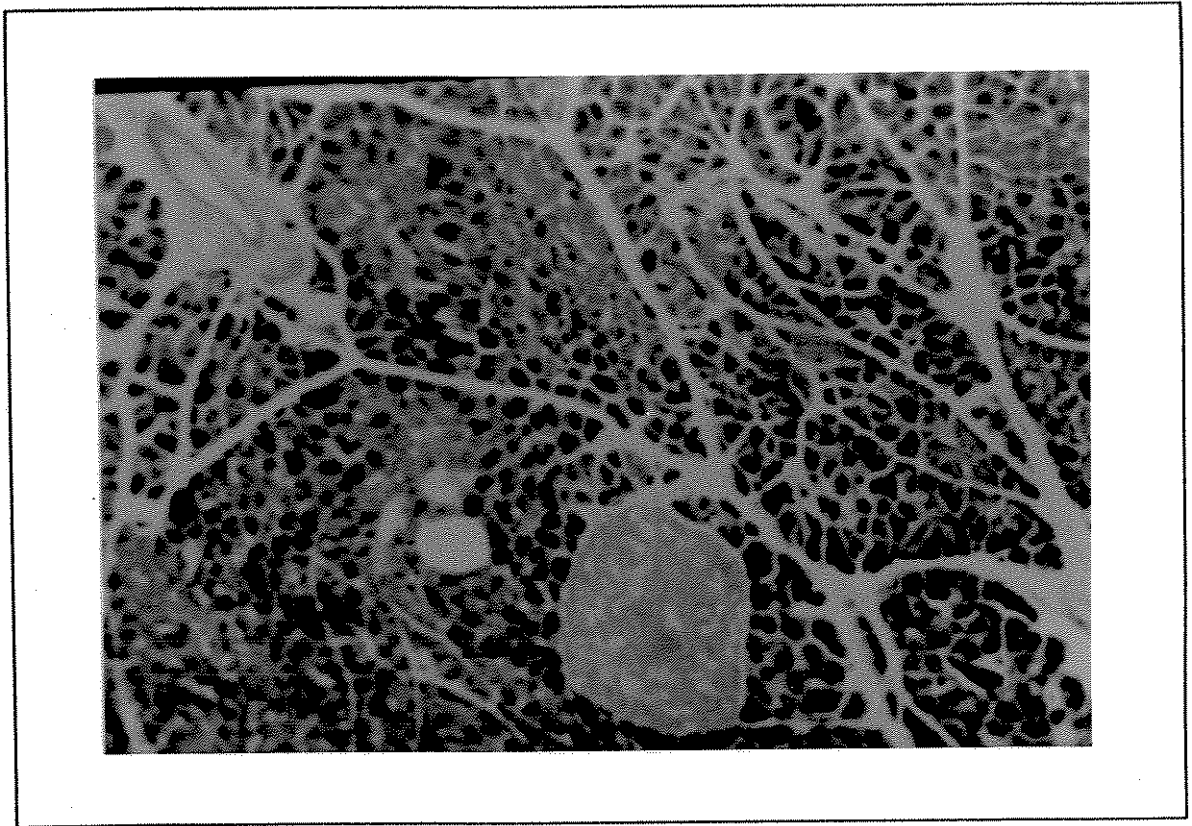


Figura 1: Pâncreas exócrino e endócrino de um animal normal não tratado. Na porção exócrina observam-se os lobos delimitados pelos septos, enquanto verifica-se a presença dos lóbulos que estão contidos nestes, os quais são formados por grupos de ácinos, que apresentam em seu interior um conjunto de 4 a 6 células acinares (não visíveis a esta ampliação). Pode-se observar a presença de uma Ilhota de Langerhans (seta). Coloração: Hematoxilina-Eosina. (Aumento original: 63x)

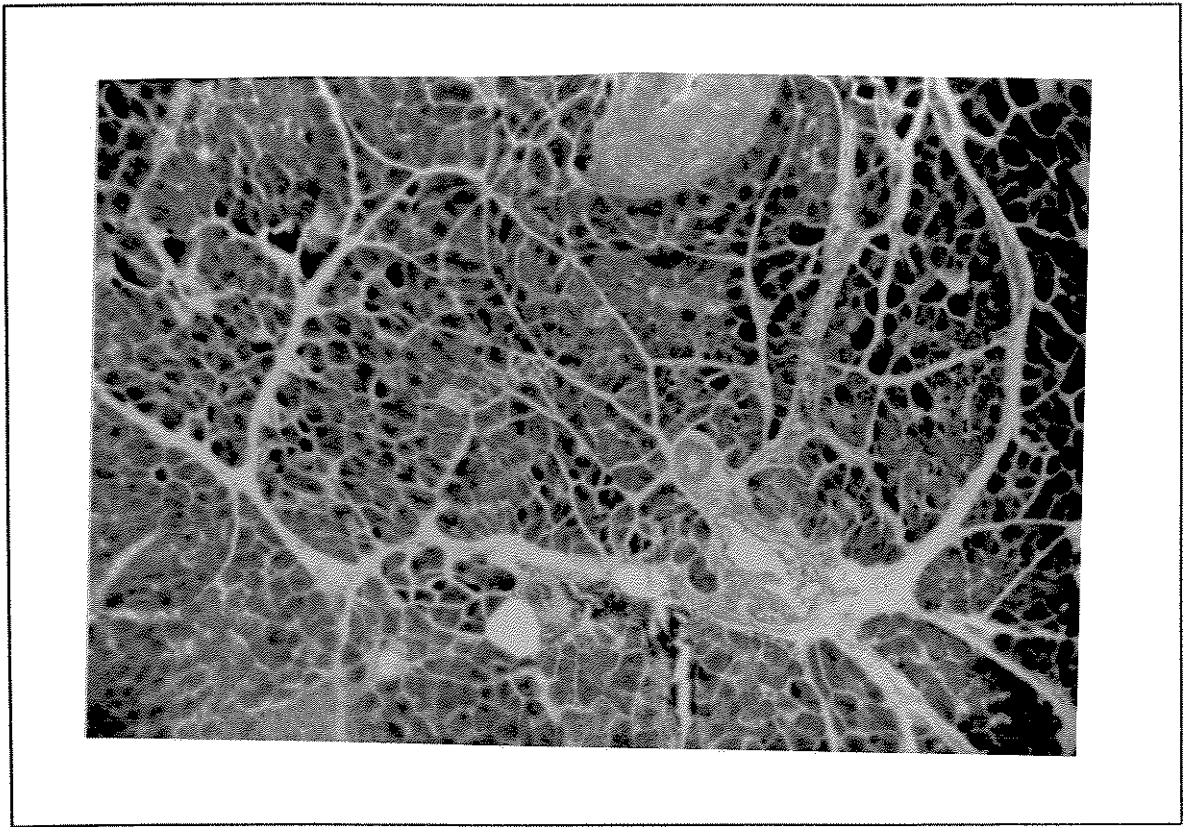


Figura 2: Pâncreas de um animal normal não tratado. Aspecto normal do tecido conjuntivo (estroma) evidenciado pela coloração azul, característica do colágeno, notável entre os lobos e principalmente em torno dos ductos e vasos. Coloração : Tricrômico de Masson. (Aumento original: 63x)

C) Coloração pelo Leishman:

Através desta coloração, a maioria dos animais normais não tratados apresentou características basófilas nas estruturas nucleares e citoplasmáticas das células acinosas. Entretanto, o tecido conjuntivo apresentou-se com discreta metacromasia, quando tratado por este corante.

As ilhotas de Langerhans mostravam-se bem evidentes, assim como a separação dos lobos. Células do S. Imune podiam ser localizadas, intralobularmente(**Figura 3**).

D) Coloração pelo Azul de Orto-toluidina:

O tecido pancreático dos animais normais, apresentou-se com uma grande basofilia em toda a sua extensão, quando corado pela O-toluidina. Esta coloração foi importante na caracterização dos mastócitos, os quais apresentavam uma forte metacromasia, sendo bem evidenciados por este método. Estas células, apresentando-se em pequeno número, situavam-se em pontos diferentes do tecido conjuntivo, nas extremidades do órgão, em torno dos grandes vasos e capilares (Dados não mostrados).

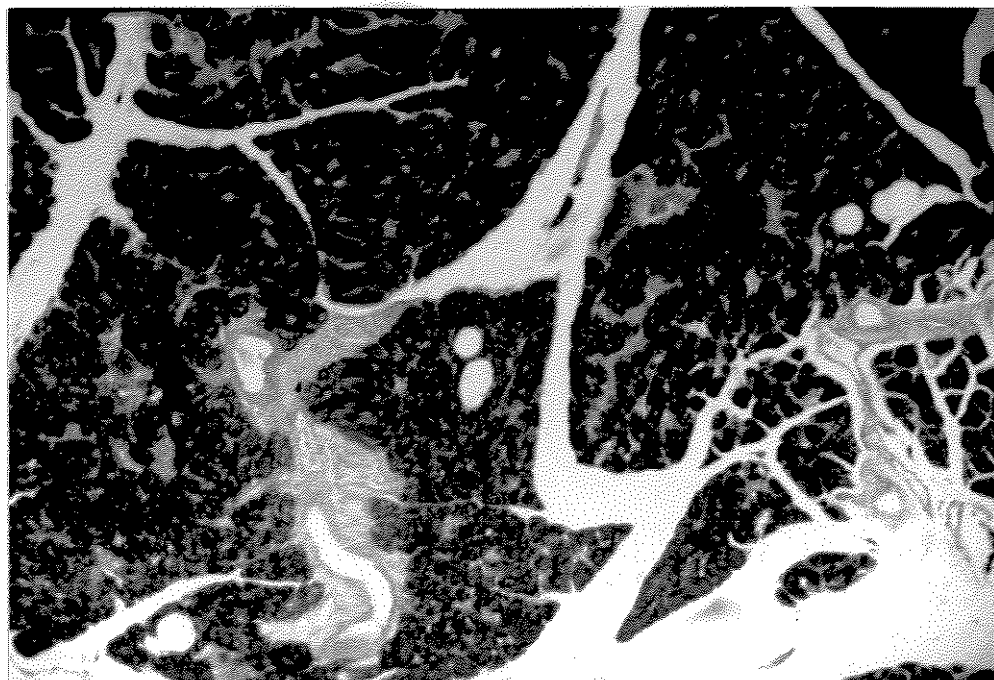


Figura 3: Pâncreas exócrino de um animal normal não tratado, mostrando-se aspecto basófilo. Neste aumento o núcleo e citoplasma das células acinares, com características basófilas, não foram evidenciados. Tecido conjuntivo apresentando-se discreta metacromasia em torno dos ductos e vasos sanguíneos. Coloração: Leishman. (Aumento original: 63x)

2. AVALIAÇÃO DOS ASPECTOS HISTOPATOLÓGICOS E IMUNOPATOLÓGICOS DO PÂNCREAS, EM ANIMAIS TRATADOS:

2.1. ASPECTOS GERAIS MACROSCÓPICOS:

Os dados obtidos mostraram que nenhum dos animais tratados por BHP , segundo o nosso esquema de indução da carcinogênese (conforme Material e Métodos) , apresentou os sintomas geralmente descritos em processos carcinogênicos associados ao tratamento de BHP e BOP.

Em particular, a massa corpórea permaneceu praticamente constante durante o desenvolvimento do experimento, conforme (Tabela I) .

Na necropsia, o pâncreas da maioria dos animais tinha aspecto macroscopicamente aparentemente normal, principalmente até a 40a. semana, após a primeira injeção do produto carcinogênico. Após este período, vários animais tratados apresentavam pâncreas de aspecto avermelhado, com evidentes sinais de neovascularização.

Na 55a semana, ficou evidenciado, em alguns animais, uma diminuição da musculatura abdominal. Nenhuma massa tumoral pancreática foi macroscopicamente observada durante os experimentos e somente evidências mais acentuadas de processos inflamatórios apareceram, durante a 55a semana , após a primeira injeção, com um comprometimento maior do órgão.

TABELA I - Peso dos hamsters tratados por BHP

Intervalos Experimentais (semanas)	Massa Corpórea (g)*
0	94 (80-100)
30	93 (83-100)
35	99 (90-105)
39	101 (98-106)
44	98 (95-100)
55	97 (90-104)

* Média dos pesos de cinco animais, com intervalos de variações em parenteses de valores máximos e mínimos.
0 = controle em animais escolhidos ao acaso.

2.2. ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS DO TECIDO ACINAR :

Uma das primeiras alterações observadas entre as células acinares foi a modificação de um estado basófilo para acidófilo. Este processo se iniciou em algumas células acinares, particularmente a nível de núcleo, que passou a apresentar também uma alteração em sua morfologia, bem como um aumento no número de nucléolos. Posteriormente, surgiu uma precipitação no citoplasma, com característica acidófila, revelada pela coloração em hematoxilina-eosina. Esta precipitação, às vezes, apresentava características de metacromasia, através das reações com o corante Leishman (Figura 4). Estes resultados ocorreram durante a 30ª semana após a primeira injeção, desaparecendo posteriormente as características acidófilas dos tecidos, na maioria dos animais estudados, durante a evolução da carcinogênese.

As alterações acidófilas apresentaram-se em duas diferentes formas:

- Através das colorações com Hematoxilina-Eosina, observamos acidofilia nos grupos acinares localizados nos tecidos nas extremidades do órgão, mantida ao longo da evolução do processo.
- Através das colorações pelo Leishman, em geral, observamos uma acidofilia nas estruturas nucleares e, mais tarde, precipitações acidófilas a nível de citoplasma, após houve uma modificação para basofilia durante a evolução do processo tumoral.

Dentre as análises citológicas das alterações encontradas nas células acinares, quanto à morfologia, foram observados polimorfismo nuclear com alterações no tamanho destas células, e alterações no tamanho do lado destas células acinares. Detectou-se também, sofrimento celular com presença de vacúolos e, posteriormente, morte celular, com desarranjo estrutural dos grupos de ácinos dentro dos lóbulos .

Através da Figura 4 , podemos observar grupos de ácinos, cujas células evidenciam alterações morfológicas. Estas alterações foram importantes, quanto ao tamanho das células e a presença de vacúolos, tornando as áreas citoplasmáticas destas células, diferentes das que

estavam presentes em tecidos normais. Estes ácinos mostraram-se rodeados por outros, com células de estrutura morfológica aparentemente normal.

Em áreas mais distantes do pâncreas exócrino, observamos lóbulos inteiros, com aspecto acidófilo. As acinares pertencentes a estes lóbulos, apresentavam características acidófilas, sendo observado também outras alterações morfológicas, porém menos acentuadas, tais como : diminuição dos lados das células acinares, resultando portanto uma diminuição da distância inter-nuclear. Neste mesmo período em alguns animais, as alterações das acinares presentes nos lóbulos com aspecto acidófilo, consistiam somente em um aumento nas áreas citoplasmáticas e a presença de alguns nucléolos. Portanto, estas alterações eram variáveis nos diferentes animais.

Na **figura 4** , podemos ver grupos de ácinos apresentando células com citoplasma basófilo, ao lado de um deslocamento do núcleo apical, em presença de alta atividade mitótica de acinar, dando origem a muitas células por ácino.

Em diferentes lóbulos da mesma porção exócrina, no conjunto de células acinares, foram observados que o citoplasma destas células mostravam aspectos ora acidófilo ora basófilo.

A basofilia citoplasmática das acinares de toda a porção exócrina foi consideravelmente diminuída, durante a evolução do tratamento carcinogênico, quando os tecidos pancreáticos dos diferentes animais foram estudados pela coloração em Leishman. Estas células retornaram a evidenciar uma forte basofilia nos tecidos com neoplasia bem definida.

Nas secções de adenocarcinoma pancreático (cedidas por Eriguhi et al 1987) , nós observamos uma intensa basofilia em todo o tecido acinar, quando corado pelo Leishman. Esta basofilia evidenciava-se principalmente no núcleo e citoplasma das células em transformação morfológica(Dados não mostrados).

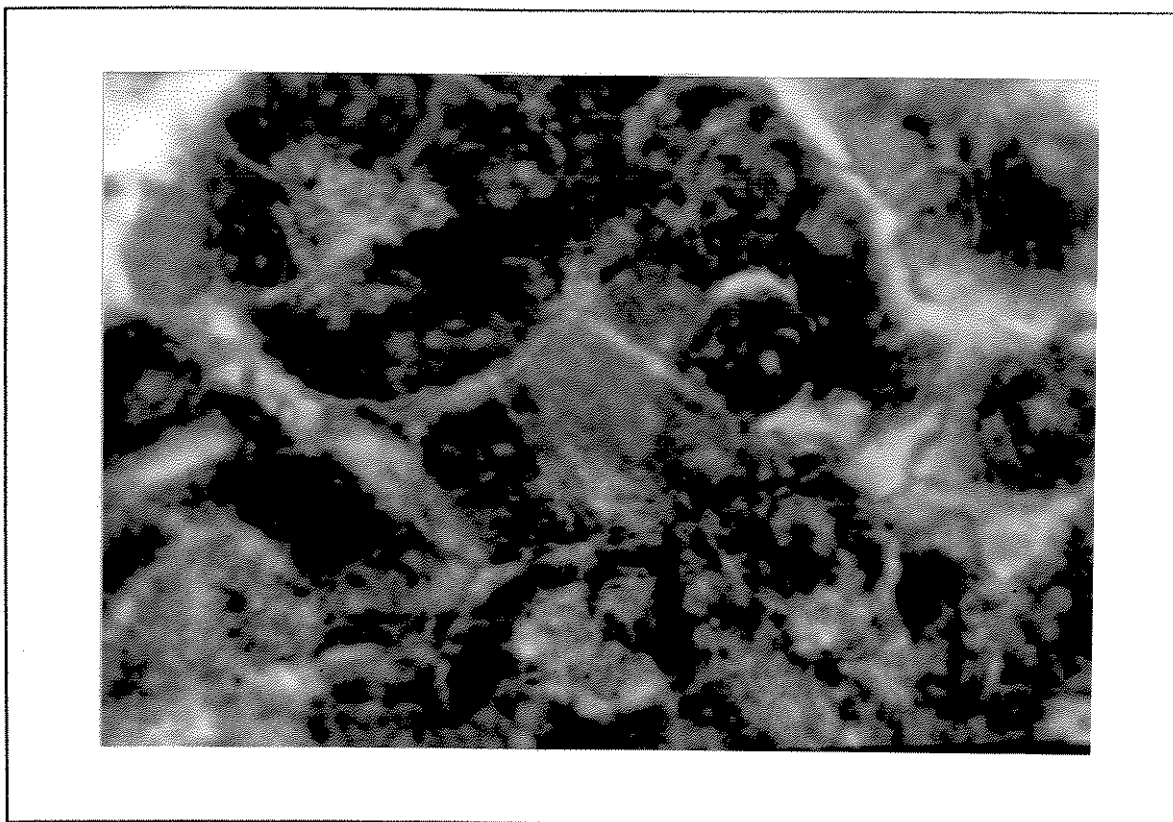


Figura 4: Aspecto histológico do tecido pancreático exócrino de um animal tratado, mostrando os primeiros sinais de alterações (animal na 30a. semana após primeira injeção). Revela-se forte metacromasia a nível de núcleo com alterações quanto ao número de nucléolos. Presença de granulações metacromáticas no citoplasma e extra celular, acompanhando a presença de diversos vacúolos citoplasmáticos. Coloração: Leishman. (Aumento original: 1000x)

2.3. ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS DO TECIDO CONJUNTIVO :

Uma das primeiras alterações observadas no tecido pancreático foi relacionada com as modificações do tecido conjuntivo, as quais surgiram na 30a semana de estudo. Através da coloração pelo Tricrômico de Masson, foi observado que, durante a evolução do período pré-tumoral, houve um aumento do conjuntivo, entre os tecidos pancreáticos, o qual foi atribuído a aumento de colágeno nestes tecidos (coloração azul).

À partir da 30a semana de tratamento, observou-se uma importante distância entre as células acinares, proporcionada pelo aumento do tecido conjuntivo entre elas. Houve também aumento em torno dos vasos sanguíneos, vasos capilares e ductos.

Um aumento constante da concentração do colágeno na região peri-ductal foi observado, com uma invasão de todo o tecido, como também intra lóbulos e, freqüentemente, em paralelo ao aparecimento das lesões celulares(**Figura 5**).

Uma outra observação importante foi a presença da fibrose , ao longo do tratamento carcinogênico. Nos septos ou nos espaços intra-lobulares, vários animais apresentaram o tecido pancreático muitas vezes repleto de fibrose, intensamente corada pelo Tricrômico de Masson (**Figura 6**). Em paralelo a estas observações, os fibroblastos continham material citoplasmático em intensa coloração azul pelo tricrômico, apresentando, também, um aumento na sua dimensão citoplasmática e no seu número, mais evidenciado em várias regiões do tecido (Dados não mostrados).

As análises efetuadas em adenocarcinomas obtidos previamente em nosso laboratório com tratamento por BOP (em secções fornecidas por Dr. Eriguchi), revelaram áreas repletas de uma massa de colágeno , fortemente corada pelo Tricrômico de Masson. Esta concentração de colágeno situava-se entre os ácinos, em processos de lesão, em torno dos ductos em hiperplasia, e em todas as regiões do parênquima pancreático comprometido pelo processo tumoral (**Figura 7**).

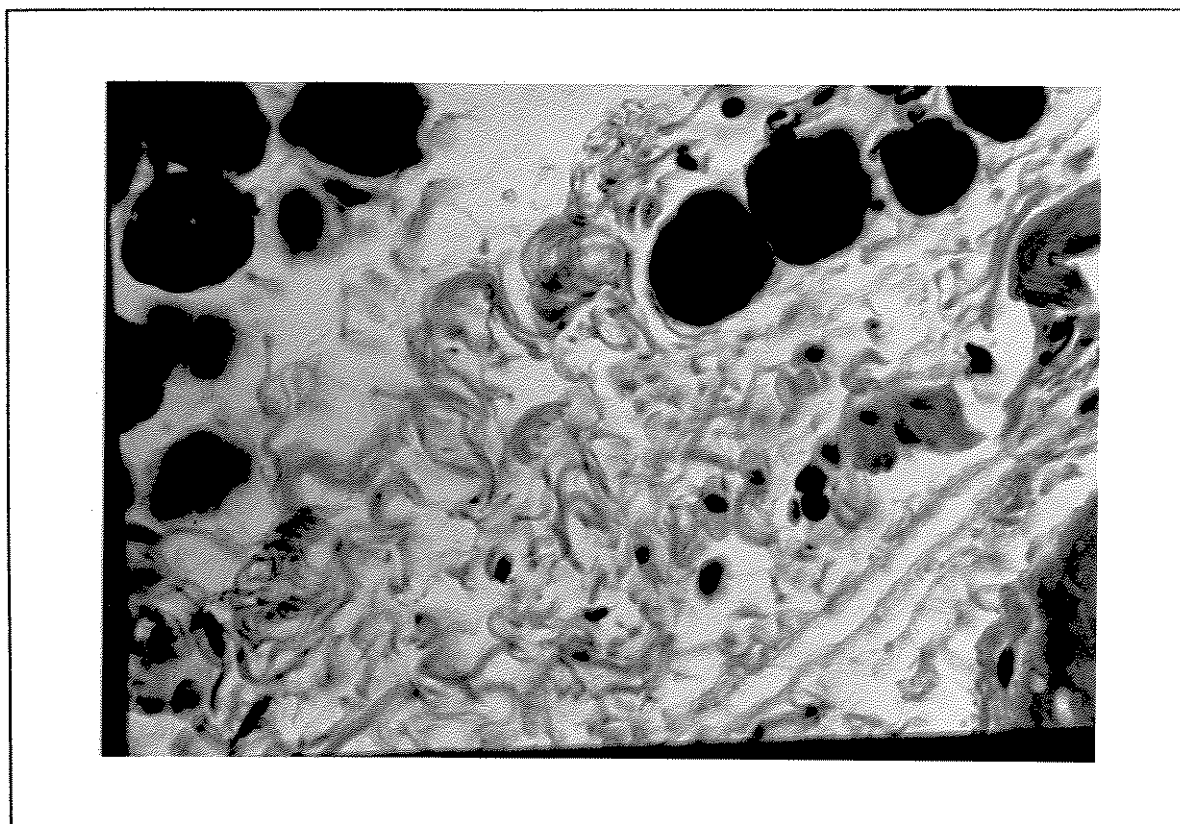


Figura 5: Aspecto do pâncreas de um animal tratado (40a semana), mostrando um início da formação de uma barreira de colágeno no tecido acinar, além de grupos acinares em processo de degeneração focal. No ângulo superior, à esquerda, verificam-se ácinos intáctos, sem mostrar aspecto de transformação neoplásicas. Coloração : Tricrômico de Masson. (Aumento original: 400x)

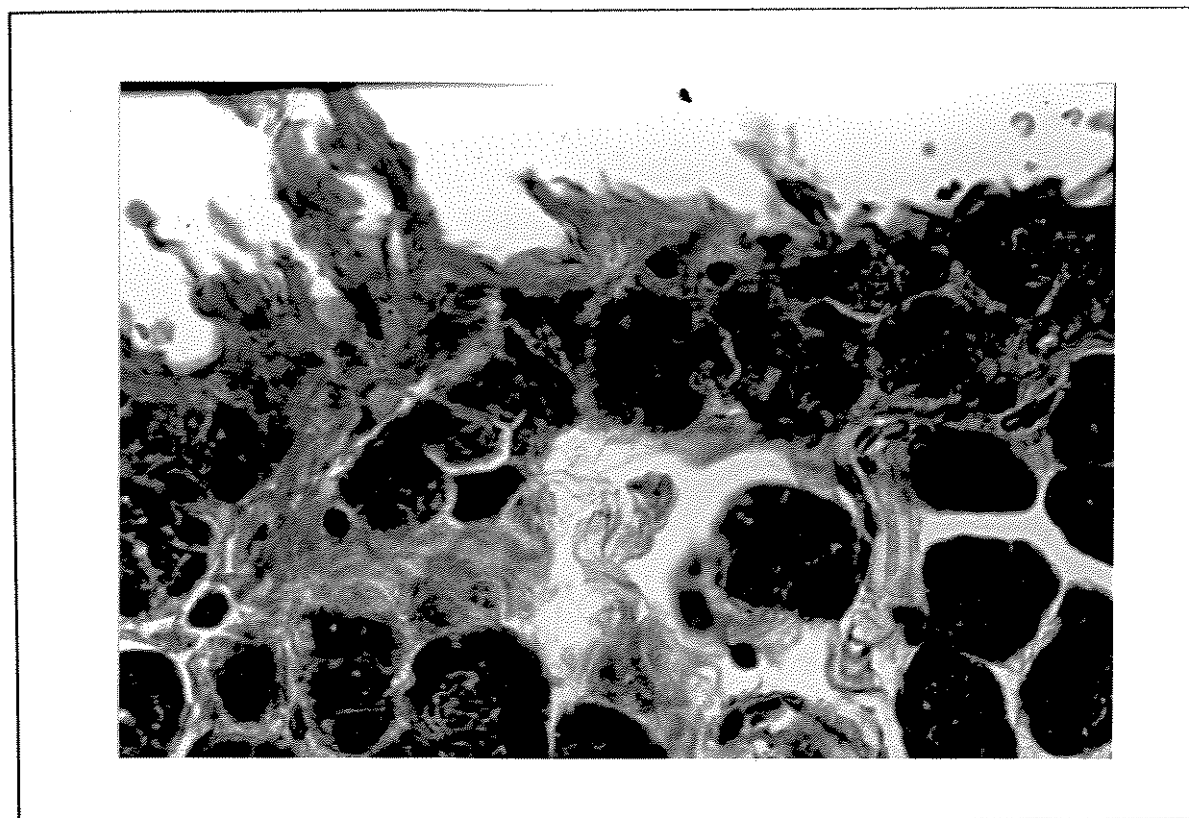


Figura 6: Pâncreas de um animal tratado, após 44 semanas, mostrando fibrose intensa. Áreas com lesões dos grupos acinares, em paralelo a participação de células mononucleares, indicando presença no tecido de um processo de transformação. Coloração : Tricrômico de Masson. (Aumento original: 400x)

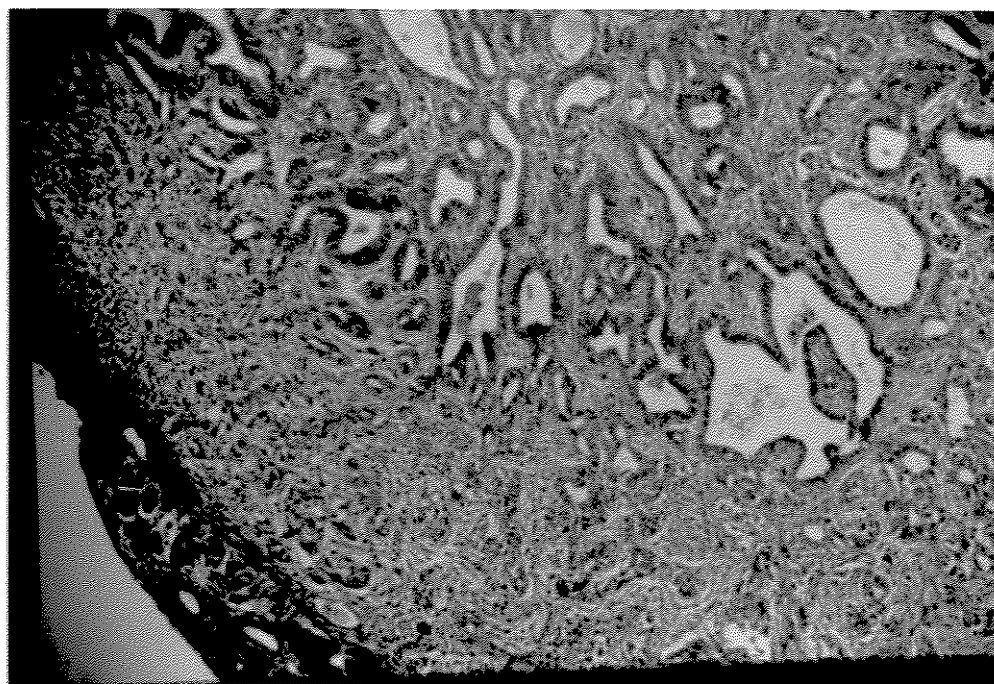


Figura 7: Pâncreas de animal tratado com BOP (Gentileza do Dr. Erguichi et al, 1987), mostrando aspecto adenocístico, áreas papilíferas com fibrose intensa e difusa. Coloração: Tricrômico de Masson. (Aumento original: 63x)

2.4. FORMAÇÃO DO TECIDO TIPO ADIPOSEO :

Com a evolução do tratamento, o pâncreas exócrino dos animais apresentou um afastamento entre os lóbulos acinares, com lesões de grupos acinares (ácinos) e ausência de material biológico entre as células de sustentação do tecido; os fibroblastos. Este fenômeno apresentou-se como uma nova estrutura no parênquima pancreático, com a formação de um tecido tipo adiposo, o qual está também presente nos tecidos pancreáticos de animais normais em uma pequena quantidade, o que é o resultado normal de uma renovação constante dos ácinos. Na **Figura 8** observa-se uma região mostrando um aumento deste tecido tipo adiposo, o qual proporcionou um aumento da massa tecidual de todo o parênquima pancreático.

2.5. HIPERPLASIAS E LESÕES TECIDUAIS PANCREÁTICAS :

As características histopatológicas do pâncreas de animais tratados foram estudadas individualmente, através da histologia convencional (Hematoxilina & Eosina), conforme apresentado na **Tabela II**.

Foram observados lesões pré-neoplásicas no tecido acinar as quais incluem importantes alterações morfológicas das células acinares. As extensões destas lesões foram variáveis de animal para animal.

Em épocas diferentes, os animais apresentaram regressões ductais, tais como: cistadenomas e hiperplasia ductal. Entretanto, nenhum dos animais entre os grupos estudados, apresentou aspecto definitivo de adenocarcinoma pancreático.

A partir da 44a semana, todos os animais tratados apresentaram cistadenomas e hiperplasia ductal do tecido exócrino.

Foi observado, somente através das colorações com Leishman, que nos espaços da membrana basal dos ductos que apresentavam o epitélio hiperplásico, alguns animais exibiam estruturas arredondadas, com características metacromáticas. Estas estruturas em outros processos de coloração, apresentaram-se incolores e com um aspecto amorfo (Figura 9).

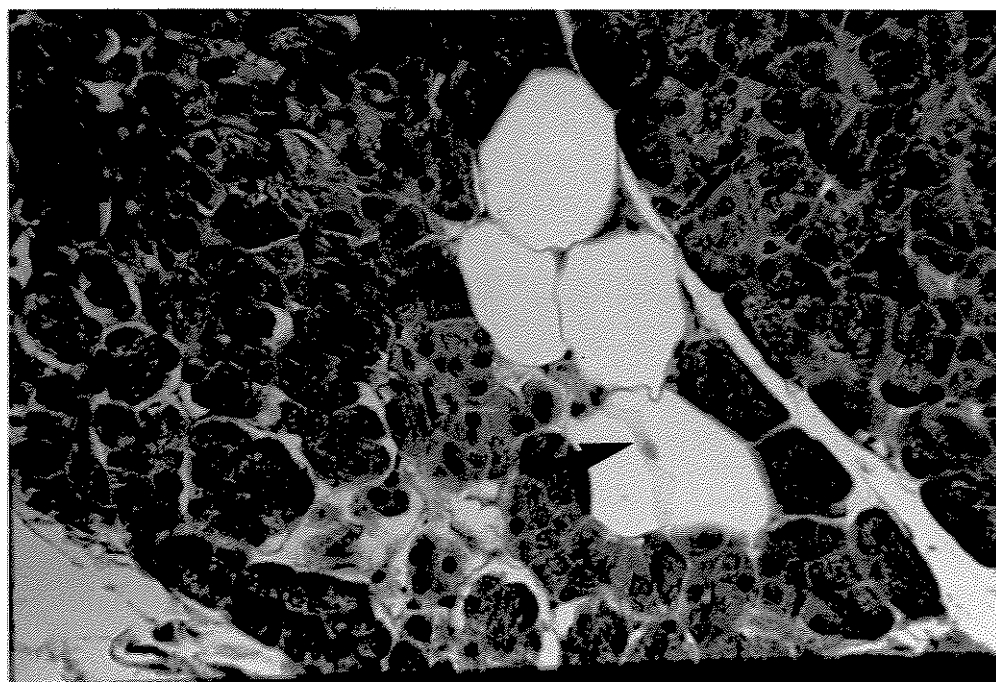


Figura 8: Tecido pancreático de animal tratado, correspondendo a 35ª semana após a primeira injeção, mostrando uma destruição de alguns ácinos e promovendo a formação de tecido tipo adiposo. Observar os contornos ainda com restos de células acinares delimitados por fibroblasto (Seta). Coloração: Tricrômico de Masson. (Aumento original: 200x).

TABELA II - Extensão da infiltração de linfócitos e lesões pancreáticas em função do tratamento por BHP.

Experimental tempo(semanas) *	Linfócito infiltração **	Cistadenoma **	Hiperplasia ductal **
30	2	1	1
35	3	2	2
39	5	3	2
44	5	5	5
55	5	5	5

* Semanas seguindo a primeira injeção de BHP.

** Número de casos Positivos em grupo de cinco animais.

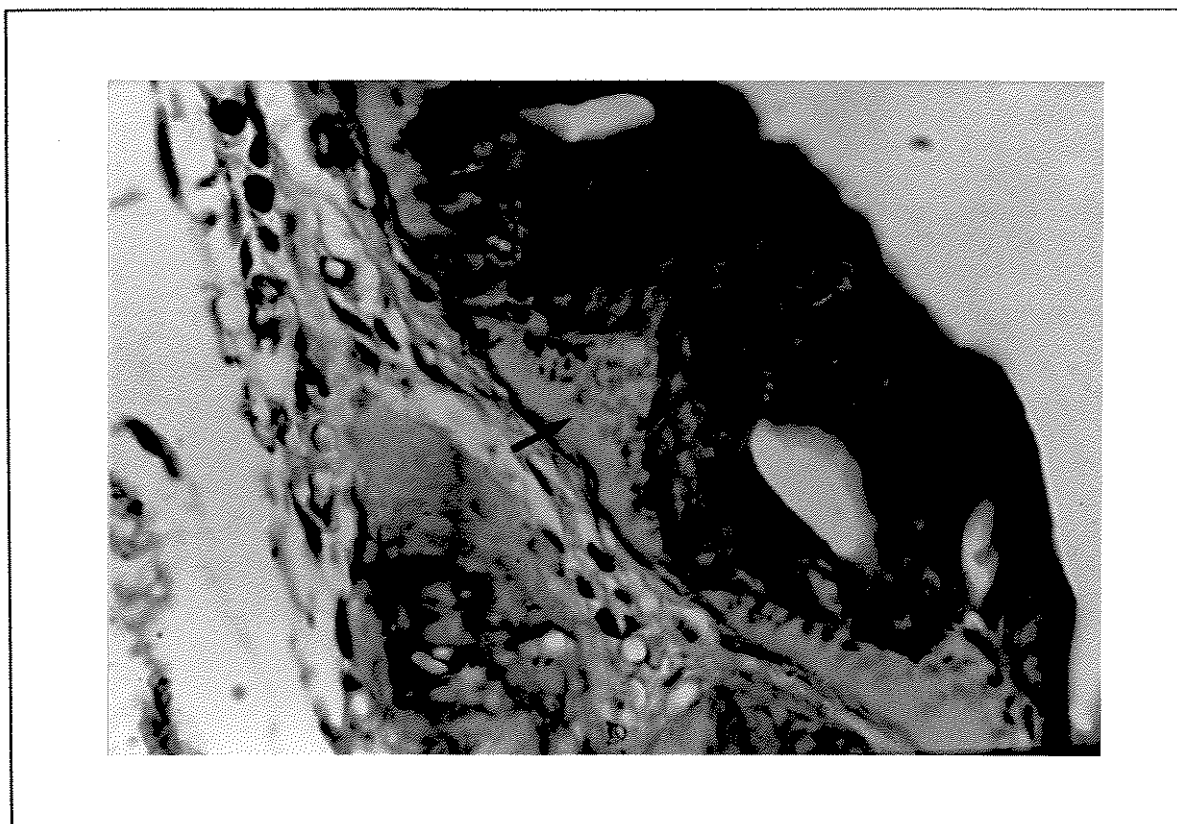


Figura 9 : Imagem do pâncreas de um animal tratado (44a semanas), apresentando epitélio de revestimento ductal hiperplásico, com possíveis debris celulares na sua lâmina basal (Seta). Pode-se também observar mastócitos ainda não degranulados nas adjacências do ducto . Coloração: Leishman. (Aumento original: 400x).

2ª PARTE

RESPOSTA IMUNOLÓGICA DURANTE A CARCINOGENESE: ASPECTOS CELULARES

1. QUANTIFICAÇÃO DE CÉLULAS PERIFÉRICAS E PERITONEAIS :

As diferentes populações celulares de origem periférica ou peritoneais guardavam características morfológicas normais, quando examinadas pela coloração com o Leishman .

Em geral foram pequenas as alterações destas células, quanto ao número, não havendo qualquer alteração em relação à morfologia das populações de leucócitos periféricos (Linfócito, Monócito, Neutrófilo segmentado, Eosinófilo e Basófilo), em animais tratados quando comparados aos animais normais (Figura 10).

Também, não houve, em geral, alterações nos valores dos animais tratados, quanto às populações celulares do peritônio (Macrófago, Monócito, Linfócito, Mastócito e Neutrófilo), quando comparados com os animais normais (Figura 11).

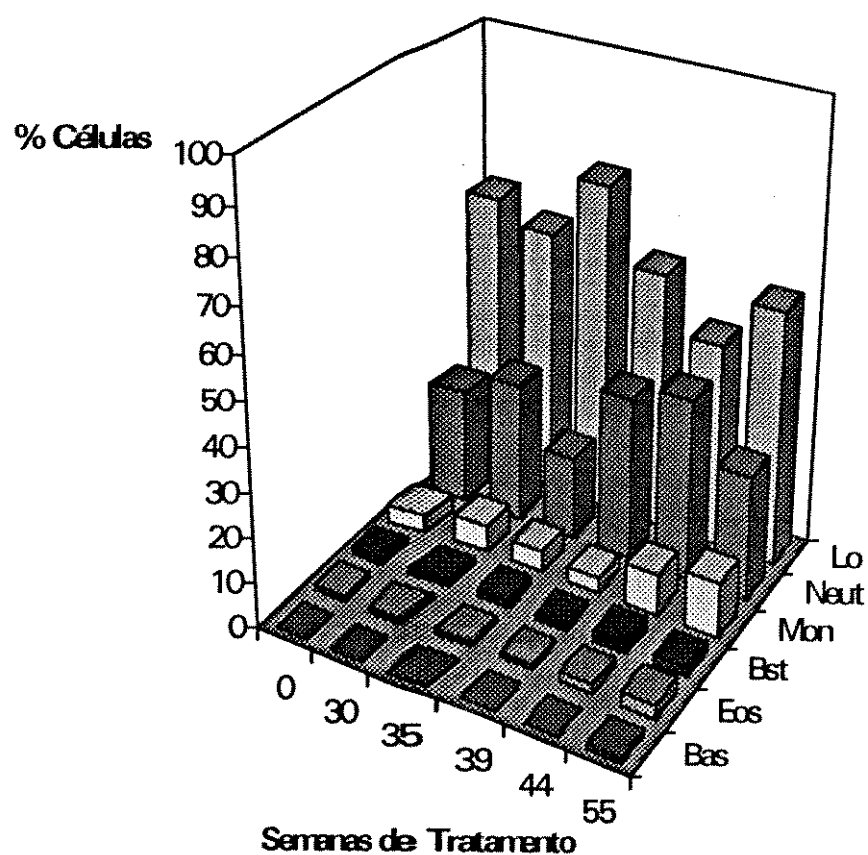


FIGURA 10: CITOMETRIA DE CÉLULAS PERIFÉRICAS .

As variações das populações leucocitárias da circulação sanguínea nos animais tratados, correspondem aos limites dos valores encontrados em animais normais. Foram estudadas as seguintes populações celulares: Linfócito, Neutrófilo (segmentado), Monócito, Neutrófilo (bastonetes), Eosinófilo e Basófilo.

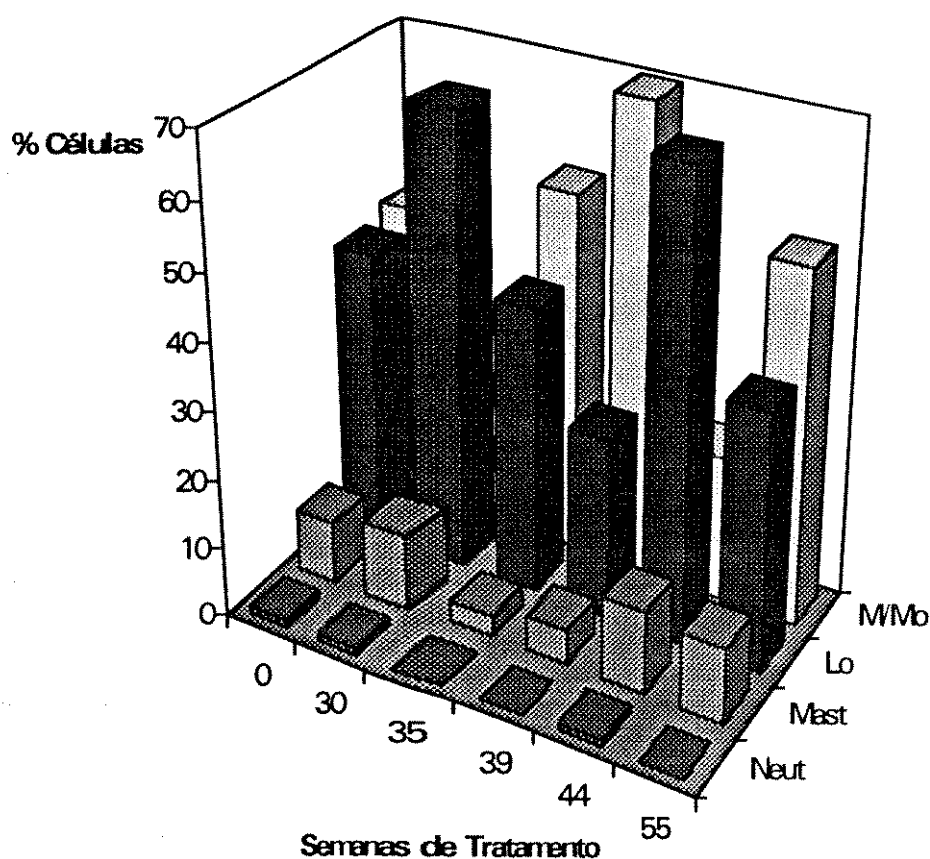


FIGURA 11: CITOMETRIA DE CÉLULAS PERITONEAIS.

As variações das diferentes populações celulares da cavidade peritoneal dos animais tratados, correspondem aos limites dos valores encontrados em animais normais. Foram estudadas as seguintes populações celulares: Monócito/Macrófago, Linfócito, Mastócito e Neutrófilo.

2. PARTICIPAÇÃO CELULAR NO TECIDO PANCREÁTICO :

2.1. CINÉTICA DO INFILTRADO CELULAR :

O tecido pancreático de animais normais não tratados, durante as análises histológicas, apresentou um pequeno número de células mononucleares e polimorfonucleares, na sua maioria inseridas no tecido conjuntivo periférico de revestimento do órgão.

Todos os animais apresentaram uma pequena concentração destas células em uma área específica, cuja população celular majoritária era de polimorfonucleares, mastócitos e algumas células mononucleares (linfócitos e macrófagos).

Com a evolução da carcinogênese, foi observado que o número de células destes grupos aumentou e à partir da 35ª semana, já se formava um pequeno foco com pequenas alterações na frequência das populações celulares presentes. Houve uma mudança para novas populações celulares, que se definiram como mononucleares em uma proporção variável entre os animais. Observou-se que 90% destas células era de populações mononucleares, quando ainda o tecido exócrino não apresentava alterações morfológicas evidentes (Figura 12).

Alguns animais chegaram a desenvolver verdadeiros nódulos nestas regiões periféricas, enfiados de células mononucleares

Nas semanas seguintes de tratamento, foi observada migração destas células mononucleares para o tecido pancreático. Foram observadas células nos espaços intra-lóbulos do tecido acinar, na periferia dos vasos sanguíneos e vasos capilares e algumas vezes circundando ductos aparentemente sem alterações histológicas.

Finalmente, estes infiltrados assumiram proporções maiores nas semanas seguintes. Observaram-se focos de células mononucleares em tecidos acinares, cuja estrutura morfológica

apresentava-se sem alterações, ou em específicas áreas onde estavam presentes pequenas degenerações dos ácinos.

Houve uma variação na intensidade dos infiltrados, sendo que alguns animais apresentaram pequenos focos celulares e, na mesma semana, outros animais já constituíam verdadeiros nódulos.

Os adenocarcinomas estudados (Eriguchi et al., 1987) apresentavam sempre grandes massas destes infiltrados, distribuídos por todo o tecido pancreático.

Em geral o número de animais que apresentaram infiltrados celulares no pâncreas exócrino foi proporcional ao aparecimento das alterações patológicas do estado pre-neoplásico. Entretanto o surgimento dos infiltrados foi uma das primeiras característica neste período (Tabela II).

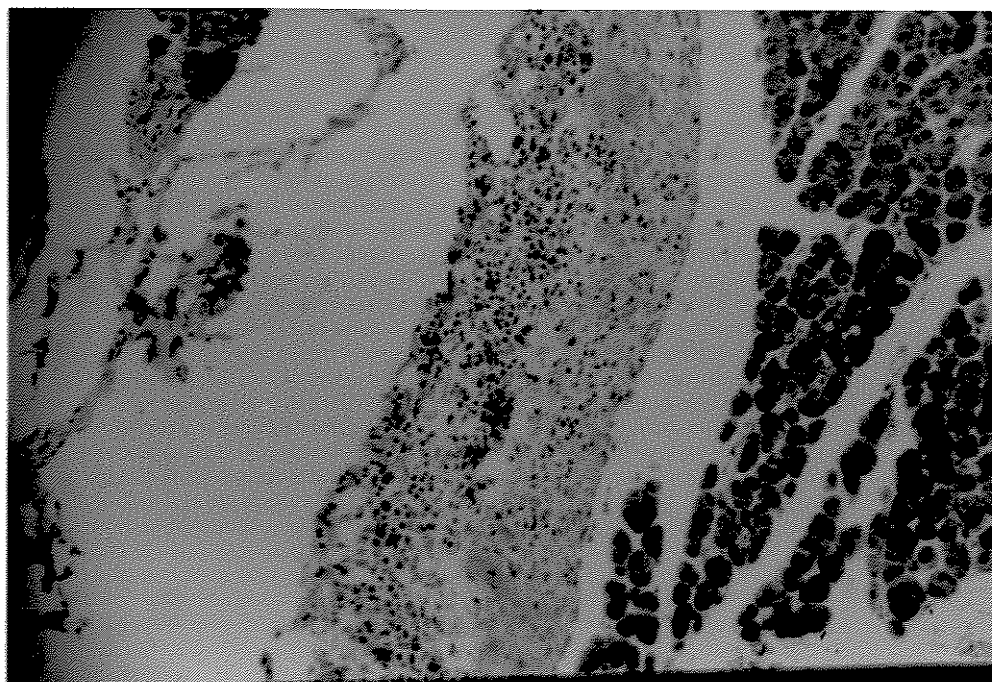


Figura 12: Tecido conjuntivo periférico do pâncreas de um animal tratado, após 35ª semana da primeira injeção, mostrando concentração de células mononucleares, diante de um pâncreas exócrino aparentemente preservado. Coloração: Tricrômico de Masson. (Aumento original : 63x).

2.2. PARTICIPAÇÃO DO MACRÓFAGO, MASTÓCITO E PLASMÓCITO:

Durante o aumento da migração de células mononucleares para o tecido pancreático foram observados macrófagos em diferentes regiões dos processos inflamatórios. Alguns macrófagos com grande extensão citoplasmática, muitas vezes indicavam uma aparente quimiotaxia entre os lóbulos acinar e algumas vezes formavam focos em uma região especial do tecido, ao lado de outras populações de células mononucleares participantes do processo de inflamação. Estas observações foram principalmente evidenciadas pela coloração com Tricrômico de Masson (Figura 13).

Foi observado a presença de Plasmócitos em diferentes áreas do processo inflamatório, em adensamento, ao lado de outras células mononucleares e principalmente ao lado de ductos em hiperplasia epitelial(Figura 13).

Durante o processo pré-tumoral foi observado uma marcante presença de células "B" entre os infiltrados mononucleares presentes nos tecidos pancreáticos, através das reações Imunohistoquímicas, utilizando-se soro-imune anti-IgG de hamster, marcados com peroxidase, conforme técnica em Material & Métodos. Estas células não se apresentaram em foco, mas entre os focos linfocitários em pontos diferentes dos tecidos, muitas vezes perto dos ductos com hiperplasia da camada epitelial. Ver mais adiante: **Figura 18** .

Os mastócitos aumentaram em número e na sua proporção de degranulação em relação à evolução dos processos inflamatórios dentro do período pré-tumoral. Foram melhor estudados por colorações pelo Azul de Orto-toluidina. Principalmente os adenocarcinomas estudados, apresentaram-se com numerosos mastócitos com uma intensa metacromasia e alto

índice de degranulação(Dados não mostrados).

Durante os estudos dos infiltrados celulares, estas células foram detectadas através de suas emissões espontâneas de fluorescência, quando o tecido foi submetido a uma reação de fluorescência (**Figura 14 , 15 e 16**).

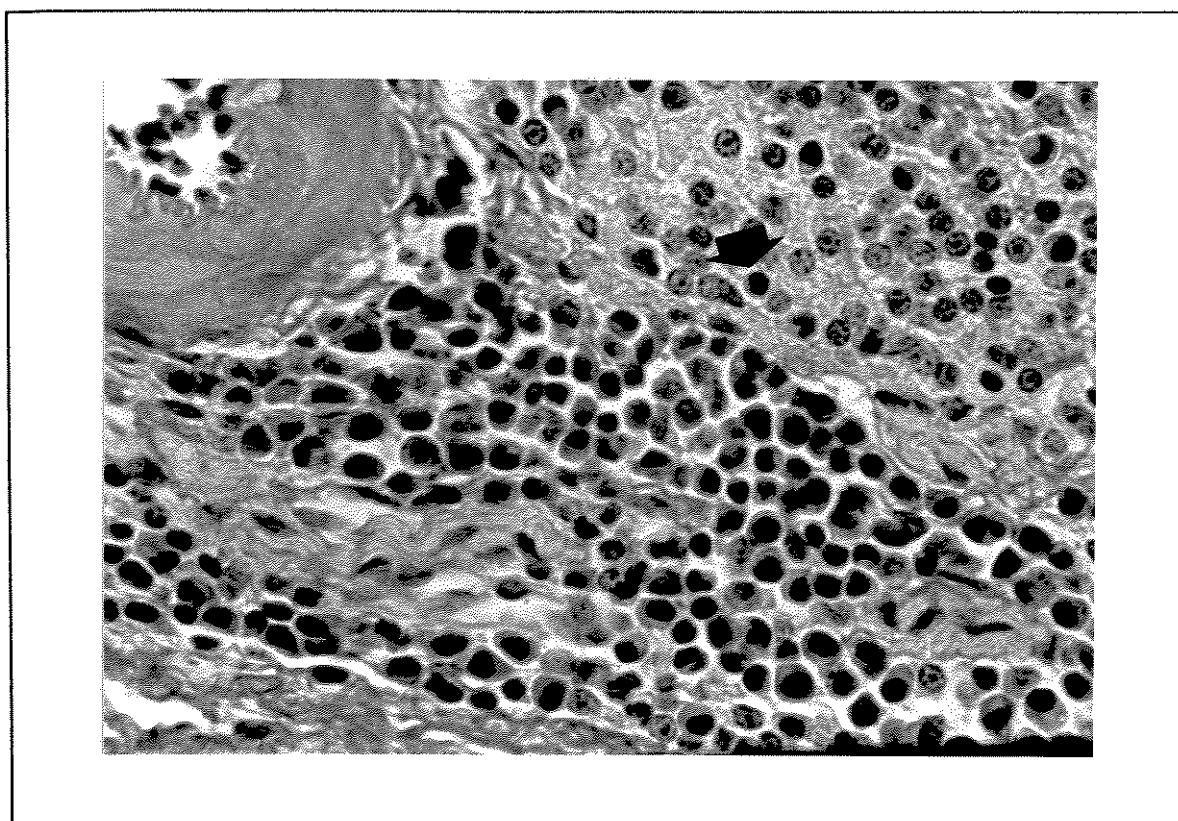


Figura 13: Tecido pancreático de um animal tratado (39a. semana), mostrando intenso infiltrado de células mononucleares, em sua grande maioria linfócitos, plasmócitos e vários macrófagos. Observar a porção do tecido da direita sendo invadido por pequenos linfócitos (Seta). Ainda dentro do novo nódulo restos de tecido acinar. Coloração: Tricrômico de Masson. (Aumento original: 400x).

2.3. PARTICIPAÇÃO DO LINFÓCITO "T" :

2.3.1. No tecido normal :

Conforme os ensaios de Imunofluorescência, utilizando soro-imune anti-linfócito "T" de hamster apresentado em Material & Métodos, foi observado que os linfócitos "T" raramente estão presentes em tecidos pancreáticos de animais normais. Estes linfócitos foram observados dispersos no tecido conjuntivo de contorno do órgão (cápsula), nos septos ou seja entre os lobos acinosos.

2.3.2. No tecido dos animais tratados:

Durante o período pré-tumoral foi verificado nos infiltrados celulares do tecido em transformação, uma crescente população de linfócitos "T" através das reações de Imunofluorescência conforme Material & Métodos.

O soro-imune usado nestas análises, dirigido contra linfócitos "T" de hamster mostrou uma reação positiva com células tímicas em cortes histológicos a fresco deste órgão e reações negativas em áreas linfocitárias específicas a células "T" em cortes histológicos, à fresco, em baço de hamster.

Não houve alteração da reação com timócitos, após a absorção deste soro com IgG pura de hamster. Em contraste, após a absorção deste soro com timócitos ficou totalmente anulada a imunoreatividade deste frente estas células.

Durante o período pré-tumoral o tecido pancreático ao longo de suas diferentes áreas e regiões, mostrou aumento do número de linfócitos "T", com características estruturais normais destas células. Estas células "T" foram observadas nos nódulos que se formaram no tecido conjuntivo periférico do órgão (Figura 14).

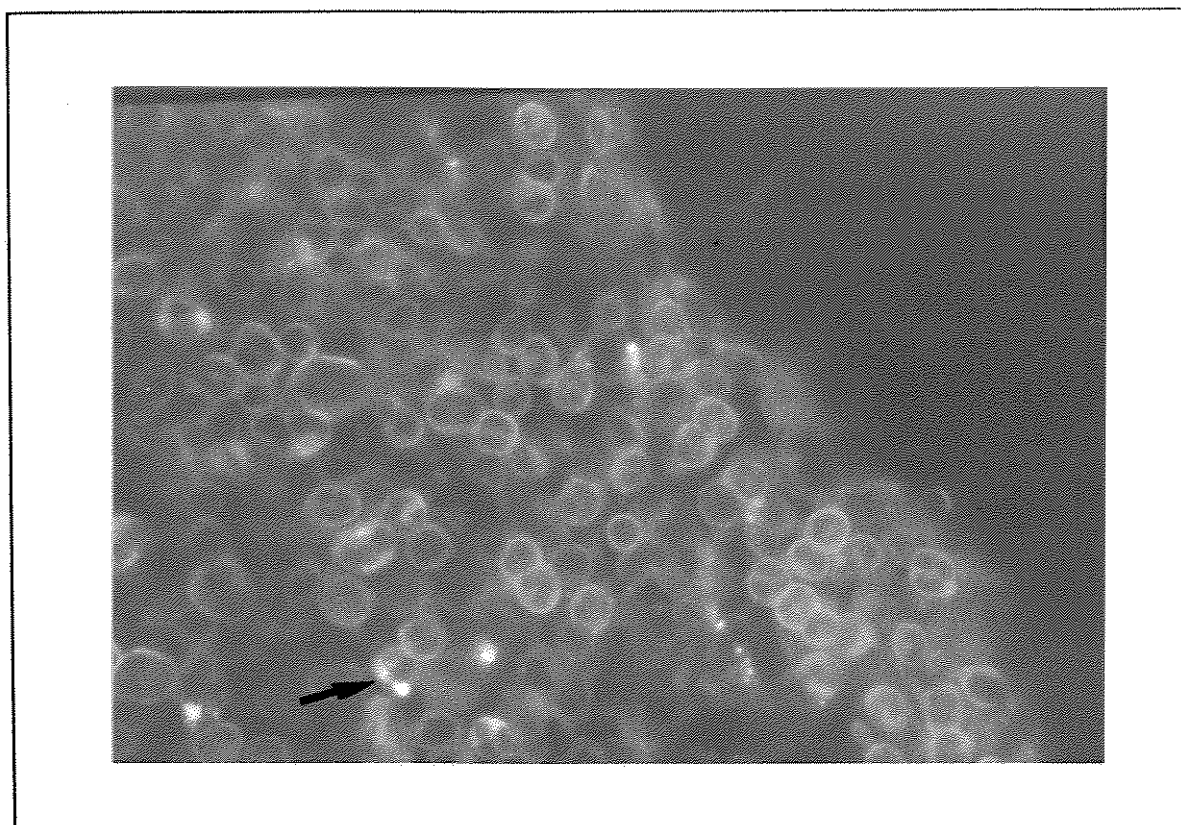


Figura 14: Aspecto histológico do pâncreas de um animal tratado (35a. semana após a primeira injeção), mostrando uma maioria de linfócitos "T" presentes no primeiro nódulo formado no tecido conjuntivo periférico. Estes linfócitos foram detectados com soro-imune anti-linfócito "T" marcados com fluorescência. Presença de mastócitos emitindo fluorescência espontânea (Seta). (Aumento original: 400 x).

Observou-se intensa drenagem de linfócitos "T" durante a evolução da carcinogênese, em paralelo à detecção de uma neovascularização do tecido pancreático. Estas observações também foram acompanhadas do aumento da destruição das células acinares e o aparecimento de estruturas tipo neoductal. Verificaram-se focos de células "T" em contacto direto com grupos de células acinares em uma área de ausência de alterações morfológicas do tecido(Figura 15).

Os estudos de imunofluorescência mostraram células "T" em torno dos ductos com hiperplasia epitelial, junto à membrana basal. Todas estas observações ocorriam concomitantemente dentro do período pré-tumoral(Figura 16).

Em análises de adenocarcinomas, verificadas em secções doadas por Dr. Eriguchi, observamos a presença de células "T" junto a membrana basal e circundando os ductos em hiperplasia do epitélio(Figura 17).

Células "T" em contacto direto com o epitélio ductal em hiperplasia ou penetrando dentro dos ductos em transformação nunca foram observados durante estas análises.

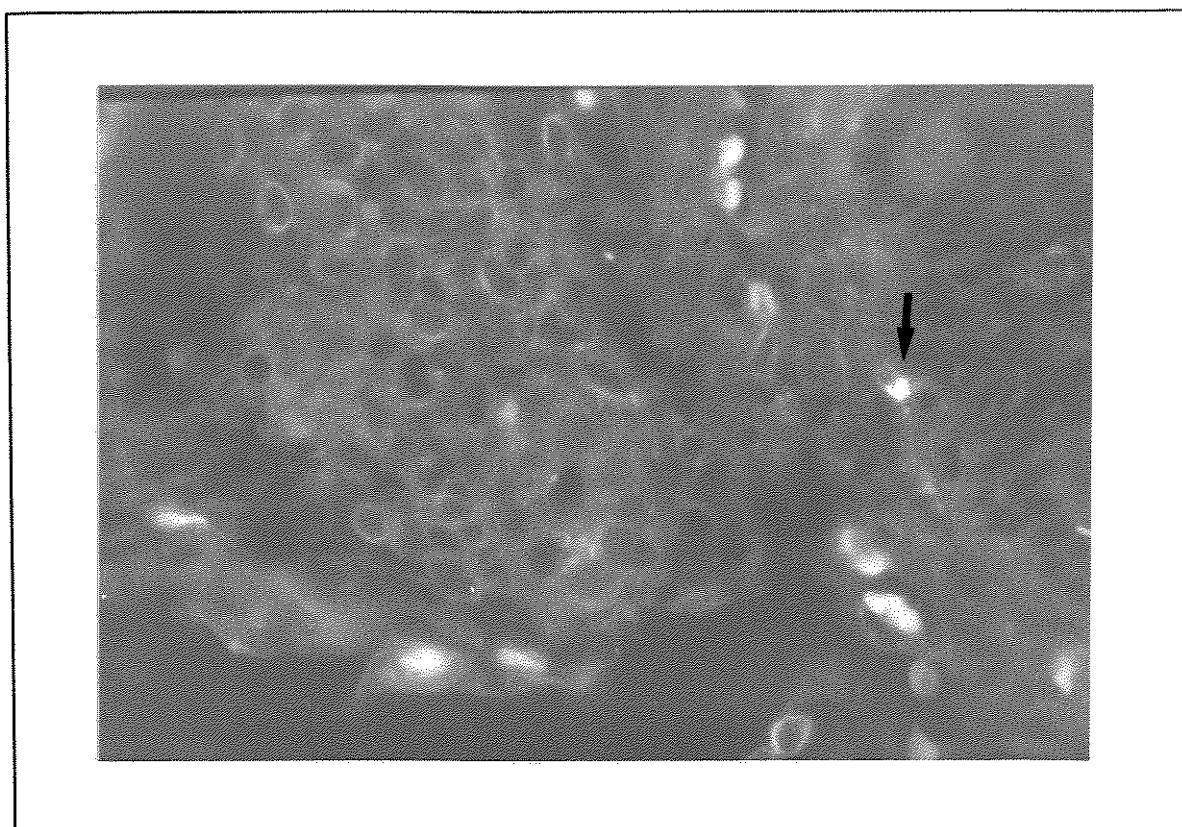


Figura 15: Tecido pancreático de um animal tratado (39 semanas após a primeira injeção), mostrando uma das primeiras colônias de linfócitos "T" detectados por Imunofluorescência usando soro-imune anti-linfócito "T". Observam-se estas células circundando um ácino aparentemente normal. Houve uma diminuição na intensidade da fluorescência, devido a desorganização da membrana plasmática destas células "T" durante o contacto com o tecido acinar. Presença de mastócitos com uma fluorescência espontânea (Seta). (Aumento original: 400 x)

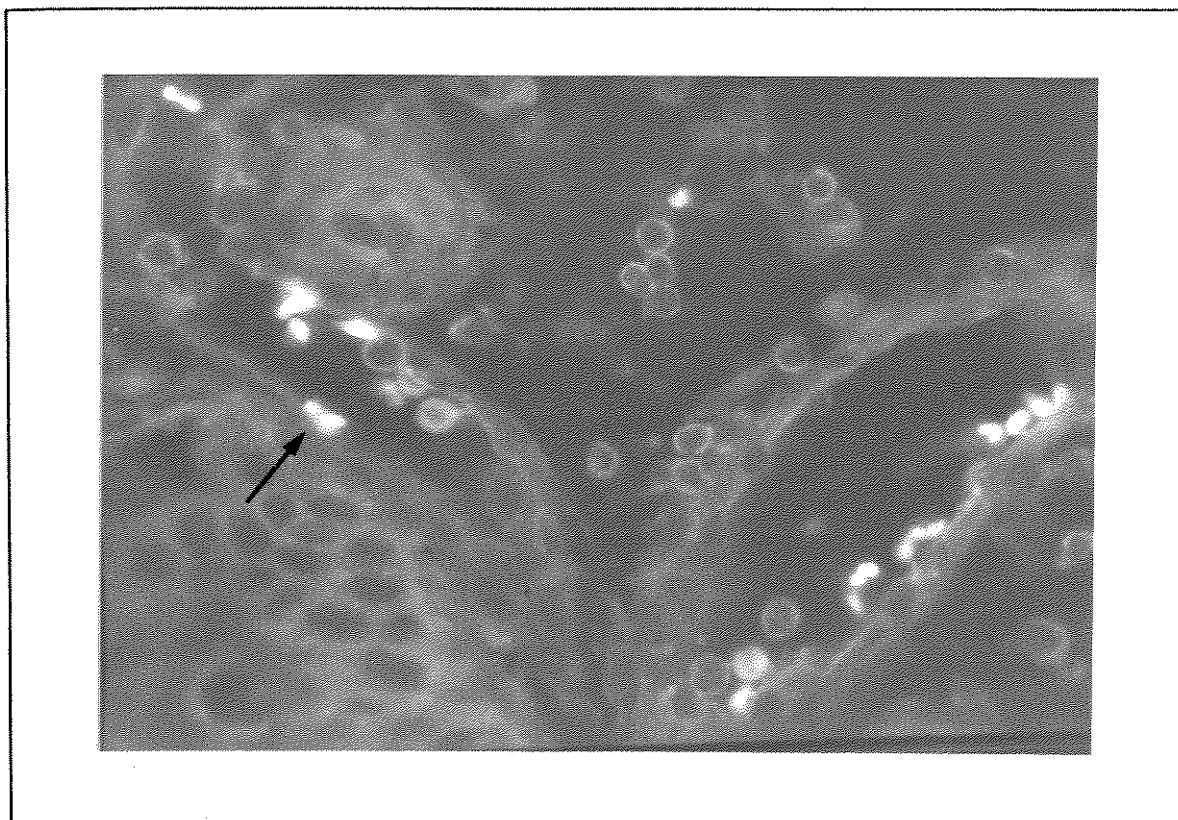


Figura 16: Aspecto do tecido pancreático de um animal tratado, mostrando áreas de grandes hiperplasias, com presença de linfócitos "T" , evidenciados por soro-imune anti-linfócito "T" de hamster marcado por fluoresceína. Estas células migraram em diferentes regiões ao lado de vários mastócitos emitindo uma fluorescência natural (Seta). (Aumento original: 400 x)

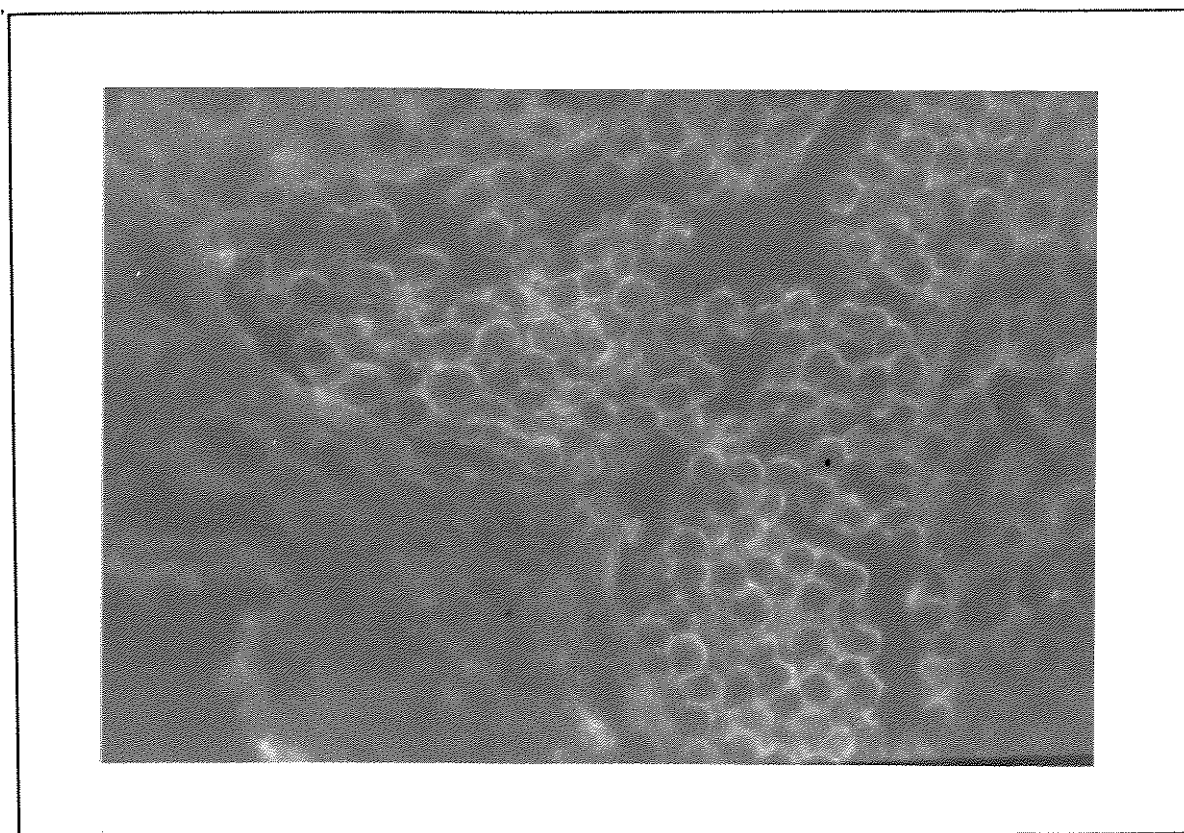


Figura 17: Adenocarcinoma pancreático desenvolvido experimentalmente por tratamento com BOP (Gentileza do Dr Eriguchi), mostrando intenso processo de infiltração de linfócitos "T". Reação de Imunofluorescência utilizando soro-imune anti- linfócito "T" de hamster. As áreas escuras correspondem aos septos e as menos escuras ao pâncreas acinar sem infiltração de célula "T". (Aumento original: 400 x).

3ª PARTE

**RESPOSTA IMUNOLÓGICA HUMORAL DURANTE A CARCINOGENESE:
DEMONSTRAÇÃO DA PRESENÇA DE AUTO-ANTICORPOS CIRCULANTES
EM ANIMAIS TRATADOS.**

1. ANÁLISE DAS IMUNOGLOBULINAS TOTAIS PRESENTES NO SORO DOS ANIMAIS:

1.1. ANIMAIS NORMAIS:

Através das análises semi-quantitativas, com a utilização dos testes imunoenzimáticos em papel de nitrocelulose (NIF), foram obtidos valores positivos para esta reação até a diluição 1/128. Utilizamos um "pool" de soro, pertencentes a cinco animais normais não tratados. Sendo, portanto, considerado como nosso padrão controle estes soros normais, o qual está indicado por marcação em negrito, que corresponde uma sequência de diluições logarítmica, separadas na **Tabela III**.

1.2. ANIMAIS TRATADOS:

Os testes semi-quantitativos imunoenzimáticos em nitrocelulose (NIF), conforme técnica apresentada em Materiais & Métodos, mostraram que a quantidade de imunoglobulinas totais presentes no soro de animais tratados apresentaram uma variação crescente no decorrer do período pré-tumoral, quando comparados com os animais normais(**Tabela III**).

Na primeira semana analisada (30a) observamos pequeno aumento do nível sérico de imunoglobulinas totais. Em geral, após a 39ª semana seguida ao tratamento, observou-se um aumento no título destas imunoglobulinas e um número maior de animais apresentando estes aumentos. Entretanto, o animal 7 apresentou um título relativamente baixo, quando comparados com os animais das últimas semanas de tratamento.

Os animais da última semana de tratamento (55a), apresentaram seus níveis totais de imunoglobulinas extremamente aumentados. Houve uma exceção (animal 25), que apresentou um título de imunoglobulinas relativamente normal.

**TABELA III : PRODUÇÃO DE IMUNOGLOBULINAS TOTAIS
NO SORO DE ANIMAIS TRATADOS.**

Semanas	Animais	Diluições logarítmicas	Títulos
30a	1	0 0 0 0 0 0 0 0	+
	2	0 0 0 0 0 0 0 0	++
	3	0 0 0 0 0 0 0 0	+++
	4	0 0 0 0 0 0 0 0	+++
	5	0 0 0 0 0 0 0 0	+++
35a	6	0 0 0 0 0 0 0 0	+++
	7	0 0 0 0 0	--
	8	0 0 0 0 0 0 0 0	+++
	9	0 0 0 0 0 0 0 0	+++
	10	0 0 0 0 0 0 0 0	++++
39a	11	0 0 0 0 0 0 0 0	+++
	12	0 0 0 0 0 0 0 0	++
	13	0 0 0 0 0 0 0 0	+++++
	14	0 0 0 0 0 0 0 0	++++
	15	0 0 0 0 0 0 0 0	+++
44a	16	0 0 0 0 0 0 0 0	+++
	17	0 0 0 0 0 0 0 0	++
	18	0 0 0 0 0 0 0 0	+++
	19	0 0 0 0 0 0 0 0	++
	20	0 0 0 0 0 0 0 0	+++++
55a	21	0 0 0 0 0 0 0 0	+++++
	22	0 0 0 0 0 0 0 0	+++++
	23	0 0 0 0 0 0 0 0	+++++
	24	0 0 0 0 0 0 0 0	+++++
	25	0 0 0 0 0 0 0 0	+

Legenda : O nível normal de imunoglobulinas no soro de animais normais está delimitado por uma marcação em negrito.
As cruzes indicam o número de diluições positivas acima deste limite.

2. CINÉTICA DA PRESENÇA DE IMUNOGLOBULINAS NOS TECIDOS PANCREÁTICOS DURANTE A CARCINOGENESE :

2.1. PÂNCREAS DE ANIMAL NORMAL:

Através das reações de imunoperoxidase Indireta, utilizando soro-imune dirigido contra imunoglobulinas de hamster, não foram observados estas imunoglobulinas no tecido acinar de animais normais. Observaram-se leves traços de imunoglobulinas na lâmina basal dos ductos, no interior e na periferia dos vasos sanguíneos e vasos capilares (Dados não apresentados).

2.2. PÂNCREAS DE ANIMAIS TRATADOS:

As reações de imunoperoxidase indireta com soro-imune anti-imunoglobulinas de hamster, foram aumentando em intensidade nos tecidos pancreáticos, em paralelo ao tempo de tratamento dos animais. Estas observações foram verificadas principalmente a nível da lâmina basal dos ductos. À partir da 44ª semana foi constatado uma forte concentração de imunoglobulina nas lâminas basais (**Figura 18**). Na 55ª semana a maioria dos animais apresentaram imunoglobulinas nas células epiteliais dos ductos, bem como no citoplasma das células acinares, e principalmente formaram uma grossa barreira na lâmina basal (**Figura 19**)

Nas reações, em tecidos pancreáticos com presença de adenocarcinomas, verificou-se uma enorme concentração de imunoglobulinas no tecido conjuntivo envolvendo a massa tumoral (**Figura 20**).

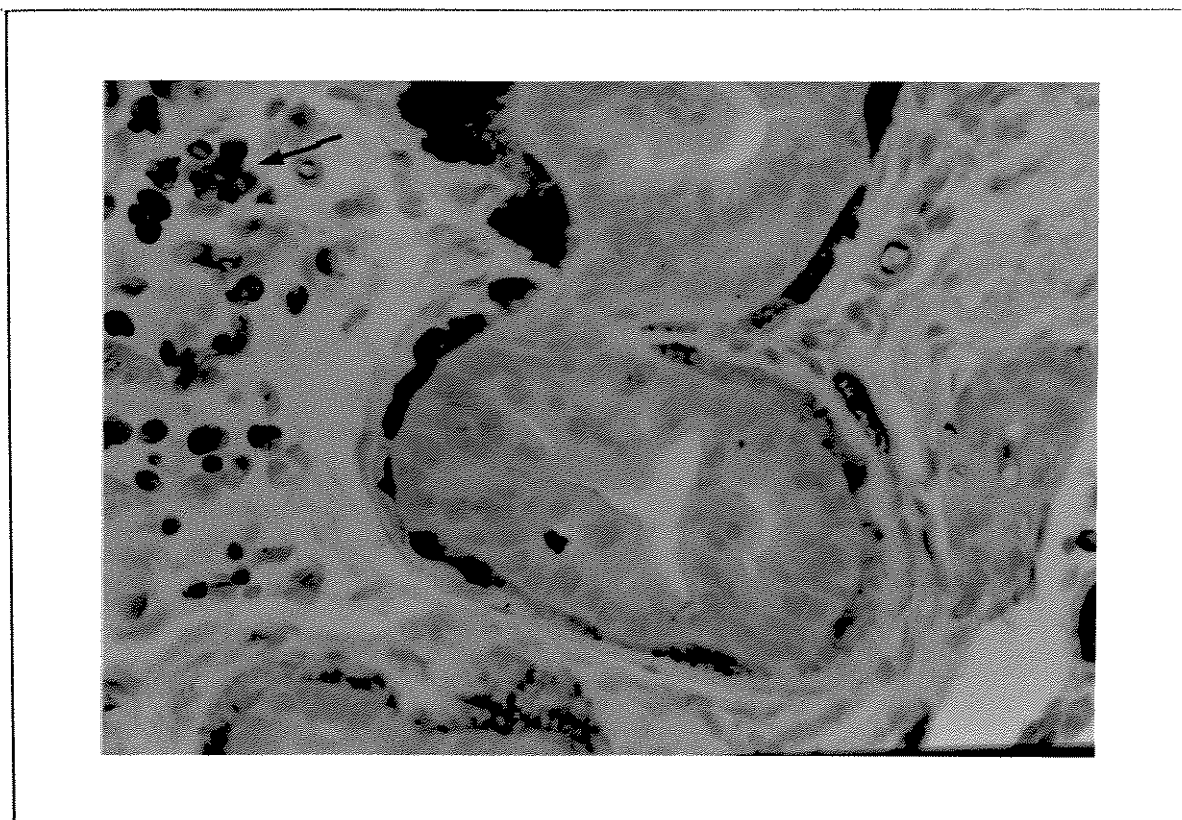


Figura 18: Tecido pancreático de animal tratado com BHP (44a semana), apresentando ductos em hiperplasia epitelial com a participação de um infiltrado celular em seus contornos. Através da reação de imunoperoxidase indireta a figura mostra a presença de imunoglobulinas na lâmina basal dos ductos, formando uma verdadeira barreira. Podem ser observados linfócitos "B" no infiltrado em presença de soro-imune anti- imunoglobulina de hamster (Seta) (Seta). Contra-coloração: Hemalun. (Aumento original : 200 x)

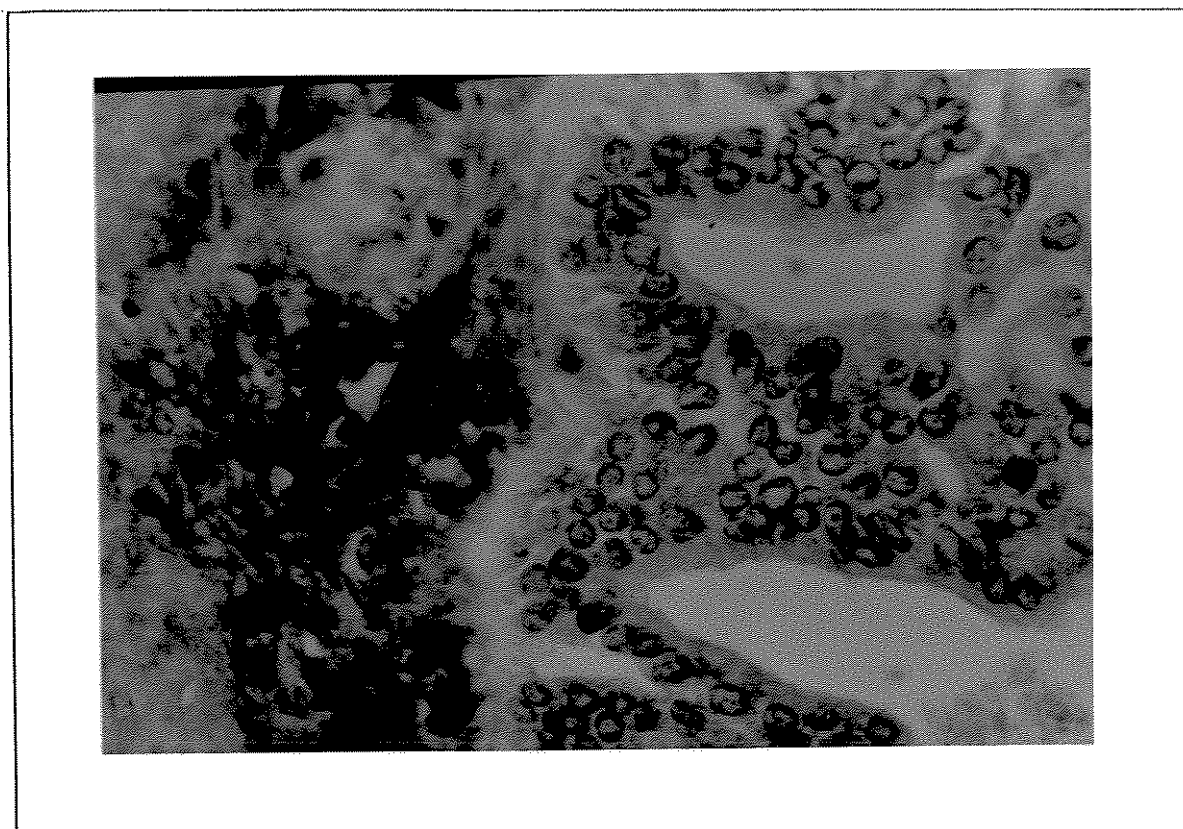


Figura 19: Aspecto histológico do pâncreas de animal tratado, mostrando uma fase mais avançada de hiperplasia ductal, com importante concentração de imunoglobulina na lâmina basal, presente durante os últimos estágios do período pré-tumoral. Reação de Imunoperoxidase Indireta com soro-imune anti-imunoglobulina de hamster. Contra-coloração: Hemalun. (Aumento original: 400 x).

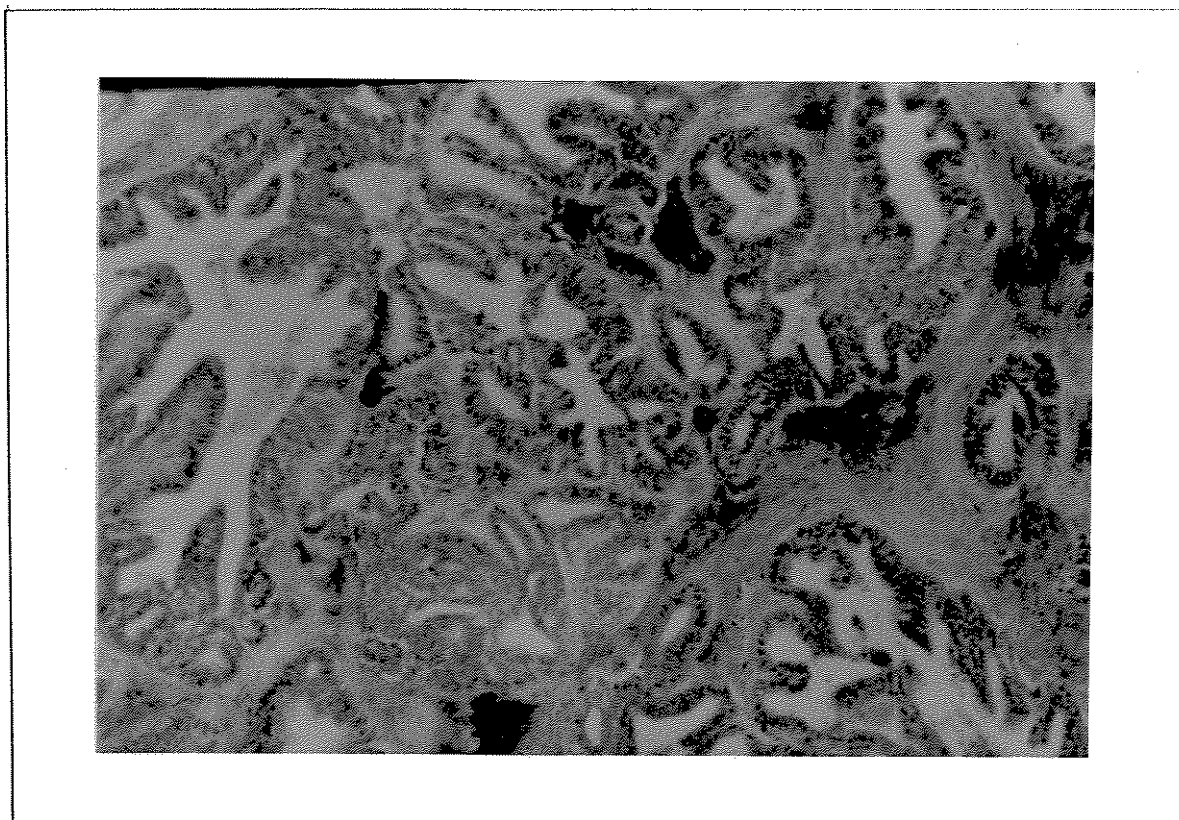


Figura 20 : Adenocarcinoma pancreático em animal tratado com BOP(Secção doada por Dr. Eriguchi), mostrando uma intensa concentração de imunoglobulina nas lâminas basais e por todo o pâncreas exócrino em áreas remarcadas previamente com a presença de colágeno. Reação de Imunoperoxidase Indireta com soro-imune anti-imunoglobulina de hamster. Contra-coloração: Hemalun. (Aumento original: 63 x)

3. ANÁLISE DA PRESENÇA DE AUTO-ANTICORPOS NO SORO DOS ANIMAIS:

3.1. PESQUISA DE AUTO-ANTICORPOS NO SORO DE ANIMAIS NORMAIS DIRIGIDOS CONTRA PÂNCREAS DE ANIMAIS NORMAIS E TRATADOS.

Para efeito de controle das reações imunoenzimáticas dirigidas contra imunoglobulinas de hamster, foi verificado que o soro de animais normais praticamente não reconhece estruturas na porção acinar de animais normais (Tabela IV - soro do dia [0]). Entretanto, os ductos apresentaram previamente imunoglobulinas "in situ".

Também para efeito de controle das reações foi verificado que praticamente o soro de animal normal não reconhece estruturas do pâncreas de animais tratados (Tabela V - item [2]). Quando comparados estes dados com a imunoglobulina "in situ"(item [1]), verificamos que há um pequeno aumento no reconhecimento das células acinares e do epitélio ductal.

3.2. PESQUISA DE AUTO-ANTICORPOS NO SORO DE ANIMAIS TRATADOS DIRIGIDOS CONTRA ESTRUTURAS PANCREÁTICAS:

3.2.1. Dirigidos contra tecidos pancreáticos normais:

Não houve reação dos soros de animais tratados nos diferentes períodos , quando incubados com pâncreas de hamsters normais, através da utilização da reação de Imuno-peroxidase Indireta , utilizando-se soro-imune anti-imunoglobulina de hamster (Tabela IV).

TABELA IV - Marcagem histológica das estruturas pancreáticas de animal normal com soro de animais tratados.

Soro	Acinar	Ducto (L.Basal)	Cels. Epiteliais
0	(-)	+/-	(-)
30	(-)	+/-	(-)
35	(-)	+/-	(-)
39	(-)	+/-	(-)
44	(-)	+/-	(-)
55	(-)	+/-	(-)

LEGENDA : O pâncreas de animal normal foi incubado com "pool" de soros de cinco animais tratados com BHP nas diferentes semanas. Soro do dia [0] indica soro de animal normal não tratado. O pâncreas de animal normal foi incubado com um "pool" de soro de cinco animais normais.

3.2.2. Dirigidos contra suas próprias estruturas pancreáticas:

Os tecidos pancreáticos de animais quando incubados com seus próprios soros, mostraram um aumento na reação pela imunoperoxidase Indireta, com a utilização de soro-imune dirigido contra IgG de hamster. Esta reação apresentou gradativamente aumento nas células acinares, na membrana basal e no tecido conjuntivo que envolve esta membrana, com a evolução do período pre-tumoral(**Tabela V** - item [3]).

Quando os tecidos normais (pertencentes ao dia 0) foram incubados com seu próprio soro e posteriormente incubado com soro-imune anti-IgG de hamster não foram observados reações positivas para imunoperoxidase indireta. Entretanto, foi verificado a presença traços de imunoglobulinas na periferia dos vasos sanguíneos e na periferia dos grandes ductos (**Figura 21**). Este fato foi detectado mesmo antes, quando tratamos o tecido somente com soro-imune anti-IgG de hamster.

As células acinares apresentaram reações positivas em áreas específicas, durante a evolução do período pré-tumoral, quando previamente eram incubadas com seus próprios soros e após com soro imune anti-IgG de hamster. Principalmente, esta reação mostrou ser positiva nos adenomas ou em grupos acinares, os quais observou-se sem uma aparente transformação (**Figura 22**).

TABELA V - Marcagem Histológica dos Tecidos Pancreáticos de Animais Tratados frente a Diferentes Soros.

Soros	Tecido Pancreático	Acinar	Ducto L. Basal	Células Epiteliais
Anti-IgG^[1]	0	(-)	+/-	(-)
	30	(-)	+	(-)
	35	(-)	+	(-)
	39	(-)	+	(-)
	44	(-)	+++	(-)
	55	+++	++++	+++
Soro Normal^[2]	0	(-)	+/-	(-)
	30	+/-	+	(-)
	35	+/-	+	(-)
	39	+/-	+	(-)
	44	+	+++	(-)
	55	++++	++++	++++
Próprio Soro^[3]	0	(-)	+/-	(-)
	30	+	++	(-)
	35	+	++	(-)
	39	++	+++	+
	44	+++	++++	++
	55	++++	++++	++++

LEGENDA :

[1] Os tecidos pancreáticos foram incubados com soro-imune anti-IgG de hamster.

[2] Os tecidos pancreáticos foram incubados inicialmente com "pool" de soro de animal normal, após foram incubados com soro-imune anti-IgG de hamster.

[3] Os tecidos pancreáticos foram incubados inicialmente com o próprio soro, após foram incubados com soro-imune anti-IgG de hamster.

Tecido pancreático do dia (0) corresponde ao animal normal não tratado.

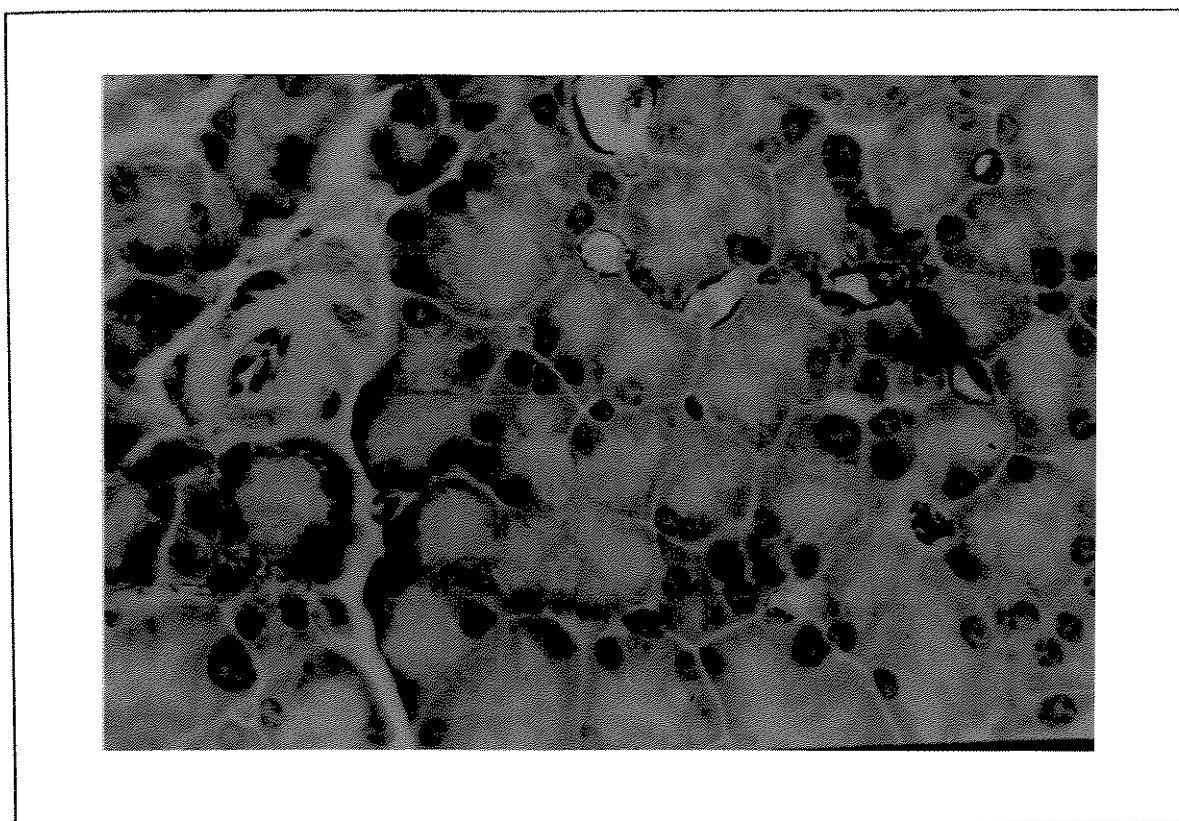


Figura 21: Pâncreas de aspecto histológico normal de animal normal, em presença de seu próprio soro e após tratado com soro-imune anti-imunoglobulina de hamster. Através da reação de Imunoperoxidase Indireta podemos verificar imunoglobulina presente sómente na região dos vasos sanguíneos e vasos capilares. Contra-coloração: Hemalun. (Aumento original: 400 x)

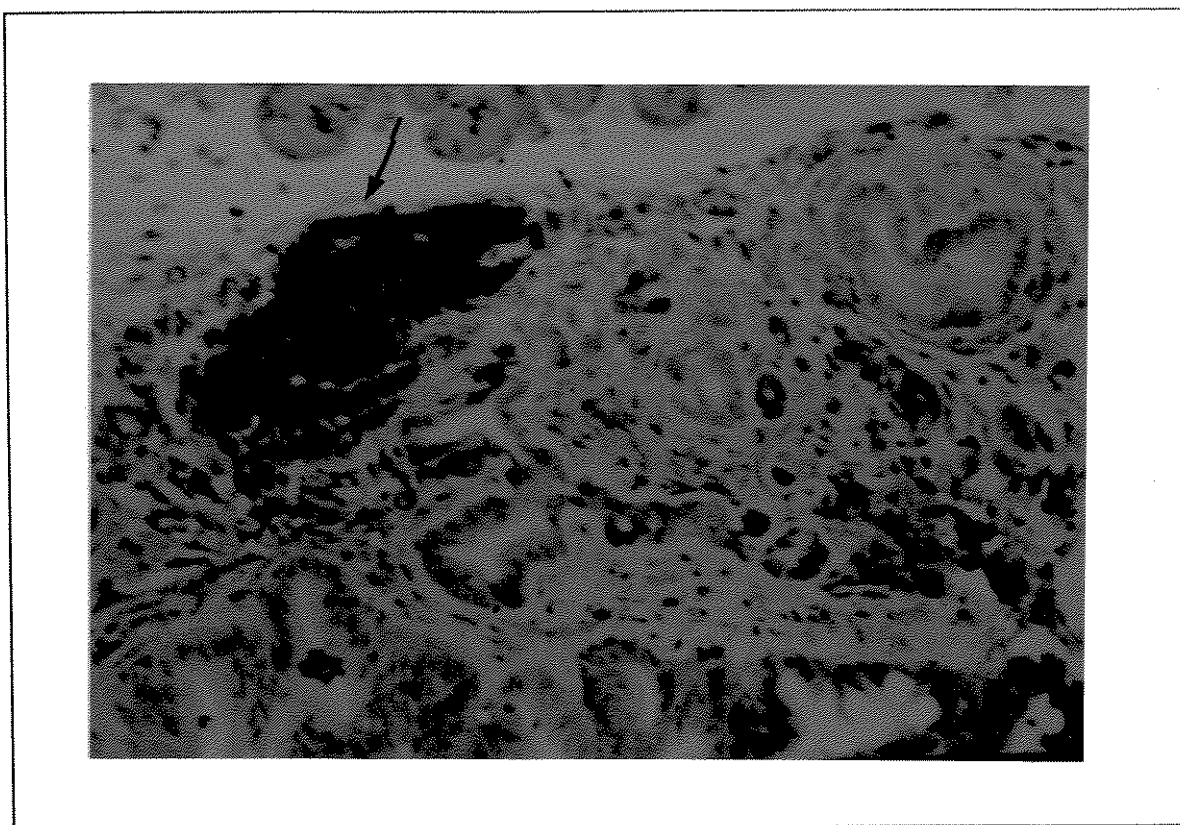


Figura 22: Aspecto histopatológico do tecido pancreático, de um animal tratado (44a semana) mostrando desorganizações estruturais na porção exócrina, sendo visto um grupo de ácinos ainda preservado mas com a presença de uma forte reação, quando incubado com o próprio soro(Seta). Reação de Imunoperoxidase Indireta, utilizando soro-imune anti-imunoglobulina de hamster. Contra-coloração: Hemalun. (Aumento original: 200x)

Através de técnicas histológicas e imunohistológicas, utilizando-se diferentes colorações e diferentes processos de análises, nos propusemos estudar os primeiros sinais de alterações presentes no tecido pancreático, em paralelo à participação do Sistema Imunológico, que poderiam estar associados ao início de um processo tumoral em um animal tratado com uma droga carcinogênica do grupo das nitrosaminas.

Dados obtidos por pesquisadores em sistemas experimentais de indução da carcinogênese, utilizando moléculas da família das nitrosaminas ou derivados destas, usando na sua grande maioria, altas doses, e diferentes esquemas de inoculação (Pour et al. , 1979; Longnecker, 1986; Rao, 1987). Neste trabalho, procuramos fazer uso de uma variação na metodologia do inóculo, com a utilização de baixas doses e um número reduzido de inoculações. O nosso objetivo principal foi, através desta metodologia, acompanhar os primeiros indícios de alterações do tecido pancreático , os quais poderiam se expressar lentamente, em paralelo às análises de uma possível participação efetiva do Sistema Imunológico .

Os nossos estudos mostraram que os animais não apresentaram sintomas clínicos equivalentes aos geralmente apresentados em outras metodologias de inoculações, com utilização de altas doses. Não houve perda de massa corpórea , sendo um dado diferente quando comparamos a outros trabalhos onde há uma evolução clínica de sintomas que levam os animais à neoplasias(Tabela I). Entretanto, houve uma diminuição da musculatura abdominal em todos os animais tratados, observados macroscopicamente pelo contacto direto desta região. Talvez, este sintoma esteja relacionado com a primeira manifestação clínica de um comprometimento futuro desta região abdominal, considerando que o animal possa ter passado por um estado doloroso localizado nesta área, apesar destes animais manterem em geral um comportamento normal em relação aos animais não tratados.

As nitrosaminas quando inoculadas em hamster atuam sobre o tecido pancreático de uma forma progressiva, sendo que as lesões inicialmente consideradas benignas evoluem dando

lugar a características pré-neoplásicas tais como: Hiperplasias ductais e cistadenomas. No nosso trabalho(Tabela II) a seqüência da evolução durante o processo da carcinogênese foi compatível com os resultados obtidos por outros autores (Longnecker et al., 1986; Moore et al., 1983; Rao, 1987).

A presença de complexos císticos no tecido pancreático foi também motivo de grande discussão e controvérsia em diversos trabalhos, quanto a possível origem celular dos adenocarcinomas pancreáticos. Alguns autores sugeriram que estes complexos são derivados da proliferação de células de um canal já preexistente (Carré-Llopis et al., 1986b; Longnecker et al., 1980 ,1986). Outros, porém, defenderam a idéia de que o processo neoplásico tem sua origem nas alterações das células acinares. (Flaks et al., 1981; Flaks et al., 1982; Eriguchi et al., 1987).

No hamster, as neoplasias pancreáticas de origem canalicular foram estudadas e indicadas por inúmeros autores, os quais consideraram que, através da indução da carcinogênese, os canais intra-lobulares e principalmente as células centroacinosas poderiam originar adenocarcinomas (Longnecker et al., 1986; Moore et al., 1983).

Os trabalhos de Flaks et al. em 1981 e 1982, propõem um modelo da carcinogênese em hamster, no qual as células acinares se diferenciariam, dando origem a estruturas pseudo-canaliculares, que posteriormente se modificariam até dar origem aos adenomas.

Entretanto, discute-se a possibilidade, diante dos modelos propostos, que haveria uma origem dupla a qual poderia ocorrer, ao mesmo tempo, no tecido pancreático. Determinaram, através de dados experimentais, que o processo de neoplasia poderia ser tanto de origem canalicular quanto acinar (Scarpelli et al., 1978; Rao, 1987).

Diante de tais relatos, podemos admitir que a histogênese das neoplasias por agentes nitrosamínicos, tal qual o modelo no homem, é ainda um processo de inúmeras controvérsias e discussões, o qual tem sido observado também por nosso grupo de trabalho (Carré-Llopis et al., 1987).

Nos experimentos de indução da carcinogênese em hamster, nos deparamos com uma alteração inicial em células acinares e, posteriormente, uma proliferação das células canaliculares. Parece que o indutor da carcinogênese, segundo o nosso modelo, pode ser capaz de agir sobre os dois tipos de células: A célula acinosa e a canalicular. Entretanto, nenhum destes resultados apresentados pode confirmar que estas células proliferam a partir de uma célula acinosa, ou centroacinosa ou mesmo afirmar que há formação de pseudo-canais com origem acinosa.

As primeiras alterações apresentadas nas células acinares, foram detectadas de certa forma muito cedo (30ª semana após o primeiro inoculo), sendo este fato um dado importante e que veio a favor das nossas expectativas na proposta de investigação, considerando este um especial modelo de estudo da carcinogênese, utilizando um esquema de baixas doses.

O estado acidófilo característico, apresentado no núcleo e citoplasma de células acinares, com presença de granulações metacromáticas, sugere um aumento da atividade metabólica destas células, mostrando em alguns animais um aumento na formação de grânulos de zimogênio. Na realidade, entre os lóbulos de ácinos, a presença de metacromasia em uma região de aspecto viscoso indicou que estas células apresentavam altos índices de secreção, mostrando plena atividade metabólica. Além de vacúolos citoplasmáticos havia vários nucléolos, algumas células chegando a apresentar até quatro nucléolos, mostrando, assim, uma importante atividade nuclear (Fig.4).

Os processos de acidofilia em câncer do pâncreas tem sido analisados por alguns pesquisadores (Scherer et al., 1989), enfocando que, durante a carcinogênese experimental, a análise histopatológica sugere que a acidofilia representa um prognóstico importante de possível indutor do processo tumoral.

A presença de focos acidófilos no pâncreas exócrino, em paralelo com a presença de basofilia em outras áreas deste tecido, tem sido observado por autores. Estes, na realidade, sugerem que os focos primários basofílicos, que estão presentes em determinadas populações

celulares, não estão relacionados com a carcinogênese pancreática. Isto indica que a origem do tumor deve estar relacionada à área que apresentou uma alteração de acidofilia, o que pode equivaler a um aumento no potencial de uma ATPase positiva, presente nestas células acinares (Bax et al., 1990). Analisando-se a nível de núcleo, estas características iniciais de acidofilia ou metacromasia apresentadas por alguns animais tratados, podem estar associadas a alterações do DNA, através de mecanismos ligados à alquilação, mostrados durante os estudos feitos por este autor.

Imediatamente após estes fenômenos, enquanto os ductos e a porção endócrina não evidenciavam alterações estruturais, podíamos constatar, neste trabalho de tese, o surgimento de focos de células acinares, apresentando sofrimento celular, com diferentes processos de alterações. Detectamos modificações na morfologia do citoplasma e também a descentralização do núcleo. Estes fatos relatados, vieram confirmar que existem alterações celulares, que são consideradas como precoces, e que portanto foram detectadas muito cedo dentro do período pré-neoplásico no tecido pancreático. A partir destas alterações, foram observadas várias modificações dos tecidos, as quais presume-se que foram conseqüentes destas alterações e que serão discutidas em ordem cronológica das suas presenças no tecido. Estas alterações se desenvolveram de forma crescente e paralela as diferentes modificações, indicando que o processo neoplásico evoluiu com a somatória de todas estas alterações iniciais. A indução da carcinogênese associada a processos com estágios múltiplos, estudada nos últimos anos, tem sido considerada um assunto de grande polêmica (Fearon et al., 1990).

Através das colorações apresentadas pelo Tricrômico de Masson, percebeu-se que bem no início da carcinogênese havia uma leve alteração do tecido conjuntivo, quando comparado com os animais normais. Os lobos começaram a se distanciar, e mais tarde os lóbulos e por finalizar até entre os ácinos podia-se observar o tecido conjuntivo, cujas camadas foram se tornando cada vez mais espessas (Figs.5 e 6). Estas características de transformação do tecido poderiam ser utilizadas talvez, como um possível auxílio na indicação do prognóstico da carcinogênese pancreática, devido ao fato de que elas foram marcadamente evidentes durante o

período pré-neoplásico estudado nesta tese.

A cinética de participação do tecido conjuntivo, na realidade está relacionada ao aumento crescente do colágeno e da possível participação dos fibroblastos, os quais mostraram aumento em número e em espessamento do seu citoplasma em diferentes regiões, implicadas no processo de transformação.

Além do aumento considerável do colágeno, houve um processo contínuo de desorganização estrutural deste, o qual denominamos de fibrose.

A degradação do colágeno IV tem sido estudada como um fator importante na invasão celular do tumor e no processo de metástase (Nakajima et al., 1987). Algumas proteinases favorecem a quebra ou são capazes de quebrar especificamente o colágeno, as quais têm sido analisadas por diferentes autores nos estudos das neoplasias (Woolley et al., 1984; Tarin et al., 1982). Estes mecanismos citados acima podem estar associados a modificação do colágeno observada durante os nossos estudos, a qual foi crescente à partir de um certo período da indução carcinogênica, conforme evidenciado em nossos resultados. Podemos sugerir que possivelmente, em paralelo aos outros mecanismos, o próprio organismo utilize este, como um recurso de desativar a invasão e o processo de metástase destas células em transformação.

Nas análises histopatológicas da carcinogênese pancreática em hamster, os laudos patológicos apresentaram algumas observações, as quais foram consideradas importantes características de alterações de tecido e portanto, merecedoras de uma maior investigação durante este trabalho. O aparecimento de um tecido, com características de tecido adiposo pelas análises patológicas, foi sempre uma indicação de mau prognóstico nas neoplasias pancreáticas (Dr. Lorigon-Rosa, B.- Comunicação pessoal). Estas estruturas foram cuidadosamente investigadas neste trabalho e verificamos existir outro tipo de possibilidade na formação estrutural deste tecido. Na realidade, o sofrimento celular apresentado em focos finaliza-se com a lesão do grupo acinar, o qual desaparece do tecido deixando somente o tecido conjuntivo que estava situado sob estes grupos acinares. Diante disto, há um espaçamento entre os fibroblastos, os quais permanecem interligados, formando vários círculos

vazios(Fig.8). Por diversas vezes foram detectados fibroblastos íntegros, com estrutura definida de seus citoplasmas e núcleos, além de observarmos restos de células acinares entre os espaços do tecido exócrino. Os desaparecimentos gradativos dos grupos acinares terminam por apresentar uma área com características de processo de invasão de um tecido adiposo.

Em nossos resultados, a hiperplasia dos ductos iniciou-se de forma paralela a todas estas alterações das estruturas do tecido pancreático. Verificamos que surgiram lesões de ácinos, frente à evolução do tecido conjuntivo e diante do aparecimento do tecido tipo adiposo. Estas observações ocorreram em paralelo à invasão de um infiltrado celular mononuclear, definido por diferentes populações do sistema imunológico. Verificamos que a primeira linhagem celular mais importante quanto à sua participação efetiva, dentro deste modelo, foi o linfócito "T".

A infiltração de linfócito "T" se iniciou muito cedo, quando todo o pâncreas ainda se apresentava macro e microscopicamente normal.

Bem no início da carcinogênese, a população de células mononucleares do tecido conjuntivo externo ao órgão, foi sendo modificada, para se definir com o tempo, com a presença de uma maioria de linfócito "T", em praticamente todo o nódulo neo-formado (Figs.12 e 14). Os linfócitos penetraram no tecido pancreático pelo estroma, inter ou intra-lóbulares, através dos capilares neo-formados, ou drenaram do nódulo externo, com migração proporcional ao tamanho do nódulo. Rapidamente, estas células se localizaram em torno de grupos acinares, em diferentes pontos do tecido exócrino, muitas vezes sem ser constatada a presença de qualquer aspecto de transformação neoplásica sofrido por estes grupos acinares. Devemos ressaltar que estes fenômenos se apresentaram em número limitado dentro de uma grande área do tecido exócrino(Fig 15). Durante este estágio, as células "T" pareciam estar em contacto íntimo com estas células acinares e alguns grupos terminaram por serem destruídos.

Foi também possível verificar, que a nível das estruturas ductais, ou seja, entre os pequenos ductos sem aspectos histológicos de transformação neoplásica, também estas células "T" apareceram repentinamente nestas áreas. Estes ductos entraram em processo de hiperplasia e aumentaram cada vez mais este infiltrado, formando verdadeiros adensamentos celulares nesta região (Fig. 13).

Estes fatos sugerem que o período pré-tumoral seja precedido por uma vigilância imunológica, a qual ocorre logo após uma transformação da célula acinar, onde as células "T" chegam a apresentar provavelmente uma participação efetiva, ou seja: citotoxicidade sobre as células acinares.

Provavelmente, as células "T" são hábeis o bastante para destruir as células acinares em transformação, como também são capazes de destruir pequenos ductos em transformação pre-neoplásica. É possível que alguns ductos ou grupos de ácinos se recuperam, superando seu processo de proliferação. Assim, o tecido epitelial dos ductos ou o tecido acinar acabam por assumir um processo de transformação, apesar de estarem sempre em presença destes infiltrados e, possivelmente, sobre a ação de uma função efetora destas células.

Conforme mencionado anteriormente, as células acinares podem também proliferar dando origem a pseudo-canais ductais. Estas células, podem ser detectadas dentro destes canais, muitas vezes porque conservam estruturas histológicas características da célula acinar, tais como grânulos de zimogênio no interior de seus citoplasmas. Estas observações foram também verificadas em alguns canais em hiperplasia, durante este trabalho (Dados não mostrados).

Nos estudos específicos sobre a possível origem acinar dos tumores pancreáticos, também têm sido discutidas estas mesmas observações apresentadas acima, as quais são sujeitas a análise e interpretação em outros modelos da carcinogênese em hamster (Bockman, 1981). Entretanto, até o momento é considerado um assunto inteiramente polêmico, necessitando portanto de maiores esclarecimentos.

Segundo as análises no nosso modelo de carcinogênese, o qual foi obtido com um específico tratamento carcinogênico nos animais, não remarcamos dados suficientes para especificar qual a origem celular destas transformações neoplásicas. Podemos sugerir, segundo os resultados observados, que tanto a célula secretora acinar quanto a célula ductal podem estar induzindo este processo neoplásico. Entretanto, evidenciou-se a presença de uma vigilância imunológica prévia, atuando frente estas duas diferentes populações celulares, ou seja; a célula acinar e a célula do epitélio ductal.

A cinética da expressão de antígenos oncofetais, em paralelo à presença de infiltrados de linfócitos "T", que se manifestam durante as alterações neoplásicas em modelos de tumores do pâncreas exócrino, sugere que a resposta imune celular pode ser, pelo menos em parte, mediada pela neo-expressão destes antígenos, quando os animais são submetidos ao mesmo agente carcinogênico usado neste trabalho. Esta neo-expressão de antígenos tipo oncofetais se manifesta muito cedo e em um discreto número de células acinares, as quais se apresentam em foco e mostram características microscópicas aparentemente normais. Esta cinética da expressão destes antígenos foi observada em trabalhos desenvolvidos por nosso grupo (Eriguchi et al., 1987) e por outros grupos de estudo (Röthlin et al., 1992). Possivelmente a progressão da infiltração destes linfócitos está cronologicamente relacionada com a expressão destes antígenos.

Em contraste com a importante participação de linfócitos no tecido pancreático em transformação, observada em animais tratados, não foi evidente a atuação dos linfócitos pertencentes à cavidade peritoneal, como também os linfócitos da circulação periférica. As populações celulares destas duas diferentes regiões dos animais tratados, mostraram pequenas variações quanto ao número, sem valor significativo durante as análises do período pre-tumoral (Figs.10 e 11).

Os linfócitos "B" estavam presentes no tecido pancreático em transformação, os quais apresentaram-se em pequenos focos, distribuídos nas áreas de inflamação ou contornando

os ductos em hiperplasia epitelial(Fig.18). A sua presença representa uma importante participação no sistema de defesa destes tecidos. Possivelmente, esta participação está relacionada ao processo de resposta imune evidenciada pela produção de anticorpos específicos aos antígenos tumorais presentes nos microambientes.

Também a população de macrófago/monócito mostrou pequenas variações quanto ao seu número na cavidade peritoneal dos animais tratados. Estas variações não corresponderam à cinética de transformação presente no tecido pancreático, ou seja, a sua variação não foi uma importante observação neste trabalho. Enquanto nos tecidos houve um aumento de sua participação, evidenciada através de uma crescente presença e de imagens de possíveis migração destas células para as áreas específicas, em processo de inflamação(Dados não mostrados). Na região peritoneal, as variações quanto a sua presença não tiveram valores significativos.

Dados da literatura têm demonstrado que a participação dos macrófagos nas neoplasias está relacionada também aos processos de supressão imunológica, que são considerados por alguns autores como um dos mecanismos responsável pela anergia do sistema, frente ao crescimento tumoral(Ting et al., 1980).

Neste estudo, verificamos, portanto, a participação efetiva dos macrófagos, mostrando muitas vezes sua presença em áreas dos nódulos em formação, durante a evolução do período pré-tumoral desta carcinogênese.

Nas análises citológicas deste trabalho foi verificado que os mastócitos apresentaram pequenas variações quanto ao número, na cavidade abdominal de animais tratados, as quais não corresponderam a importante cinética da sua participação no tecido pancreático pre-neoplásico. Verificamos que nos tecidos estudados nas diferentes semanas de tratamento, houve aumento considerável destas células, concomitante aos processos de hiperplasia ductal. Estas células foram constantemente observadas em torno dos ductos em transformação, mas nunca formando focos, ou seja, apresentaram-se dispersas. Quanto maior a área

comprometida pela inflamação, maior a concentração dos mastócitos, como também maior o processo de degranulação observado nestas células(Dados não mostrados). Analisando, posteriormente, os tecidos com adenocarcinomas pancreáticos, utilizando-se de um mesmo sistema de coloração, verificamos que os mastócitos apresentaram-se de forma numerosa, com importante índice de degranulação e com intensa metacromasia.

O mastócito é uma célula que está aumentada quanto ao seu número em diferentes tecidos tumorais, e, portanto, tem sido estudada, por diversos autores, em diferentes neoplasias (Fisher et al., 1965; Farram et al., 1980; Flynn et al., 1991). Parece-nos que existe uma correlação positiva entre o desenvolvimento de carcinomas e o aumento da concentração dos mastócitos. Esta célula é importante como participante do mecanismo da inflamação, a qual atua tanto na sua indução, como também no processo de regulação deste mecanismo (Pearce, 1989). Entretanto, ainda precisa ser melhor estudada quanto à sua participação efetiva nos processos neoplásicos, particularmente nos adenocarcinomas pancreáticos.

No nosso modelo, entre outras participações, pode ser que o mastócito também esteja relacionado com o controle da angiogênese, através da síntese e liberação para o tecido pancreático de heparina, estudada por alguns autores como substância importante da inibição da angiogênese (Rosenbaum et al., 1986).

O fenômeno da angiogênese em câncer foi estudado por diversos autores (Höckel et al., 1988; Folkman et al., 1989; Tobelem 1990; Weidner et al., 1991). O aumento da vascularização do tumor o permite crescer, invadir os tecidos e auxilia consideravelmente a sua atividade metastática (Liotta et al., 1991). Neste trabalho, durante o período pre-tumoral, observamos uma importante angiogênese em todo o tecido pancreático (Dados não mostrados).

Durante o nosso estudo, através das reações de imunoperoxidase, detectamos as imunoglobulinas presentes no tecido pancreático. Durante a evolução do processo tumoral, houve aumento considerável do número de capilares entre o tecido acinoso, o qual se intensificou através do período do tratamento. Estas observações, além de contribuírem na

definição de uma possível característica importante para um prognóstico de neoplasia, vieram complementar as nossas análises, relacionando a evolução destes fenômenos com o desenvolvimento do câncer pancreático exócrino.

O aumento de capilares no pâncreas exócrino, o qual é um fenômeno precoce nos nossos resultados, seria então um dos responsáveis pelo aumento de células do sistema imune drenadas para as áreas em transformação tumoral. Estas células proveriam principalmente da circulação, como também seriam possivelmente drenadas dos linfonodos presentes nas áreas do tecido conjuntivo situadas no contorno do pâncreas, observadas no início do tratamento. A neo-vascularização, além de conduzir com maior desempenho os nutrientes necessários ao crescimento tumoral, favorece o transporte das células "T" e dos anticorpos presentes nos tecidos em transformação. Portanto, neste trabalho parece ser o papel principal da neo-vascularização, o desempenho de conduzir estas células e anticorpos para as regiões em transformação. Possivelmente, as alterações precoces nos ácinos são acompanhadas de uma liberação de antígenos associados a essas alterações, sendo estes liberados no meio externo, induzindo assim uma resposta imunológica, através das associações destes eventos. Levados pelas neo-vascularização, estes antígenos seriam posteriormente reconhecidos pelos linfócitos "T", os quais possivelmente agrediriam estas células em transformação. Nossos resultados mostram que esta possível agressão estava presente antes mesmo que as células acinares apresentassem alterações histológicas(Fig.15). Estas células proliferariam "in situ", formando verdadeiros nódulos, drenariam mastócitos, macrófagos e linfócitos "B" para a região em processo de inflamação.

A presença das células "B" ou Plasmócito, possivelmente aumentou a produção de anticorpos na região em processo de transformação neoplásica, os quais se apresentaram concentrados junto às lâminas basais dos ductos em transformação, como também impregnando o colágeno, cuja estrutura também está aumentada com a carcinogênese.

O colágeno tem também, como função biológica, o transporte de substâncias para os tecidos. Foi possível observar que o colágeno durante o aumento da sua concentração no

estroma pancreático, se cobre de anticorpos, o que poderia ser considerado como auxílio numa resposta efetiva de proteção aos tecidos em transformação.

Os aspectos imunológicos da presença de anticorpos na massa tumoral foram intensamente estudados durante longa data (Feldman, 1972- Rev.; Roberts et al., 1973). Entretanto, ainda no momento, discute-se qual seria o verdadeiro papel destes anticorpos localizados nos tumores.

Um dos primeiros estudos de Rosenberg em câncer foi direcionado para obter um efetivo tratamento de tumores, com diferentes esquemas de soroterapia (Rosenberg, et al. 1977). Assim, durante anos tentou-se uma estratégia de trabalho em tumores, utilizando-se anticorpos, porém estes modelos apresentaram-se sem sucesso (Witz, 1977). Após, a produção de anticorpos monoclonais, tentou-se uma possível terapia eficaz (Levy et al., 1983), mas os resultados foram de certa forma desanimadores e, em alguns modelos, surpreendentes. Alguns tumores foram capazes de se proteger por estes anticorpos e cresceram exacerbadamente (Manson, 1991). Em relação ao que foi descrito acima, podemos admitir que estes anticorpos presentes nas lâminas basais dos ductos em hiperplasia, poderiam ser responsáveis pelo reconhecimento e cobertura dos epitopos apresentados pelas células em transformação. Isto permitiria o mascaramento dos tecidos alterados e favoreceria o insucesso geral das imunoterapias.

A presença de debris celulares nas lâminas basais de vários ductos em hiperplasia indicada na figura 9, poderia estar relacionada à uma interação inicial destes anticorpos com a primeira camada epitelial em processo de alteração e com a participação do sistema complemento. Isto promoveria então uma lesão destas células. Depois, não sendo mais possível a participação do sistema complemento, os anticorpos fixados nas próximas camadas epiteliais não seriam capazes de induzir um processo lítico sobre estas células. À partir daí se instalaria o mecanismo de proliferação, promovendo um aumento da massa celular em alteração.

A possível não participação efetiva do sistema complemento durante os processos tumorais, até o presente momento, continua mal esclarecida (Witz, 1977; Manson, 1991). Assim a presença de anticorpos "in situ", mantendo a integridade das células acinares ou epiteliais discutida aqui neste modelo, pode estar estritamente relacionada a este fenômeno.

Durante a cinética de participação do "TIL"(Tumor Infiltrating Lymphocytes), em torno dos ductos não foi possível uma célula "T" se apresentar em contacto direto com a camada epitelial, ou mesmo em um estado de agressão ao ducto em hiperplasia. Duas possibilidades poderiam estar relacionadas a estes aspectos: Uma primeira seria a grossa barreira de colágeno que se forma na lâmina basal a qual impediria o estreito contacto destas células. Logo, estas células seriam então incapazes de ter contacto com os antígenos associados ao tumor, possivelmente expressados nestas camadas epiteliais. Uma segunda possibilidade seria o mascaramento destes antígenos epiteliais pelo próprio reconhecimento molecular dos anticorpos específicos presentes nestas áreas, impossibilitando que as células "T" reconhecessem estes mesmos antígenos. Considerando que os antígenos do tipo oncofetais são expressados nas células epiteliais durante as neoplasias e nos ductos em transformação (Escribano et al., 1985), estes dados poderiam, portanto, explicar porque crescem os tumores, à despeito da participação efetiva do Sistema Imunológico.

Durante as fases iniciais das transformações, os tecidos acinares não mostraram presença de imunoglobulina nas suas estruturas (Tabela V- item 1). Mas, quando deixamos em contacto o tecido pancreático com o soro do animal tratado e correspondente, observamos que as imunoglobulinas reconheciam estruturas nas células acinares e que este reconhecimento aumentava com a carcinogênese(Tabela V- item 3). Portanto, podemos constatar que na maioria dos animais tratados, durante as últimas semanas do estudo, que os anticorpos presentes nos soros destes animais apresentaram especificidade a antígenos associados às células acinares, lâmina basal e células epiteliais dos ductos. Estes resultados foram observados principalmente no tecido acinar com grandes alterações. Especialmente nos a

denomas estava presente um mecanismo de auto-reconhecimento (Fig 22).

O soro dos animais tratados não reconheceram estruturas do tecido pancreático normal (Tabela IV). Este dado evidencia que os anticorpos presentes nos soros destes animais são possivelmente dirigidos contra antígenos associados às transformações celulares.

Estes fatos sugerem que os antígenos associados ao tecido acinar em transformação neoplásica, os quais são expressos precocemente, são capazes logo no início da carcinogênese de induzir o Sistema Imune a apresentar uma resposta mediada por células, sendo mais tarde capazes de induzir uma resposta humoral. Considerando, portanto, que a proliferação do epitélio ductal é capaz de se fazer em paralelo a um processo de defesa, tanto celular quanto humoral. Talvez, o acesso destes anticorpos seja mais importante na membrana basal destes ductos graças à presença da espessa camada de colágeno que os contorna. Também, o nível humoral da produção de imunoglobulinas está aumentado em geral somente na última semana de tratamento(Tabela III). Talvez neste momento da carcinogênese, passa a ser importante o processo de defesa pelos anticorpos, como um trabalho efetivo do sistema imunológico.

Também a presença de pequenos focos de células "B", dispersos somente nas áreas de grandes hiperplasias ductais, nos auxilia na interpretação de que possivelmente estas células são capazes de produzir anticorpos dirigidos a antígenos expressos nas células dos canais ductais ou seja, " in situ".

Apesar da atuação do sistema complemento em câncer ser um fenômeno mal esclarecido, talvez possamos sugerir que a participação do complemento seja bloqueada em função de todo um complexo de alterações sucessivas, que acompanham o processo tumoral. Diante do que foi exposto anteriormente, os restos celulares (debrís celulares) presentes logo abaixo da camada epitelial dos ductos em hiperplasia, e também a marcante presença de anticorpos impregnando a lâmina basal(Fig.9 e Fig.18), nos sugere uma possível participação do sistema complemento, certamente no início do processo de defesa.

A relação entre o Sistema Imune e as neoplasias tem sido confirmada atualmente, em particular pelos estudos dos processos associados a imunodeficiências(Vorechovsky et al., 1990). Evidencia-se esta relação também através de inúmeras observações de sintomas clínicos, que muitas vezes desaparecem quando o paciente está sendo submetido à diferentes imunoterapias, ora utilizando células linfóides presentes no tecido tumoral, ora utilizando produtos destas células através de uma estratégia de reconhecimento dos antígenos expressados pelas células em transformação (Fridman, 1991 ; Wigzell, 1993).

Na hipótese de uma Resposta Imune mediada por células ou uma Resposta Imune mediada por anticorpos, as quais podem ser induzidas por antígenos tumorais, através destes resultados, podemos sugerir que estes mecanismos trabalham em paralelo com os processos de imunodepressão específica que ocorrem durante o avanço das neoplasias. Simplesmente, poderá haver uma inabilidade dos anticorpos no processo de interação com estes antígenos. Ou então uma inabilidade das células imunocompetentes em bloquear a proliferação dos ductos, em virtude da presença da barreira fibrótica protetora constituída de colágeno, circundando estes ductos, ou a impossibilidade destas células de não conseguir detectar os antígenos específicos das células em transformação, os quais estão mascarados pelos anticorpos.

Os resultados apresentados e discutidos nesta tese podem contribuir para a compreensão dos mecanismos responsáveis pela indução dos processos neoplásicos, ajudando portanto no estudo de novas estratégias no tratamento do câncer. Estes dados podem estimular os novos caminhos da imunoterapia, através de uma determinação simples e precisa: " A Vigilância Imunológica representa um mecanismo básico e efetor nos primeiros momentos do processo neoplásico".

A carcinogênese experimental em hamster, induzida por nitrosaminas, é um processo multifásico dando origem a adenocarcinomas na fase terminal, semelhante à doença humana. A resposta humoral e celular neste modelo, levou aos seguintes resultados: Quando os tecidos são tratados com antissoro específico aos linfócitos "T" de hamster, observamos uma migração de células "T" através do tecido exócrino em paralelo a neo-vascularização intensa (angiogênese). Esta migração foi observada precocemente, antes que pudesse constatar lesões nas análises por histologia convencional. Parece que as células em possível cooperação com outras células imunocompetentes, foram capazes de atacar ou destruir as acinares sem alterações morfológicas evidentes, ao lado de canais hiperplásicos correspondentes às lesões pré-neoplásicas. Entretanto, não foi observado linfócitos "T" em contacto direto com os canais em hiperplasia epitelial.

Ao longo da carcinogênese observamos um aumento progressivo da síntese de imunoglobulinas circulantes. Esta foi medida pelo método semi-quantitativo "dot-blot", utilizando antissoro anti-IgG total de hamster. O método da imunoperoxidase indireta nos cortes histológicos, mostrou a presença de auto-anticorpos dirigidos provavelmente contra neo-antígenos, que surgiram em consequência das lesões induzidas.

Estes auto-anticorpos foram localizados inicialmente nas células acinares, em seguida nos canais em hiperplasia. Entretanto, os canais tumorais mostraram-se negativos para presença de auto-anticorpos

Nossos resultados indicam que: 1 - Há uma resposta imunológica do tipo humoral e celular à medida que o processo de transformação progride. 2 - O sistema imunológico participa provavelmente de uma maneira ativa, durante o período pré-neoplásico. 3 - A fase terminal da transformação escapa à vigilância imunológica.

Podemos colocar como razão possível desta resistência; um mascaramento ou uma regressão dos neo-antígenos, uma impermeabilização às células imunocompetentes, através de uma barreira de fibrose geralmente contornando adenocarcinomas. Todos estes fenômenos foram também descritos em câncer humano.

Experimental carcinogenesis in hamster, induced by nitrosamines, is a multiphasic processus ultimately leading to adenocarcinomas closely resembling the human illness. A follow-up of humoral and cellular immuneresponses in this model allowed the following results: When tissues were processed with an antiserum specific for hamster T-lymphocytes, we observed a migration of T-cells through the exocrine tissue concomitant with abundant neovascularitation (angiogenesis). Migration occurred far before lesions could be noticed by conventional histology. Apparently, these cells, in possible cooperation with other immunocompetent cells, were able to attack or destroy acini with no significant morphological alterations as well as hyperplastic ducts which are preneoplastic lesions. T-lymphocytes in neoplastic ducts were, on the contrary, not observed.

Along the carcinogenesis there also was an increase in immunoglobuline synthesis in blood-circulation. This was evaluated by semiquantitative nitrocellulose immuno "dot blot" using anti-whole Ig antiserum. Indirect immunoperoxidase in the tissue sections showed presence of autoantibodies directed against neoantigens appearing as a consequence of the induced lesions. Autoantibodies progressively increased and were located first in acini then in hyperplastic duct. By contrast, tumor ducts were negative for the presence of autoantibodies.

Our results indicate: 1- Existence of a progressive immuneresponse, both humoral and cellular, along the transformation. 2- A possible immunesurveillance during the preneoplastic period. 3- A scape to immun-system in the terminal stage.

Possible reasons for the scape could be: masking or regression of neoantigens, cell impermeabilisation thanks to the fibrous barrier that generally surround ductal carcinomas. All these phenomena have been also documented in human cancer.

La carcinogenèse expérimentale chez le hamster, induite par des nitrosamines, est un processus multiphasique dont les adénocarcinomes de la phase terminal ressemblent à la maladie humaine. Le suivi des réponses humorale et cellulaire dans ce modèle, a conduit aux résultats suivants: Lorsque les tissus sont traité avec un antisérum spécifique pour les lymphocytes T de hamster, nous avons observé une migration de cellules T à travers le tissu exocrine en parallèle avec une néovascularisation abondante (angiogenesis). La migration était observée bien avant que de lésions puissent être observées par l'histologie conventionnelle. En apparence, ces cellules en coopération possible avec autres cellules immunocompétentes, étaient capables d'attaquer ou détruire des acini sans des altérations morphologiques évidentes, ainsi que des canaux hyperplasiques qui sont des lésions préneoplasiques. Cependant nous n'avons pas observé des lymphocytes T associés aux canaux tumoraux.

Tout au long de la carcinogenèse nous avons observé également une augmentation progressive de la synthèse des immunoglobulines circulantes. Ceci a été mesuré par semiquantitatif "dot-blot" utilisant un antisérum anti-Ig totales de hamster. La méthode d'immunoperoxidase indirecte dans des coupes tissulaire, a montré la présence d'autoanticorps dirigés probablement contre de néoantigènes apparaissant comme conséquence des lésion induites. Ces autoanticorps étaient localisés d'abord dans les acinis dans les canaux hyperplasiques. Par contrast les canaux tumoraux ont été négatifs pour la présence d'autoanticorps.

Nos résultats indiquent que : 1- Il y a une réponse immunologique à la fois humorale et cellulaire a mesure que le processus de transformation progresse. 2- Le système immunologique participe probablement d'une manière active pendant la période pré-neoplasique. 3- La phase terminale de la transformation échappe à la surveillance immunologique.

On peut invoquer comme raisons possible de cette résistance; un masquage ou une régression des néoantigènes, une imperméabilisation aux celules immunecompétents par le fait de la barrière fibreuse qui généralement entoure l'adénocarcioma. Tous ces phénomènes ont été aussi décrits dans le cancer humain.

IX - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAX, J., POUR, P.M., NAGEL, D.L., LAWSON, T.A., WOUTERSEN, R.A. AND SCHERER, E. (1990) Long-term persistence of DNA alkylation in hamster tissue after N-nitroso-bis(2-oxypropyl)amine. **J. Cancer Res. Clin. Oncol.** **116**: 149-155.

BENEDI, V.J., ESCRIBANO, M.J., ZUNGHEDAU, J. AND BURTIN, P. (1984) Fetal pancreatic antigens in the Syrian Golden hamster and their relationship to development and carcinogenesis. **Cancer Res.**, **44**: 1135-1141.

BOCKMAN, D.E. (1981) Cells of origin of pancreatic cancer: experimental animals tumor related to human pancreas. **Cancer**, **47**: 1528-1534.

BOJAN, F., MALCOLN, A.M. AND ANTONIA FLAKS. (1980) Ultrastructural analysis of pancreatic carcinogenesis. III- Multifocal cystic lesions induced by N-nitroso-bis-(2-hydroxypropyl)-amine in the hamster exocrine pancreas. **Carcinogenesis**, **1**: 693-706.

BOSE, K.K., ALLISON, D.C., HRUBAN, R.H., PIANTADOSE, S., ZAHURAK, M. DOOLEY, W.C., LINS PAUL AND CAMERON, J.L. (1993) A comparison of flow cytometric and absorption cytometric DNA values as prognostic indicators for pancreatic carcinoma. **Cancer**, **1**, **71**: 3, 691-700.

BUBENICK, J., SIMOVÁ, J., BUBENICKOVÁ, D., ZEUTHEN, J. AND RADZIKOWSKI, C. (1993) Utilization of Interleukin-2 genetrasfer in local immunotherapy of cancer. **J. Cancer Res. Clin. Oncol.** **119**: 253-256.

BURTIN, C. (1986) Mast cells and tumor growth. **Ann. Inst. Pasteur/Immunol.**, **137D** : 289-294.

CARRÉ-LLOPIS, A. (1986a) Protéines de differenciation des acini pancréatiques. Leur association avec le développement et la cancérisation du pancreas. Isolement et caractérisation. Thèse ès Sciences, de l'Université de Paris XI. France

CARRÉ-LLOPIS, A., ZUINGHEDAU, J., ESCRIBANO. M.J. AND VAUX SAINT-CYR, C. (1986b) Detection of pancreas pretumoralstage by means of organ transplantation. **Tumor Biol.**, **7**, **1**: 61-69.

CARRÉ-LLOPIS, A., LORIDON-ROSA, B. AND ESCRIBANO, M.J.(1987) Ultrastructural changes in acinar cells of hamster pancreas in chemically induced carcinogenesis. **Cell. Biol. Int. Reports.** **11**: 665-669.

CHEN, J., BAITHUN, S.I. AND RAMSAY, M.A. (1985) Histogenesis of pancreatic carcinomas: a study based on 248 cases. **J.Pathol.** **146**: 65-76.

- CIDRE, L.L. AND LUSTIG, E.S. (1990) Mast cells kinetics during tumor growth. **Tumor Biol.** **11**: 196-201.
- CROZEMARIE, J. (1992) Immunotherapie vers un vaccin anti-cancer. **Fondamental.** **53**: 4-10
- CUBILLA, A.L. AND FITZGERALD, P.J. (1979) Classification of pancreatic cancer (non-endocrine). **Mayo Clinic.Proc.** **54**:449-458.
- CUBILLA, A.L., AND FITZGERALD P.J. (1980) Cancer (non exocrine) of the pancreas. A suggested classification. In: **The pancreas** Int. Academy of Pathol. monograph. - Williams and Wilkins, Baltimore/London: 82-110.
- DOLL, R., MUIR, C. AND WATERHOUSE, J. (1970) Cancer incidence in five continents. Vol II-Spring-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York.
- EREMIN, O., COOMBS, R.R.A., PROSPERO, T.D. AND PLUMB, D. (1982). T-lymphocyte and B-lymphocyte subpopulations infiltrating human mammary carcinomas. **J. N. Cl.**, **69**, **1**: 1-8.
- ERIGUCHI, M., CARRÉ-LLOPIS, A., ORBACH-ARBOUYS, S. AND ESCRIBANO, M.J. (1987) Evolution of the expression of fetal acinar antigens during carcinogenesis of the pancreas in hamsters: Individual follow-up by openbiopsy. **J. N. C.I.**, **78**: 519-525.
- ESCRIBANO, M. J., HADDADA, H. AND VAURX SAINT CYR, CH.(1982) Isolation by two immunoglobulin G subclasse IgG2 and IgG1 from hamster serum using protein A-Sepharose. **J.Immunol. Meth.** **52**: 63-72.
- ESCRIBANO, M. J., CARRÉ-LLOPIS, A. AND LORIDON-ROSA, B.(1985) Expression of oncofetal pancreatic antigens in hamster adult pancreas during experimental carcinogenesis. **Br. J. Cancer.** **51**: 187-193.
- ESCRIBANO, M.J., CORDIER, J., NAP, M., TEN KATE, F.J.W. AND BURTIN, P. (1986) Differentiation antigens in fetal human pancreas. Reexpression in cancer. **Int. J. Cancer**, **38**: 155-160.
- ESCRIBANO, M. J. , HEREDIA, A., CARRÉ-LLOPIS, A. (1990) Protéines oncofoetales du pancréas exocrine., **Bull. Cancer** **77**: 75-81.

- FAIVRE, J., BEDENNE, L. AND KLEPPING, C. (1990) Epidémiologie descriptive du cancer du pancréas. **Bull. Cancer**, **77**: 39-46.
- FARRAM, E. AND NELSON, D. (1980) Mast cells as anti tumor effector cells. **Cell. Immunol.**, **55**: 294-301.
- FEARON, E.R. AND VOGELSTEIN, B. (1990) A genetic model for colorectal tumorigenesis. **Cell.**, **61**, **1**: 759-767.
- FELDMAN, J.D. (1972) Immunological enhancement: a study of blocking antibodies . **Adv. Immunol**, **15**: 167-214.
- FLAKS, B., MOORE, M.A. AND FLAKS, A. (1980) Ultrastructural analysis of pancreatic carcinogenesis. III. multifocal cystic lesions induced by N-nitroso-bis(2-hydroxypropyl)amine in the hamster exocrine pancreas. **Carcinogenesis**, **1**, Aug:693-705
- FLAKS, B., MOORE, M.A. AND FLAKS, A. (1981) Ultrastructural analysis of pancreatic carcinogenesis. IV. Pseudoductular transformation of acini in the hamster pancreas during N-nitroso-bis(2-hydroxypropyl)amine carcinogenesis. **Carcino-genesis**, **2**: 1241-1247.
- FLAKS, B. MOORE, M.A. AND FLAKS, A. (1982) Ultrastrutural analysis of pancreatic carcinogenesis. V-Changes in differentiation of acinar cells during chronic treatment with N-nitroso-bis(2-hydroxypropyl)amine. **Carcinogenesis**, **3**: 485-498.
- FISHER, E.R. AND FISHER, N. (1965) Role of mast cells in tumor growth. **Arch.Path.**, **79**:185-191.
- FITZGERALD, P.J. (1976) Pancreatic cancer. The dismal disease. **Arch. Pathol. Lab. Med.** **100**: 513-515.
- FITZGERALD, P.J., FORTNER, J.G AND WATSON, R.C. (1978) The value of diagnostic aids in detecting pancreas cancer. **Cancer**, **41**: 868-872.
- FLYNN, E.A., SCHWARTZ, J.L. AND SHKLAR, G. (1991) Sequential mast cell infiltration and degranulation during experimental carcinogenesis. **J. Cancer Clin. Oncol.** **117**: 115-122.

- FOLKMAN, J. (1990) What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? **J. N. Cancer Inst.** **82**, 1,3: 4-6.
- FRIDMAN, W.H. (1991) L'Immunothérapie des cancers. **La Recherche- Suppl.** **237**: 46-53.
- FUJII, Y., ALBERS, G.H.R., CARRÉ-LLOPIS, A. AND ESCRIBANO, M.J. (1987) The diagnostic value of the fetoacinar pancreatic (FAP) protein in cancer of the pancreas; a comparative study with CA19-9. **Br. J. Cancer**, **56**:495-500.
- GUDJONSSON, B. (1987) Cancer of pancreas, 50 years of surgery. **Cancer**, **60**: 284-303.
- GALILI, U., VANKY, F. AND KLEIN, E. (1979) Activated T lymphocytes within human solid tumors. **Cancer Immunol. Immunother.** **6**: 129-135.
- HADDADA, M.H., ESCRIBANO, M.J., VAUX SAINT CYR, C. AND BARRA, Y. (1984) Variations in the levels of IgG1 and IgG2 subclasses in sera of normal, immunized and tumor-bearing hamster. **Eur. J. Cancer Clin. Oncol.**, **20**, 4: 553-560.
- HEREDIA, A. AND ESCRIBANO, M.J. (1988) A Mr 58,000 glycoprotein specifically expressed in developing hamster pancreas and reexpressed in hamster and in human pancreatic carcinomas. **Cancer Res.**, **48**: 1573-1587.
- HÖCKEL, M., JUNG, W.M., RABES, V.P.H., KHALEDPOUR, C. AND WISSLER, J.H. (1988). Purified monocyte-derived angiogenic substance (angiotropin) induces controlled angiogenesis associated with regulated tissue proliferation in rabbit skin. **J. Clin. Invest.**, **82**: 1075-1090.
- IBAYASHI, Y., UEDE, T., UEDE, T. AND KIKUCHI, K. (1985) functional analysis of mononuclear cells infiltration into tumors: differential cytotoxicity of mononuclear cells from tumors of immune and nonimmune rats. **J. Immunol.** **134**, 1: 648-653.
- IMPERIAL, S. AND ESCRIBANO, M.J. (1988) Concanavalin A variants of the fetoacinar pancreatic protein in the developing human pancreas and other biological sources. **Biochim. Biophys. Acta**, **967**: 25-33.
- KRIIGER, F.W., POUR, P. AND ALTHOFF, J. (1974) Induction of pancreas tumors by di-isopropanolnitrosamine. **Natur-Wissenschaften**, **61**: 328-334.

LAWSON, T., HINES, T. AND POUR, P. (1982) The persistence of DNA damage in the pancreas Syrian Golden hamsters treated with N-nitrosobis(2-oxypropyl)amine. **Chem. Biol. Interactions**, **38**: 317-322.

LIOTTA, L.A., STEEG, P.S. AND STETIER-STEVENSON, G. (1991) Cancer metastasis and angiogenesis: An imbalance of positive and negative regulation. **Cell**. **64**: 327-336.

LEVY, R. AND MILLER, R. (1983) Biological and clinical implications of lymphocyte hybridomas: tumor therapy with monoclonal antibodies. **Ann. Rev. Med.** **34**: 107-116.

LONGNECKER, D.S., SHIMOZUKA, H. AND DEKKER, A. (1980) Focal acinar cell dysplasia in human pancreas. **Cancer**, **45**: 534-540.

LONGNECKER, D.S. (1986) Experimental models of exocrine pancreatic tumors. In: The exocrine pancreas: Biology, Pathobiology and Diseases. ed. Go, V.L.W., et al. Raven Press, N.Y. : 443-458.

LONGNECKER, D.S. (1990) Experimental pancreatic cancer: role of species, sex and diet. **Bull Cancer** **77** :27-37.

LYNCH, N.R. AND SALOMON, J.C. (1977) Tumor-associated inhibition of immediate hypersensibility reaction in mice. **Immunol**, **32**: 645-649.

MANSON, L.A. (1991) Does antibody-dependent epitope masking permit progressive tumour growth in the face of cell-mediated cytotoxicity? **Immunol. Today**, **12**, **10**: 352-355.

MILLS, C. D., NORTH, R. J. AND DYE, E. S. (1981) Mechanisms of anti-tumor action of *Corynebacterium parvum*. II - Potenciated cytolytic T cell response and its tumor-induced suppression. **J.Exp. Med.**, **154**: 621-630.

MARUCHI, N., BRIAN, D., LUDWIG, J., ELVEBACK, L.R. AND KURLAND, L.T. (1979) Cancer of pancreas in Olmsted country, Minnesota, 1935-1974. **Mayo clinic. Proc.**, **54**: 245-249.

- MAZO, A., FUJII, Y., SHIMOTAKE, J. AND ESCRIBANO, M.J. (1991) Expression of fetoacinar pancreatic (FAP) protein in the pancreatic human tumor cell line BxPC-3. **Pancreas**, **6**: 37-45
- MIRALLES, F., LANGA, F., MAZO, A. AND ESCRIBANO, M.J. (1993) Retention of fetoacinar pancreatic (FAP) protein to the endoplasmic reticulum of tumor cells. **Eur. Journal of Cell Biol.** **60**: 115-121.
- MOORE, M.A., TAKAHASHI, M., ITO, N., BANNASCH, P. (1983) Early lesions during pancreatic carcinogenesis induced in Syrian hamster by DHPN or DOPN. I. Histologic, chemical and radioautographic findings. **Carcinogenesis** **4**: 431-437.
- MOROSHOSHI, T., HELD, G. AND KLOPPPEL, G. (1983) Exocrine pancreatic tumor and their histological classification. A study based on 167 autopsy and 97 surgical cases. **Histopathol.** **7**: 645-661.
- MUKHERJI, B., CHAKRABORTY, N.G. AND SIVANANDHAM, M. (1990) T-cell clones that react against autologous human tumors. **Immunol.Reviews**, **116**: 33-62.
- NAKAJIMA, M., WELCH, D.R., BELLONI, P.N. AND NICOLSON, G.L. (1987) Degradation of basement membrane type IV collagen and lung subendothelial matrix by rat mammary adenocarcinoma cell clones of differing metastatic potentials. **Cancer Research**, **47**, **15** : 4869-4876.
- NIND, A.P.P., NAIRN, R.C., ROLLAND, J.M., GULI, E.P.G. AND HUGHES, E.S.R. (1973). Lymphocyte anergy in patients with carcinoma. **Br. J. Cancer**, **28**: 108-117.
- NORTH, R.J. (1985) Rev. Down-regulation of the antitumor immune response. **Adv. in Cancer Research**, **45**: 1-43.
- PARSA, I., LONGNECKER, D.S, SCARPELLI, D.G., POUR, P., REDDY, J.K. AND LEFKOWITZ, M. (1985) Ductal metaplasia of human exocrine pancreas and its association with carcinoma. **Cancer Res.** **45**: 1285-1290.
- PEARCE, F.L. (1989) Mast cells: function, differentiation and activation. **Curr. Op. Immunol.** , **1**: 630-636.

POUR, P., KRÜGER, F. W. , ALTHOFF, J., CARDESA, A. AND MOHR, U. (1974) Cancer of the pancreas induced in the Syrian Golden Hamster. **Am. J. Pathol.** **76:** 349-358.

POUR, P., SALMASI, S.Z. AND RUNGE, R.G. (1979) Ductular origin pancreatic cancer and its multiplicity in man comparable to experimentally induced tumor. **Cancer Lett.**, **6:** 89-97.

POUR, P., RUNGE, R., BIRT, D., GINGELL, R., LAWSON, T., NAGEL, D., WALLCAVE, L. AND SALMASI, S. (1981) Current knowledge of pancreatic carcinogenesis in the hamster and its relevance to the human disease. **Cancer**, **47:** 1573-1587.

RAO, M.S. (1987) Animal models of exocrine pancreatic carcinogenesis. **Cancer Met. Rev.**, **6:** 665-671.

ROBERTS, M.M., BASS, E.M., WALLACE, I.W.J. AND STEVENSON, A. (1973) Local immunoglobulin production in breast cancer. **Br. J. Cancer**, **27:** 269-275.

ROSENBAUM, J. AND DWYER, J.M. (1977) The role of IgE in Immune Response to neoplasia:a review. **Cancer**, **39:** 11-20.

ROSENBAUM, J., TOBEBELEM, G., MOLHO, P., BARZU, T. AND CAEN, J. (1986) Modulation of endothelial cells growth induced by heparin. **Cell. Biol. Int. Rep.**, **10:** 437-446.

ROSENBERG, S.A. AND TERRY, W.D. (1977) Passive immunotherapy of cancer in animals and man. **Adv. Cancer Res.**, **25:** 323-389.

ROSENBERG, S.A., AEBERSOLD, P., CORNETTA, K., KASID, A., MORGAN, R.A., MOEN, R., KARSON, E.M., LOTZE, M.T., YANG, J.C., TOPALIAN, S.L., MERINO, M.J., CULVER, K., MILLER, A.D., BLAESE, R.M. AND ANDERSON, W.F. (1990) Gene transfer into humans-immunotherapy of patients with advance melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction. **N. Engl. J. Med.** **323:** 570-578.

ROSENBERG, S.A. (1990) Adoptive immunotherapy for cancer. **Sc. Amer.**, **262;** **5:** 34-40.

ROTH, J.A., GRIMM, E.A., GUPTA, R.K. AND AMES, R.S. (1982) Immunoregulatory factors derived from human tumors. I-Immunologic and biochemical characterization of factors that suppress lymphocyte proliferative and cytotoxic responses "in vitro". **J. Immunol.**, **128**, **5**: 1955-1962.

RÖTHLIN, M.A., JOLLER, H. AND LARGIADER, F. (1992) CA 242 Is a new tumor marker for pancreatic cancer. **Cancer**, **1**, **73**, **3**: 701-707.

SAINTE-MARIE, G. (1962) A paraffin embedding technique for studies employing immunofluorescence. **J. Histochem. Cytochem.** **10**: 250-256.

SCARPELLI, D.G. AND RAO, M.S. (1978) Pathogenesis of pancreatic carcinoma in hamsters induced by N-nitrosobis(2-oxypropyl)amine (BOP). **Fed. Proc.**, **37**: 232-237.

SCHULTZ, D.R. AND YUMIS, A.A. (1979) Tumor-associated antigen in human pancreatic cancer. **J. Natl. Cancer Inst.**, **62**: 777-782.

SCHERER, E., BAX, J. AND WOUTERSEN, R.A. (1989) Pathogenic interrelationship of lesions, nodules, adenomas and carcinomas in the multistage evolution of azarine-induced rat pancreas carcinogenesis. Biologically based methods for cancer risk assessment. (NATO ASI)- Vol.159 - London, pp.41-54.

SHIMOKAWARA, I., IMAMURA, M., YAMANAKA, N., ISHII, Y. AND KIKUCHI, K. (1982) identification of lymphocyte subpopulation in human breast cancer tissue and its significance: an immunoperoxidase study with anti-human T- and B-cell sera. **Cancer**, **49**: 1456-1464.

TARIN, D., HOYT, B.J. AND EVANS, D.J. (1982) Correlation of collagenase secretion with metastatic colonization potential in naturally occurring murine mammary tumors. **Br. J. Cancer**, **46**: 266-278.

TAKEDA, Y. AND ESCRIBANO, M.J. (1991) Effects of insulin and somatostatin on the growth and the colony formation of two human pancreatic cancer cell lines. **J. Cancer Res. Clin. Oncol.**, **117**: 416-420.

TAKEMURA, K., HIROKAWA, K., HIROYAMA, R. AND MISHIMA, Y. (1991) Characterization of lymphocyte subsets in gastric cancer and its regional lymph nodes. **The Cancer Journal**, **4**: 244-248.

- TING, C.C. AND RODRIGUES, D. (1980) Switching on the macrophage-mediated suppressor mechanism by tumor cells to evade host immune surveillance. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, **7**: 4265-4269.
- TOBELEM, G (1990) L'angiogenèse tumorale. **Médecine/Science**, **6**: 426-432.
- TUTTLE, T.M., INGE, T.H., MCCRADY, C.W., PETTIT, G.R. AND BEAR, H.D. (1992) Activation and growth of murine tumor-specific T-cells which have "in vivo" activity with bryostatin I. **Cancer Res.**, **52**: 548-553.
- TUTTLE, T.M., MCCRADY, C.W., INGE, T.H., SALOUR, M. AND BEAR, H.D. (1993) Y-Interferon plays a key role in T-cell-induced tumor regression. **Cancer Research**, **53**: 833- 839.
- UNDERWOOD, J.C.E. (1974) Lymphoreticular infiltration in human tumours: Prognostic and biological implications: A review. **Br. J. Cancer**, **30**: 538-548.
- VAUX SAINT-CYR, C., LOISILLIER, F. AND ZUINGHEDAU, J. (1977) Humoral and cellular immune response during the growth of an SV40 induced tumor in hamsters. **Ann. Microb (Inst. Pasteur)**, **128 B**: 385-398.
- VORECHOVSKY, I., LITZMAN, J., LOKAJ, J., HAUSNER, P. AND POCH, T. (1990). Common variable immunodeficiency and malignancy: A report of two cases and possible explanation for the association. **Cancer Immunol. Immunother.** **31**: 250-254.
- WEIDNER, N., SEMPLE, J.P., WELCH, W.R AND FOLKMAN, J. (1991) Tumor angiogenesis and metastasis-correlation in invasive breast carcinoma. **N. Engl. J. Med.**, **324**: 1-8.
- WIGZELL, H. (1993) The immune system as a therapeutic agent. **Scientific American**, **Sept**: 95-101.
- WITZ, I.P. (1977) Tumor-bound immunoglobulins: "in situ" expressions of humoral immunity. **Adv.Cancer Res.**, **25**: 95-148.
- WOOLLEY, D.E. (1984) Collagenolytic mechanisms in tumor cell invasion. **Cancer Metastasis Rev.**, **3**: 361-372.

ZBAR, B., BERSTEIN, I.D. AND RAPP, H.J. (1971) Suppression of tumor grow at the site of infection with living bacillus Calmette-Guérin. **J. N. Cancer Inst.**, **46,4**:831-839.

ZUINGHEDAU, J., DUTHU, A. E VAUX SAINT CYR, CH. (1979) Obtention d'une souche de cellules de hamsters transformées par SV 40 à partir d'une lignée de hamsters syngéneiques. **Bull. Cancer**, **66**: 383-388.

ERRATA

ONDE ESTÁ ESCRITO :Agradeço ao prof Dr. Norair S. dos Reis pelo apoio nas análises histológicas

LÊ-SE : Agradeço ao prof Dr. Norair S. dos Reis pelo apoio e amizade no início desta minha carreira profissional.