

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIRURGIA**

**Modelo Experimental de Lesões Intra-epiteliais e  
de Adenocarcinoma Ductal Pancreático  
Induzidos por 7,12-dimetilbenzantraceno em  
Camundongos**

Tese de Doutorado

**ALESSANDRO BERSCH OSVALDT**

**Orientador:** Prof. Luiz Rohde

**Co-Orientadora:** Profa. Maria Isabel Albano Edelweiss

Porto Alegre, 2004

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Medicina: Cirurgia aos oito dias de dezembro do ano de 2005.

### **Banca Examinadora**

Professor José Eduardo Monteiro da Cunha (USP)

Professora Dulce Reis Guarita (USP)

Professora Luise Meurer (UFRGS)

### **Conceito Final**

A com Louvor

**O85e** Osvaldt, Alessandro Bersch

Modelo Experimental de Lesões Intra-epiteliais e de  
Adenocarcinoma Ductal Pancreático Induzidos por 7,12-  
dimetilbenzantraceno em Camundongos / Alessandro Bersch  
Osvaldt; orient. Luiz Rohde; co-orient. Maria Isabel Albano  
Edelweiss. – 2004.  
77f.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do  
Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação  
Medicina: Cirurgia. Porto Alegre, BR-RS, 2004.

1. Adenocarcinoma 2. Neoplasias pancreáticas 3. Carcinoma  
ductal pancreático 4. Modelos animais 5. Camundongos 6. 9,10-  
Dimetil-1,2-benzantraceno I. Rohde, Luiz II. Edelweiss, Maria  
Isabel Albano III. Título.

NLM: WI 810

Catálogo Biblioteca FAMED/HCPA

À minha esposa Luciane Tessmann Osvaldt,

Pelo estímulo incessante ao meu desenvolvimento profissional e pessoal,  
mas, sobretudo, pelo carinho e amor.

Ao meu pai,  
Alvorino Osvaldt, um guia;  
à minha mãe, Elenda Bersch Osvaldt (*in memoriam*),  
pois tenho certeza do seu orgulho neste momento;  
à Silvia Pankowski, pelo acolhimento, e  
aos meus irmãos Alisson e Betânia Osvaldt, pelo carinho.

Ao Professor Luiz Rohde.

Homem honorável.

Professor insigne.

A oportunidade de seu convívio próximo  
será um diferencial na minha vida pessoal e médica.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a algumas das pessoas essenciais para a conclusão deste projeto:

À Dra. Maria Isabel Edelweiss, professora do Departamento de Patologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), co-orientadora desta tese. Indubitavelmente, abrilhantou com seu dinamismo e competência científica este experimento. Agradeço ao carinho e a amizade demonstradas.

Ao Prof. Luiz Lavinski pelo apoio neste primeiro projeto do Centro de Pesquisas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Igualmente à administradora Sra. Rosane Paixão Schlatter.

À Unidade de Experimentação Animal do Centro de Pesquisas do HCPA, Profa. Dra. Roseli de Oliveira Möllerke e seus colaboradores, Veterinário Marcos Eugênio Soares Duarte e Biólogo Eduardo Mottola Amaro da Silveira. O seu auxílio na experimentação como um todo e no cuidado dos animais foram inestimáveis.

Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina: Cirurgia UFRGS, especialmente ao Prof. Dr. Cleber Dario Pinto Kruehl, pelo incentivo, desde a graduação, a minha atividade acadêmica. Às secretárias, Sra Helena Beatriz Costa mas especialmente à Sra. Estela Maris Araripe, pela competência, atenção e amizade.

À professora do Departamento de Patologia da UFRGS, Dra Rita de Cássia Alves Schumacher, pela sua prestimosidade e precisão na avaliação histopatológica.

À Divisão de Produção e Experimentação Animal da Fundação Estadual de Estudos e Pesquisas da Saúde (FEEPS), à veterinária Luisa Macedo Braga e a bióloga Patrícia Sesterheim, pela qualidade do atendimento e dos camundongos para experimentação.

Ao Serviço de Importação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Sra Eliane Santana e Sr. Luiz Daniel Schontag pelo empenho na obtenção dos carcinógenos.

Aos colegas do Instituto do Aparelho Digestivo do Rio Grande do Sul - IADRS, especialmente ao Prof. Dr. Richard Gurski, ao Prof. Dr. Carlos Cauduro Schirmer, ao Prof. Dr. Leandro Totti Cavazzola e ao Dr. André da Rosa Pereira pelo exemplo, amizade e companheirismo.

A alguns amigos e colegas especiais: o Dr. Mário Sérgio Borges da Costa, pelo constante estímulo; a Dra Vivian Pierr Bersch, afável, dedicada e leal; ao Dr. Diego de Mendonça Uchoa pelo auxílio como consultor patológico; Dr. Luiz Roberto Rigo Wendt, companheiro das agruras e alegrias deste experimento; e ao Dr. Ricardo Thofehn, pelo seu apoio, incentivo e ensinamentos desde a graduação.

Ao Professor Dr. Mário Bernardes Wagner pela eficiente e gabaritada orientação estatística.

Ao Professor Dr. João Carlos Prolla pelo auxílio na digitalização da documentação histopatológica.

Ao Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do HCPA (Hospital de Clínicas de Porto Alegre) e da Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde pelo apoio ao protocolo de estudo.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, ao Fundo de Incentivo a Pesquisas (FIPE) e ao Programa de Pós-Graduação em Medicina: Cirurgia, pelo auxílio financeiro prestado.

Aos funcionários do Serviço de Patologia e do Laboratório de Patologia Experimental do HCPA pela presteza na confecção das lâminas.

Ao Dr. Kaspar Z'graggen e Dr. Pascal Zenhder pela documentação enviada sobre a técnica cirúrgica de implantação do DMBA.

Aos colegas médicos Luiz Carlos Adamatti, Ariane Nádia Backes e Gustavo Vanni pelo auxílio na experimentação animal.

Ao Prof. Dale Bockmann que respondeu prontamente aos e-mails com questionamentos sobre o modelo experimental do DMBA.

Ao fotógrafo do HCPA, Sr. Clóvis Prates de Souza pelo auxílio da documentação fotográfica do modelo experimental.

À Bibliotecária Hellen Rose Flores de Flores pelo auxílio com a catalogação bibliográfica.

“Ousar é perder o equilíbrio momentaneamente, não ousar é perder-se.”

**Soren Kierkegaard (1813 - 1855), filósofo-teólogo dinamarquês.**

“Change is the law of life, and those who look only to the past or present are certain to miss the future.”

**John Fitzgerald Kennedy (1917-1963), presidente norte-americano.**

## LISTA DE FIGURAS

<u>Figura 1. Representação morfológica evolutiva e biomolecular das NIPan. Adaptado de Maitra et al (56).</u> .....	29
<u>Figura 2. Estrutura molecular plana do DMBA.</u> .....	35
<u>Figura 3. Camundongo anestesiado fixado à placa de cortiça. Laparotomia mediana.</u> .....	41
<u>Figura 4. Exposição do pâncreas após separação do duodeno e do cólon.</u> .....	42
<u>Figura 5. Sutura em bolsa no pâncreas (área tracejada).</u> .....	42
<u>Figura 6. Fechamento do nó da sutura com aplicador no interior da bolsa.</u> .....	43
<u>Figura 7. Visão anterior do pâncreas após fechamento da sutura da bolsa (seta).</u> .....	43
<u>Figura 8. Visão posterior do pâncreas com o DMBA implantado (seta).</u> .....	44
<u>Figura 9. Peça, após fixação em formalina, com tumor pancreático.</u> .....	44
<u>Figura 10. Curva de Kaplan-Meyer com a proporção de sobrevida para os grupos de 30 e 60 dias em animais submetidos à implantação pancreática de DMBA.</u> .....	50
<u>Figura 11. Gráfico dos diagnósticos histológicos em 30 e 60 dias. HP (hiperplasia reacional), NIPan (Neoplasia Intra-epitelial Pancreática) 1A, 1B, 2 e 3, CM (carcinoma microinvasor) e CI (carcinoma invasor).</u> .....	51
<u>Figura 12. Pâncreas normal. Em A, (C) células acinares, (L) ilhota de Langerhans e em B, (D) ducto centro acinar (setas). Coloração com H&amp;E. Aumento de 20 vezes no original.</u> .....	53
<u>Figura 13. NIPan 1A. Células colunares altas com núcleo alongado.</u> .....	54
<u>Figura 14. NIPan 1B. Epitélio colunar com projecções papilares para o interior do ducto. Coloração com H&amp;E. Aumento de 20 vezes no original.</u> .....	54
<u>Figura 15. NIPan 2. Os núcleos estão aumentados em tamanho e número; hipercromáticos, com perda da polaridade e pseudoestratificação. Coloração com H&amp;E. Aumento de 10 vezes no original.</u> .....	55

<u>Figura 16. NIPan 3. Projeção papilar intraductal com núcleos aumentados com nucléolos evidentes. Coloração com H&amp;E. Aumento de 10 vezes no original.</u> .....	55
<u>Figura 17. (A e B) Carcinoma Invasor. (A) Metaplasia mucinosa (seta). Coloração com H&amp;E. Aumento de 20 vezes no original.</u> .....	56
<u>Figura 18. Bolsa pancreática (setas) com cristais de DMBA no seu interior. Coloração com H&amp;E. Aumento de 4 vezes no original.</u> .....	57
<u>Figura 19. Complexos tubulares. Coloração com H&amp;E. Aumento de 20 vezes no original.</u> .....	57
<u>Figura 20. Processo de transdiferenciação. (A) Células acinares e abaixo célula ductal resultante (seta). Coloração com H&amp;E. Aumento de 10 vezes no original.</u> .....	58

## LISTA DE TABELAS

<u>Tabela 1. Diagnóstico histológico conforme o tempo de exposição ao DMBA.</u> .....	51
<u>Tabela 2. Diagnóstico histológico agrupado conforme o tempo de exposição ao DMBA.</u>	52
<u>Tabela 3. Alterações inflamatórias pancreáticas nos grupos de 30 e 60 dias em animais submetidos à implantação de DMBA.</u> .....	52
<u>Tabela 4. Comparação entre os experimentos com indução química por DMBA em ratos e camundongos.</u> .....	61

## LISTA DE ABREVIATURAS

**ADP** - adenocarcinoma ductal de pâncreas

**BOP** - N-nitroso-bis(2-oxopropyl)amine

**CCK** - colecistoquinina

**DMBA** - 9,10-dimetil-1,2-benzantraceno ou 7,12-dimetilbenzantraceno

**DDT** - diclorodifeniltricloreto

**DPEA** - Divisão de Produção e Experimentação Animal

**EGF** - fator de crescimento epitelial

**EUA** - Estados Unidos da América

**FEEPS** - Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde

**H&E** – hematoxilina e eosina

**HL** - hiperlipídica

**HP** - hiperprotéica

**IC** - Intervalo de confiança

**IHPBA** - International Hepato Pancreato Biliary Association

**MUC** - mucina intra-epitelial

**NIPan** – Neoplasia intra-epitelial pancreática

**RR** - Risco relativo

**SEA** - Seção de Experimentação Animal

**SPSS** - Statistical Package for the Social Sciences

**TGF- $\alpha$**  - fator transformador do crescimento alfa

## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS .....	VII
LISTA DE FIGURAS .....	XI
LISTA DE TABELAS.....	XIII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XIV
SUMÁRIO.....	XV
RESUMO.....	XVII
ABSTRACT .....	XVIII
INTRODUÇÃO.....	19
OBJETIVOS.....	22
Principal.....	22
Secundários.....	22
REVISÃO DA LITERATURA .....	23
EPIDEMIOLOGIA.....	23
PATOLOGIA .....	26
Lesões Precursoras .....	26
Genética Molecular .....	29
CARCINOGENESE EXPERIMENTAL EM ANIMAIS .....	32
Modelos experimentais com animais geneticamente modificados.....	32
Modelos experimentais com carcinógenos químicos .....	33
MÉTODOS.....	39
MODELO EXPERIMENTAL .....	39
Animais e alojamento .....	39

Preparação do DMBA .....	40
Anestesia.....	40
Técnica Cirúrgica .....	40
Morte dos animais .....	45
ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA.....	45
CRITÉRIOS DOS DIAGNÓSTICOS HISTOLÓGICOS.....	45
ÉTICA .....	48
ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	48
RESULTADOS .....	49
DISCUSSÃO .....	59
CONCLUSÕES .....	66
PERSPECTIVAS .....	66
REFERÊNCIAS .....	67
ANEXO .....	79

## RESUMO

**INTRODUÇÃO:** O adenocarcinoma de pâncreas apresenta um mau prognóstico. A utilização de modelos experimentais é necessária para a compreensão do comportamento biológico tumoral, principalmente das lesões precoces (neoplasias intra-epiteliais pancreáticas - NIPan) e para o desenvolvimento de opções terapêuticas. **OBJETIVO:** Avaliar a carcinogênese pancreática induzida por 7,12-dimetilbenzantraceno (DMBA), em camundongos, aplicando a classificação das neoplasias intra-epiteliais pancreáticas. **MÉTODOS:** 90 camundongos machos, *mus musculus*, da cepa CF1, foram submetidos à laparotomia mediana e 1 mg de DMBA foi implantado na porção cefálica do pâncreas. Os animais foram divididos em dois grupos, com eutanásia em 30 e 60 dias. Em seguida, o pâncreas foi retirado, fixado em formalina e foram confeccionadas lâminas coradas com hematoxilina eosina. Os cortes histológicos foram avaliados por dois patologistas de acordo com os seguintes critérios: pâncreas normal, hiperplasia reacional, NIPan 1A, NIPan 1B, NIPan 2, NIPan 3 e carcinoma. As alterações inflamatórias também foram analisadas. **RESULTADOS:** A avaliação patológica evidenciou, no grupo de 30 dias: 4 (16,7%) animais com hiperplasia reativa, 16 (66,6%) com NIPan e 4 (16,7%) com adenocarcinoma. No grupo de 60 dias: 10 (27,1%) animais com hiperplasia reativa, 13 (35,1%) com NIPan e 14 (37,8%) com adenocarcinoma. A diferença entre os grupos apresentou significância estatística ( $P < 0,05$  – teste exato de Fisher). A prevalência de alterações inflamatórias em 30 dias foi: pancreatite aguda (n=11), pancreatite crônica (n=5) e inflamação dependente da bolsa (n=8). No grupo de 60 dias 11 espécimes apresentavam pancreatite aguda e 26 pancreatite crônica. **CONCLUSÕES:** O modelo experimental com DMBA em camundongos, induz neoplasia intra-epitelial pancreática e adenocarcinoma ductal histologicamente semelhantes ao carcinoma pancreático em humanos. Este modelo pode ser utilizado na investigação da carcinogênese com enfoque na progressão molecular das lesões precursoras até o adenocarcinoma.

## ABSTRACT

**BACKGROUND:** Pancreatic adenocarcinoma has a dismal long-term prognosis. Experimental models are necessary to understand its biological behavior mainly the early pancreatic lesions termed pancreatic intraepithelial neoplasia (PanIN) and to develop new treatments. **OBJECTIVE:** The aim of this study is to evaluate pancreatic carcinogenesis induced by DMBA implantation in mice according to PanIN classification system. **METHODS:** 90 male, *mus musculus*, CF1 mice were submitted to a median laparotomy and 1 mg of DMBA was implanted in the head of the pancreas holded with a purse-string suture. Euthanasia was done after 30 and 60 days. After, the excised pancreata were fixed in formalin, embedded in paraffin and stained with haematoxylin and eosin for histology. The specimens were evaluated by two pathologists according to the following criteria: normal ducts, reactive hyperplasia, PanIN 1A, PanIN 1B, PanIN 2, PanIN 3 and carcinoma. The inflammatory changes were also analyzed. **RESULTS:** The pathologic evaluation showed for 30 days group 4 (16.7%) reactive hyperplasia, 16 (66.6%) PanIN and 4 (16.7%) adenocarcinomas. In the 60 days group there were 10 (27.1%) specimens with reactive hyperplasia, 13 (35.1%) with PanIN lesions and 14 (37.8%) with adenocarcinomas. The difference between groups was statistically significant ( $P < 0,05$ ; Fisher exact test). The prevalence of inflammatory changes in 30 days groups were: acute pancreatitis (n=11), chronic pancreatitis (n=5) and DMBA pocket dependent (n=8). In the 60 days groups, 11 had acute pancreatitis and 26 had chronic pancreatitis. **CONCLUSIONS:** DMBA experimental model in mice induces characteristic pancreatic intraepithelial neoplasia and ductal adenocarcinoma histologically similar to human pancreatic cancer. This model is useful for the study of pancreatic carcinogenesis emphasizing the molecular progression of early pancreatic lesions.

## INTRODUÇÃO

O adenocarcinoma ductal pancreático (ADP) é uma neoplasia cuja incidência é quase igual à mortalidade. A sobrevida em 5 anos é baixa quando comparada a outros tipos de tumores. (1) A estimativa para o ano de 2004, nos Estados Unidos da América (EUA) é de que 31860 novos casos sejam diagnosticados e que 31270 pacientes morram devido à doença. (2)

O único tratamento com intenção curativa é a cirurgia, mas somente em 15 a 20% dos pacientes está indicada a gastroduodenopancreatectomia. (3) Neste seleto grupo, a sobrevida é ao redor de 20%, nas melhores casuísticas. (4) A quimioterapia e radioterapia não têm sido utilizadas como terapia primária. Como adjuvantes, seu impacto está em estudo por meio de ensaios clínicos randomizados. (2,5) Na análise realizada por Sener et al, em mais de 100.313 pacientes, tratados no período de 1985 a 1995, somente 9% foram submetidos à ressecção pancreática e 58% não sofreram nenhum tipo de tratamento para a neoplasia. A sobrevida global destes pacientes, em 5 anos, foi de 5,2% com 23,4% no grupo de pacientes cujo tumor foi ressecado. (6) Assim, o ADP tem uma resposta insatisfatória ao tratamento convencional e o seu prognóstico é pobre.

Nos últimos anos, houve avanços no entendimento da carcinogênese pancreática, principalmente, na biologia molecular destes tumores. Por isso, novas terapias têm sido testadas como vacinas, imunoterapia e inibidores de receptores específicos para o

crescimento tumoral como, por exemplo, os inibidores da farnesil transferase, enzima que é efetora das proteínas da família *ras*. (4)

Para a instituição de novos tratamentos, modelos experimentais que mimetizem a doença dos seres humanos são essenciais. A maioria utiliza o rato e hamster. Um dos modelos mais estudados é o que utiliza o 7,12-dimetilbenzantraceno (DMBA), em ratos. Consiste na implantação deste carcinógeno no pâncreas do animal, com produção de adenocarcinoma semelhante ao que é encontrado no ADP humano. (7,8) Zehnder et al adaptaram este modelo, utilizando o camundongo como animal de experimentação com o desenvolvimento de lesões na seqüência displasia-adenocarcinoma. Este estudo foi publicado sob forma de resumo e apresentado oralmente, no Congresso da IHPBA (International Hepato Pancreato Biliary Association), em Brisbane, Austrália, em 2000. (9) A versão completa não foi publicado em revista constante do *index medicus*.

No momento do diagnóstico 80% dos pacientes apresentam-se nos estágios III e IV da doença, ou seja, com doença localmente avançada ou metastática. (4) O pâncreas por ser um órgão retroperitoneal é de difícil acesso e, por isso, suas neoplasias são diagnosticadas tardiamente, ao contrário de outros órgãos mais aparentes que são passíveis de prevenção e de descoberta precoce, como a pele, a mama ou o colo uterino. As lesões pré-neoplásicas pancreáticas vêm sendo estudadas desde o início do século passado, mas somente em 2001 foram descritas as neoplasias intra-epiteliais pancreáticas (PanIN 1A, PanIN 1B, PanIN 2 e PanIN 3). (10) Há necessidade de aumentar o conhecimento das alterações genóticas e biomoleculares para provar a relevância clínica das NIPans, como lesões precursoras do ADP e desenvolver métodos de diagnose precoce.

Este estudo pretende contribuir para a consolidação de um modelo experimental de indução de ADP com DMBA, em camundongos, aplicando aos achados a classificação das

neoplasias intra-epiteliais pancreáticas de acordo com o consenso de 1999, publicado em 2001. (11)

## **OBJETIVOS**

### **GERAL**

Avaliar a carcinogênese pancreática, induzida por 7,12-dimetilbenzantraceno (DMBA), em camundongos.

### **ESPECÍFICO**

Estudar a prevalência das lesões precursoras (Neoplasias Intra-epiteliais Pancreáticas) e do adenocarcinoma pancreático, em 30 e 60 dias, após implantação do carcinógeno.

## REVISÃO DA LITERATURA

### EPIDEMIOLOGIA

A incidência norte-americana de tumores pancreáticos é de 9 casos/100.000 hab/ano, sendo o décimo primeiro sítio neoplásico primário; é a quarta causa de mortalidade por neoplasia em homens e a quinta em mulheres (6,12,13). No Brasil, em 2000, as neoplasias representaram a segunda causa de morte na população e, a do pâncreas, a décima primeira causa dentre as neoplasias (incidência de 2,6/100.000). O Rio Grande do Sul é o estado que apresenta a maior mortalidade por neoplasia pancreática (5,3/100.000 habitantes), sendo a décima causa em homens e a sexta em mulheres. (14,15)

A maior incidência é na sexta década, a relação entre negros e brancos é 1,5:1 e de homens/mulheres é 1,35:1. (12,13,16)

O *diabete melito* por 5 anos ou mais, especialmente nos pacientes não-insulino dependentes, com idade superior a 40 anos, aumenta o risco proporcional (RR 2,0 IC 95% 1,2 – 3,2). Em alguns pacientes, o diabete melito pode ser uma manifestação precoce do carcinoma pancreático. (17,18,19).

Na *pancreatite crônica* há um aumento da incidência do ADP, proporcional ao tempo de evolução da doença: a cada década há um aumento do risco de aproximadamente 2%. A incidência é de 1,8% aos 10 anos após o diagnóstico de pancreatite e, 4,0% após 20 anos. (20) O risco padronizado de incidência a cada ano é de 19.0 (CI 5.2 – 48.8; P=0,00007), quando comparado à população em geral. (21)

O **tabagismo** é um dos fatores de risco mais importantes. Estima-se que até 30% dos tumores podem ser atribuídos ao fumo como agente etiológico. (16) Vários estudos de casos e controles e coortes demonstraram um aumento de 1,5 a 3,8 vezes no risco de desenvolvimento de ADP. O seu efeito se estende àqueles cujo contato é somente por inalação da fumaça do cigarro. Estima-se que o risco continue aumentando, por um período de 10 a 15 anos, após a cessação do tabagismo. (4,16,22,23) A nicotina, sobretudo as nitrosaminas tabaco específicas, são as principais envolvidas na carcinogênese. (24,25)

A **obesidade** não tem sido associada ao ADP. (26) Alguns tipos de dietas calóricas, como aquelas com alto percentual de proteínas (carnes) ou gorduras, têm demonstrado risco aumentado de desenvolvimento de ADP. (27)

O consumo regular de **álcool** não aumenta a prevalência de ADP, segundo resultados de 15 estudos de coorte e 14 estudos de casos e controles. (23)

O **café**, consumido em grandes quantidades, pode aumentar o risco de ADP. (28) Alguns estudos têm demonstrado que induz mutações no *K-ras*. (16)

Um grupo heterogêneo de trabalhadores e de produtos tem o risco aumentado de ADP. A **exposição ocupacional** está associada aos trabalhadores da indústria da petroquímica, da química, da borracha, dos derivados do plástico e os que mantêm contato com aminas aromáticas; os trabalhadores rurais em contato com DDT (diclorodifeniltricloreto) e outros pesticidas e à exposição a compostos de níquel e de cádmio, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, de querosene e de benzopirenos. (4,16,23)

Algumas cirurgias gastrointestinais têm sido associadas ao aumento da frequência da neoplasia. Pacientes submetidos à **gastrectomia** há mais de 20 anos apresentam um risco de desenvolvimento de ADP de 1,8 (IC 95%, 1,3 – 2,6), após cinco anos da cirurgia, aumentando gradualmente para 3,6 após 35 anos ou mais. (29) A **colecistectomia**,

contrariamente ao que se acreditava no passado, não apresenta riscos, segundo estudos populacionais atuais. (30,31)

O risco de ADP em *parentes de primeiro grau* é de 7,2%, quando a neoplasia foi diagnosticada antes dos 60 anos e de 12,3%, para pacientes com neoplasias múltiplas. (32) A frequência de parentes em primeiro grau aumenta o risco relativo, conforme o número de pacientes acometidos na família: três (32,0; IC 95% 10,2-74,7), dois (6,4; IC 95% 1,8-16,4) ou um (4,6; IC 0,5-16,4). O risco é maior em parentes fumantes. Não existe até o momento um gene causador identificado. (33)

Existem algumas *síndromes genéticas*, cujo gene e o risco relativo de desenvolvimento do ADP estão estudados: câncer de mama e ovário hereditários por mutações em BRCA1 e BRCA2 (aumento de 3,5 a 10 vezes), melanoma múltiplo com mutação do p16 (12 a 20 vezes), síndrome de Peutz-Jeghers (130 vezes), pancreatite hereditária (50 vezes). Também são citados o câncer colo-retal não-polipomatoso hereditário (HNPCC), a ataxia-telangiectasia, a síndrome de Li-Fraumeni, a neoplasia endócrina múltipla do tipo 1, a síndrome de von Hippel Lindau, a disceratose congênita e a neurofibromatose tipo 1. (34)

Por outro lado, alguns fatores têm sido especulados como protetores. Os principais são o alto consumo de *vegetais* e de *frutas* (35), o *azeite de oliva* (36) e a prática de *exercícios físicos*, pelo menos 1 hora e meia por semana (13,16,37).

A *aspirina* é objeto de controvérsia; há estudos populacionais demonstrando a diminuição da incidência e mortalidade pancreática em grupos com consumo regular de aspirina, até 43%. (38,39) Outros não demonstraram nenhum benefício (40,41) ou até mesmo, risco aumentado. (42)

## **PATOLOGIA**

As características histopatológicas do ADP são de epitélio glandular bem desenvolvido, semelhante ao dos ductos normais, envolto em um estroma desmoplásico fibroso. A maioria das lesões varia de moderadamente a bem diferenciadas. As bem diferenciadas caracterizam-se por estruturas ductulares heterogêneas, arranjo tubular ou cribriforme, com projeções papilares nos ductos maiores. Algumas vezes, está tão bem diferenciada que a sua distinção do epitélio normal é difícil. A atividade mitótica é baixa. As células produtoras de mucina são colunares, com citoplasma eosinofílico, maiores do que as normais. O núcleo é ovóide de tamanho variado e nucléolo evidente. As lesões moderadamente diferenciadas são compostas de ductos assimétricos tubulares, de contornos variados, envoltas em estroma desmoplásico. Distinguem-se das lesões bem diferenciadas pelas atípias nucleares, cromatina grosseira e proeminência dos nucléolos. O citoplasma é eosinofílico com mucina menos abundante. As lesões indiferenciadas, além de pouco frequentes, são caracterizadas por glândulas irregulares, pequenas, em nichos que substituem o epitélio acinar. As células têm um marcado pleomorfismo, com pouca ou nenhuma produção de mucina e grande atividade mitótica. (43)

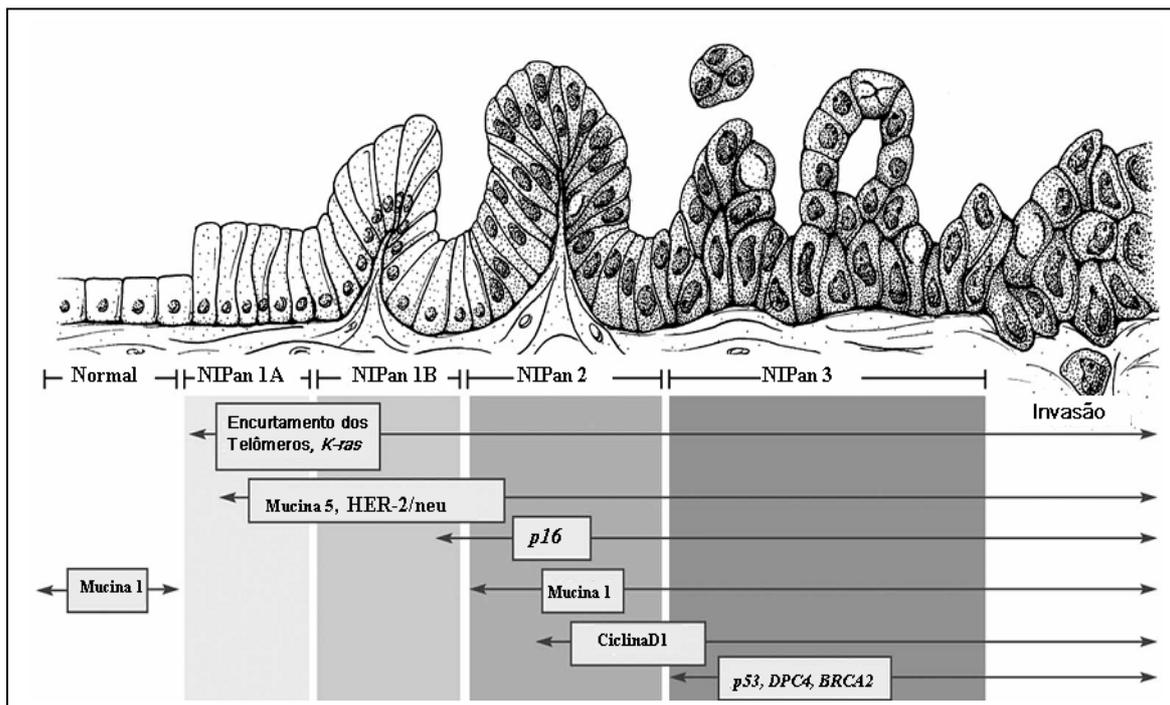
### **Lesões Precursoras**

O pâncreas, por sua localização retroperitoneal, apresenta maiores dificuldades de acesso, para coleta de células e conseqüente desenvolvimento de um modelo de evolução de lesões precursoras até o câncer invasivo, baseado em aspectos clínicos, morfológicos, genéticos e moleculares, a semelhança do que já existe no cólon, no colo uterino, na pele, na mama e na próstata. (44) O modelo de estudo das lesões neoplásicas evolutivas é o de Vogelstein et al, que propõe como seqüência de eventos na célula colônica normal:

mutação do gene APC, formação de pólipos adenomatosos com transformação para displasia em graus variados e, finalmente, o adenocarcinoma colorretal. (45)

A evidência clínica e morfológica desta seqüência de lesões precursoras do ADP inicia-se com as observações de Hulst (1905) da presença de lesões pancreáticas intraductais. (46,47) Sommers et al, (48) após a avaliação de 141 autópsias verificaram um aumento da prevalência de hiperplasia adenomatosa e papilar em pâncreas de pacientes com ADP, comparado aos pacientes sem neoplasia. Em quatro casos, havia lesões progressivas, de hiperplasia, carcinoma *in situ* e invasor na mesma peça. Cubilla e Fitzgerald avaliaram 227 casos de ADP (100 amostras de pancreatectomias e 127 em autópsias) e compararam aos pâncreas de 100 controles (pacientes com neoplasia de outro sítio), encontrando uma prevalência decrescente de hiperplasia papilar ductal, em 50% nos espécimes de autópsia e de 26% nos de pancreatectomia. As presenças de atipia acentuada, que foi de 20% e de carcinoma *in situ* de 18%, foram consideradas como lesões precursoras (47). Nos controles, encontrou-se apenas hiperplasia ductal papilar, sem atipias, em 12 % dos casos (49). Em 1979, Kozuka et al, após examinarem 1174 amostras de tecido pancreático, em autópsias, verificaram a presença de hiperplasia atípica em 29,2% dos pacientes com ADP e somente 0,7% nos pacientes sem ADP. A análise global demonstrou adenocarcinoma invasivo em 2% das autópsias e nesses, hiperplasia com atipias (1,1%), hiperplasia papilar (6,6%) e não-papilar (18,1%). Com base nestes achados, os autores postularam que estas lesões estariam envolvidas na patogênese do ADP (47,50,51). Estudos posteriores confirmaram a presença de hiperplasias papilares no pâncreas, adjacente à zona tumoral de peças cirúrgicas (52). Além disso, a evolução “*in vivo*” destas hiperplasias papilares na margem de espécimes ressecados por ADP, apresentou recidiva local da doença após período variado de acompanhamento. (53,54)

Devido à crescente importância das lesões precursoras e à nomenclatura muito heterogênea, realizou-se uma reunião de consenso em 1999 para unificação da terminologia destas lesões. Um grupo de oito patologistas do Canadá, Estados Unidos da América (EUA), Alemanha e Holanda, analisaram 35 lâminas diferentes, previamente ao encontro. Nessa primeira análise foram encontrados 70 diagnósticos diferentes, mesclando diferentes graus de hiperplasia, displasia, hiperplasia com displasia, PanIN e lesões ductais. Pelo número excessivo de diagnósticos foi impossível a concordância entre os examinadores. Reuniram-se então para o consenso (Pancreas Cancer Think Tank, Park City, UT, EUA) em setembro de 1999, concluindo que a melhor nomenclatura a adotar seria a de PanIN (**P**ancreatic **I**ntraepithelial **N**eoplasia) ou na tradução que propomos para ser utilizada em português, NIPan (**N**eoplasia **I**ntra-epitelial **P**ancreática). Os critérios adotados estão descritos adiante, na seção material e métodos (10). Nas observações clínico-patológicas acima foi verificada a presença das mesmas alterações moleculares dos tumores pancreáticos, também nas lesões precursoras. A representação morfológica evolutiva destas lesões e a seqüência de eventos moleculares estão descritas na figura 1. As fotomicrografias estão publicadas no sítio [http://pathology.jhu.edu/pancreas\\_panin/](http://pathology.jhu.edu/pancreas_panin/) (55).



**Figura 1. Representação morfológica evolutiva e biomolecular das NIPan. Adaptado de Maitra et al (56).**

### Genética Molecular

A *mucina intra-epitelial-1 (MUC-1)* se expressa comumente nos ductos normais, estando negativa nas formas iniciais do NIPan. Há expressão novamente no NIPan 2 até o carcinoma invasor, muitas vezes, citoplasmática, ao contrário da ocorrência na membrana apical das células normais. Este fato está relacionado ao aumento do crescimento celular e da invasão tecidual mediado pela via das proteínas *ras*. A *MUC-2* não está expressa nos NIPans, ao contrário do que ocorre no Carcinoma Intraductal Papilar Mucinoso, sendo importante característica no diagnóstico diferencial (47). A *MUC-5* está ausente no epitélio normal e vai aparecendo paulatinamente na evolução dos NIPans, presente na quase totalidade do ADPs. (56)

Os *telômeros* são seqüências presentes nas extremidades dos cromossomos. O *encurtamento dos telômeros* causa instabilidade cromossômica pela fusão de seqüências do DNA de cromossomos diferentes. O NIPan 1A já apresenta esta anormalidade em 91% dos casos, mantendo-se na evolução para ADP. (57)

O oncogene *Kirsten-ras (K-ras)* é o mais importante na família de proteínas *ras*. Está envolvido em múltiplas vias ativadas por receptores de membrana, ligadas às proteínas GTP (tirosina quinases). Estas proteínas, por diversos mecanismos, são mediadoras do crescimento, da proliferação celular e da apoptose. As mutações no *K-ras* são encontradas em aproximadamente 90% dos ADP, como uma das primeiras mutações nas lesões precursoras. Apesar de várias mutações já terem sido descritas a mais freqüente é a do códon 12. (4,28,58)

A hiperexpressão do *HER-2/neu (c-erb-2)*, uma glicoproteína transmembrana, aumenta a atividade do fator de crescimento epidérmico. É uma das alterações mais precoces, juntamente com o *K-ras*, ocorrendo a partir do NIPan 1A, ou das hiperplasias sem atíпия. (44,59,60)

O *Hedgehog* é uma proteína responsável pelo desenvolvimento de diversos tecidos, em várias espécies animais, especialmente do pâncreas, na fase embrionária. A sua proteína de ligação, *Sonic Hedgehog*, está aumentada no ADP, especialmente nas lesões precursoras como o NIPan 1 e 2. A sua desregulação desencadeia a ativação de genes responsáveis pelo crescimento celular. (61)

A mutação do gene do *p16*, no braço curto do cromossomo 9, bloqueia a replicação celular, inibindo via ciclina D1 e pRb, durante a transição de G1 para S. (34,62). A prevalência da inativação do gene está presente precocemente na carcinogênese em 31% das NIPan 1A, 44% nas 1B, 50% nas NIPan 2 e 85% das NIPan 3 e 95% dos ADP invasores. Existe uma correlação entre a prevalência da p16 e o prognóstico. (56)

A superexpressão da **Ciclina D1** aumenta a proliferação celular e é um fator de pior prognóstico. Sua expressão começa no NIPan 2 (29%), atingindo o pico máximo entre 60% e 85%, no carcinoma invasor. (56)

Em aproximadamente 50% dos ADPs o **DPCA4** (*Deleted in Pancreatic Cancer Locus 4*) está ausente, havendo perda da heterozigidade em 90%. O produto do seu gene o SMAD4 é uma via transdutora de um dos fatores anti-crescimento celular, o TGF- $\beta$ . (34,63) Na seqüência da carcinogênese pancreática é um evento tardio que ocorre em 28% dos NIPan 3. (56,64)

A **p53** é uma das proteínas mais estudadas da carcinogênese humana. Está inativada em 50% a 75% dos ADPs, dependendo da série estudada. As suas funções principais são semelhantes as da p16 no bloqueio do ciclo celular na fase G1, além de induzir apoptose. A mutação da p53 e do *K-ras* são concomitantes na maioria dos tumores invasivos. Juntamente com a DPCA4 e a mutação do BRCA-2 são eventos tardios na seqüência de transformação neoplásica. (47,60,62)

Portadores de mutações germinativas do **BRCA2**, especialmente nas comunidades de Judeus Ashkenazi, apresentam um número maior, em pacientes jovens, de carcinomas de mama, ovário e pâncreas, mesmo na ausência de história familiar. As mutações somáticas são raras. É um evento comum no NIPan e ADP invasor. A sua função na carcinogênese não está bem definida, mas está relacionada à supressão tumoral e ao reparo do DNA. (65)

Além da transformação neoplásica, muitos outros fatores são responsáveis pela evolução e resistência de clones de células mutadas. Os mais importantes são o fator de crescimento epidérmico, fatores de crescimento tumoral, as citocinas, os inibidores da apoptose, entre outros. (66,67)

## CARCINOGENESE EXPERIMENTAL EM ANIMAIS

A compreensão incompleta da carcinogênese pancreática estimula o desenvolvimento de modelos experimentais em animais biologicamente semelhantes ao ADP em humanos. As técnicas e modelos utilizados são variadas e estão descritas a seguir:

### Modelos experimentais com animais geneticamente modificados

São ideais para o estudo das múltiplas etapas da carcinogênese pancreática, realizados, quase que exclusivamente, em camundongos. As principais técnicas utilizam animais transgênicos (inserção de uma seqüência específica de DNA com especificidade de expressão no tecido pancreático), ou *knockout* (deleção genética, por exemplo, p53 deficiente) ou a combinação das duas.

Os dois principais modelos, utilizando o locus promotor da elastase 1 são o do promotor da elastase SV40 (Ela-1-SV40T) e o promotor da elastase-myc (Ela-1-myc). Ambos promovem a ocorrência de hiperplasia e displasia difusa das células acinares, seguidas de lesões proliferativas e carcinomas, sendo que o segundo apresentou, na metade dos casos, diferenciação ductal. A esse modelo foi adicionado o aumento da expressão do TGF- $\alpha$  (fator transformador do crescimento alfa), responsável por diferenciação de tecidos na fase adulta. Esta modificação induziu a diferenciação ductal, mas sem a presença de mutação no *K-ras*. Posteriormente, foi desenvolvido um elastase-TGF- $\alpha$  com p53 mutante, em que ocorreram outras alterações seqüenciais em genes supressores de tumores, como p16 e o Smad4, a semelhança do pâncreas humano. (68-72)

O mais promissor de todos os modelos é o que resulta do cruzamento de duas linhagens, uma com o gene promotor Pdx1 e outra com o recombinante Cre no locus Ptf-p48, na qual é inserida um alelo de *K-ras* mutante no códon 12. O camundongo KrasG12D,

pré-ativado no seu crescimento, apresenta hiperplasia nodular a partir de 2 semanas. Estas alterações evoluem para neoplasias intra-epiteliais pancreáticas (NIPan) e em dois camundongos (aos 6 e 8 meses) neoplasia ductal invasiva, com metástase para fígado e pulmão. (73,74)

### **Modelos experimentais com carcinógenos químicos**

Estima-se que 70% dos tumores humanos são induzidos por carcinógenos químicos. (68)

#### ***Azaserina***

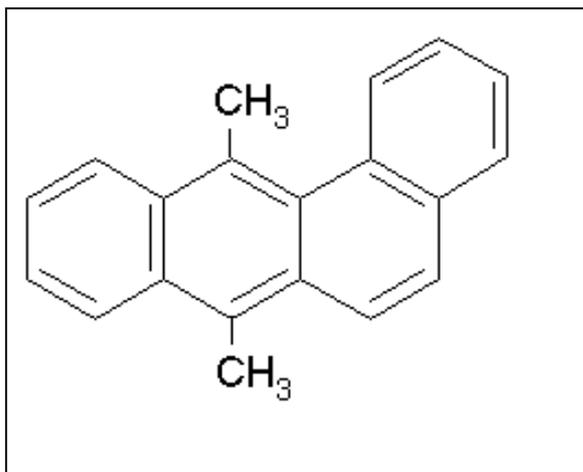
A azaserina é um antimetabólito que induz dano e inibe a síntese do DNA no pâncreas, também no rim, mama e pele. A indução é feita em ratos através de injeção intraperitoneal de 150-260 mg/kg de azaserina, divididas em doses semanais. A partir de dois meses, após o início do tratamento já existe a formação de nódulos de células acinares. Após quinze meses a incidência de carcinomas foi de 58% em machos e 17% em fêmeas. A maioria das neoplasias induzidas foi do tipo acinar com alguns casos ductulares, císticos e indiferenciados. As metástases são infreqüentes. O estudo molecular revelou ausência de mutações no *K-ras* e de expressão do EGF (fator de crescimento epitelial), HER-2/neu e TGF- $\alpha$ . A cultura e implante das células no subcutâneo de ratos adquirem um fenótipo ductal. A implantação intrapancreática de pequenos fragmentos desta segunda linhagem de células induz à formação de carcinomas ductais, em 16 semanas, em 100% dos animais. (70,72,75,76)

### ***N-nitroso-bis(2-oxopropyl)amine (BOP)***

Vários tipos de nitrosaminas e compostos afins já foram estudados na carcinogênese pancreática, mas o que possui maior afinidade é o BOP. Entretanto, pode produzir tumores no fígado, vesícula biliar, pulmões e rins. A carcinogênese é induzida pela injeção subcutânea de BOP, na dose de 10 mg/kg por 16 semanas. Os animais são sacrificados após 32 semanas. Clinicamente, desenvolvem icterícia e caquexia. A maioria dos tumores é de adenocarcinomas com ocorrência em 80 a 100% dos animais, apresentando invasão perineural e desmoplasia. No plano molecular apresentam mutações do *K-ras* no códon 12 e 13, p53 no códon 197 e p16. Na histogênese dos tumores, apesar da existência de neoplasias ductais e ductulares, a maioria é derivado das células das ilhotas de Langerhans. (68-70,72,77)

### ***DMBA***

O 9,10-dimetil-1,2-benzantraceno ou 7,12-dimetilbenzantraceno (DMBA) é um hidrocarboneto policíclico aromático (figura 2), produzido pela combustão incompleta de compostos orgânicos de carbono. Pode ser encontrado como subproduto da queima do tabaco e de combustíveis fósseis, no ar poluído, na água e nos alimentos contaminados por resíduos da combustão do petróleo. Experimentalmente, é teratogênico e mutagênico em animais, produzindo neoplasias de pele, na cavidade oral, pulmões, mama e pâncreas. (78)



**Figura 2. Estrutura molecular plana do DMBA.**

O primeiro experimento foi conduzido por Dissin et al, que implantou, por meio de incisão e sutura em bolsa, 2-3 mg de DMBA, na região cefálica do pâncreas em 36 ratos machos Sprague-Dawley (27 do grupo DMBA e 9 controles). Os animais foram mortos no período de 119-363 dias, quando estavam moribundos ou apresentavam massa abdominal palpável. Houve 3 mortes pós-operatórias imediatas e duas por infecção por mycoplasma. Histologicamente, 2 animais apresentaram reação por corpo estranho, 1 adenoma, 2 hiperplasias, 3 sarcomas de células fusiformes e 14 (63,3%) adenocarcinomas bem diferenciados. (7) Resultados semelhantes foram descritos por Satake et al no mesmo ano. (79) Este mesmo autor comparou as características indutoras e histopatológicas das neoplasias, induzidas pelo BOP em Hamsters ou por DMBA em ratos, concluindo que ambas são equivalentes (80). Rivera et al (8) avaliaram a eficácia da implantação parenquimatosa e da injeção intraductal do DMBA, associadas ou não a pancreatectomia subtotal. Os resultados foram os seguintes: normal (22%), hiperplasia (39%), displasia de baixo grau (8%), displasia de alto grau (10%), adenocarcinoma ductal (39%) e metástases peritoniais (6%). A associação de pancreatectomia não aumentou a frequência das lesões.

Os outros carcinógenos estudados neste experimento, a metilnitronitrosoguanidina e etilnitronitrosoguanidina não desenvolveram carcinomas invasores.

Uma grande questão é sobre qual a origem das células ductais neste modelo: se os tumores se originam nos ductos, invadindo os lóbulos e células acinares ou se o fenótipo ductal é consequência da transdiferenciação de células acinares em ductais. Bockman et al (1976) analisaram, por microscopia eletrônica, as organelas citoplasmáticas nos adenocarcinomas ductais, induzidos pelo DMBA. Os resultados demonstraram a presença aumentada de retículo endoplasmático rugoso, característica comum às células acinares. (81) O mesmo resultado foi encontrado quanto à origem dos complexos tubulares (arranjos de estruturas ductais, presentes na circunvizinhança do sítio de implantação do DMBA), quando estudada pelo mesmo autor. A explicação para o arranjo estrutural ductal foi a diminuição dos complexos de Golgi no citoplasma (82). Em 1999, Jimenez et al avaliaram as lesões induzidas pela implantação do DMBA, ao final de 2 semanas, de 1 mês e de 9 meses quanto à presença de queratina e citoqueratina 19 e 20 (marcadores de células ductais), quimotripsina (marcador para células acinares) e de ilhotas (cromogranina A), comparando-os com amostras de adenocarcinomas humanos. O resultado foi que os complexos tubulares e adenocarcinomas em ratos apresentaram expressão forte de queratinas e citoqueratinas 19 e 20, nenhuma expressão de quimotripsina e expressão rara de cromogranina A. Os carcinomas humanos apresentaram expressão forte de queratina e citoqueratina 19, expressão de citoqueratina 20 em 15 a 20% das células, ausência de quimotripsina e cromogranina A. Com base nestes dados, a conclusão foi de que a célula precursora é ductal (83). Para reforçar o seu posicionamento anterior, Bockman e colaboradores, (84) implantaram o DMBA e avaliaram as alterações histopatológicas locais em 24 horas, 48 horas e 4 dias; 1 e 2 semanas e 1, 3 e 4 meses após. Os resultados foram os seguintes: em 24 horas a arquitetura lobular se mantém intacta, mas com

separação dos ácinos por edema, infiltrado inflamatório agudo e morte celular por necrose e apoptose; em 48 horas, são vistos lúmens em ácinos cujas células se coram por quimotripsina; em 4 dias, as células dos complexos tubulares já bem formados se coram quase exclusivamente pela citoqueratina. Em 2 semanas, as células dos complexos tubulares tornam-se alongadas, com figuras mitóticas. Os ductos dos complexos tubulares se unem, formando ductos com lúmen maior e com projeção de papilas no seu interior. A dupla coloração utilizada (citoqueratinas e quimotripsina) continua positiva para as duas características em algumas células, demonstrando que o processo de transformação das células acinares para ductais está ativo. Em 1 mês há ocorrência dos primeiros carcinomas. Em 4 meses, a prevalência de carcinomas foi de 70%. Os autores concluem que os complexos tubulares são precursores dos adenocarcinomas e que se originam por transdiferenciação das células acinares.

Satake et al, descreveram o desenvolvimento de adenocarcinoma em 50% dos ratos Sprague-Dawley machos, verificando a presença de 43,7% de receptores estrogênicos nos tumores. (85)

Sperti investigou o papel da colecistoquinina (CCK), através de seu análogo, a ceruleína, e o antagonista do seu receptor, o lorglumide (CR-1409) no modelo do DMBA. A ceruleína aumentou a incidência de tumores e o bloqueador do seu receptor diminuiu esta frequência. A conclusão dos autores é de que a CCK influencia no crescimento do ADP. (86)

Z'Graggen et al avaliaram o papel da dieta hiperlipídica e hiperprotéica (HL/HP), na gênese do adenocarcinoma ductal induzido por DMBA. (87) A prevalência de adenocarcinoma, ao final de 9 meses foi 17% no grupo de dieta normal e de 29% no grupo de dieta HL/HP. No mesmo experimento, a mensuração da expressão do *K-ras* códon 12 mutante foi proporcionalmente aumentando, conforme o grau de alteração patológica:

pâncreas normal (0%), hiperplasia ductal (21%), displasia ou carcinoma *in situ* (50%) e adenocarcinoma invasivo (91%). Não houve alterações no *H-ras*. Este estudo corrobora a que a indução química da carcinogênese pancreática, pelo modelo da DMBA, provoca alterações no *K-ras* como no ADP humano.

Zehnder et al, adaptaram o modelo do DMBA para uso em camundongos. Os resultados foram a diminuição do tempo de indução da carcinogênese para apenas 60 dias com prevalência de 72% de displasia/adenocarcinoma. Este trabalho foi apresentado oralmente, no Congresso da IHPBA (International Hepato Pancreato Biliary Association), em Brisbane, Austrália, no ano de 2000, disponível somente em forma de resumo. (9)

Conforme a literatura revista, o rato e o hamster têm sido os animais mais utilizados para indução química da carcinogênese pancreática. Nosso objetivo é aplicar em camundongos a experiência acumulada com a indução de câncer com DMBA em ratos, contribuindo para consolidação de um modelo experimental, com tempo de indução e custos de manutenção menores. Também, o de avaliar se a nomenclatura das neoplasias intra-epiteliais pancreáticas (NIPans) é adequada para descrever as lesões pré-neoplásicas encontradas.

## MÉTODOS

### MODELO EXPERIMENTAL

#### Animais e alojamento

Os animais de experimentação utilizados foram 90 camundongos da espécie *Mus musculus*, cepa CF1, machos, adultos (aproximadamente 60 dias de vida e peso maior do que 30 g), provenientes do biotério da Seção de Experimentação Animal (SEA) da Divisão de Produção e Experimentação Animal (DPEA) da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEEPS). Foram alojados no Centro de Pesquisas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre sob as seguintes condições: ciclo claro-escuro de 12 horas, à temperatura entre 18 e 23°C, umidade de 40 e 70%, em gaiolas plásticas em grupos de, no máximo, seis animais. A ração utilizada foi Nuvital CR® (registro no Ministério da Agricultura e Reforma Agrária nº 4453-00103) e a água fornecida pelo Departamento Municipal de Água e Esgotos de Porto Alegre, ambas à vontade. As especificações técnicas para cuidado dos animais estão de acordo com as previstas no Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. (88) Antes de serem submetidos à experimentação cumpriram um período de 7 dias de quarentena.

Trinta animais foram utilizados em projeto piloto, para definição da técnica cirúrgica e anestésica.

Os animais foram divididos em três grupos, conforme o tempo pós-operatório até a eutanásia: 30, 60 e 90 dias. Como houve um incremento do número de mortes, a partir de

40º dia pós-operatório, os animais do grupo de 90 dias foram re-allocados para o grupo de 60 dias.

### **Preparação do DMBA**

O aparelho injetor do DMBA (7,12-dimetilbenzantraceno, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA; anexo) foi preparado a partir de uma cânula de punção venosa (abocath) nº 14, cortando-se 2 mm da extremidade metálica, preenchendo-a com cola formando um êmbolo. Este dispositivo foi calibrado de forma a conter 1 mg de grânulos de DMBA no seu interior.

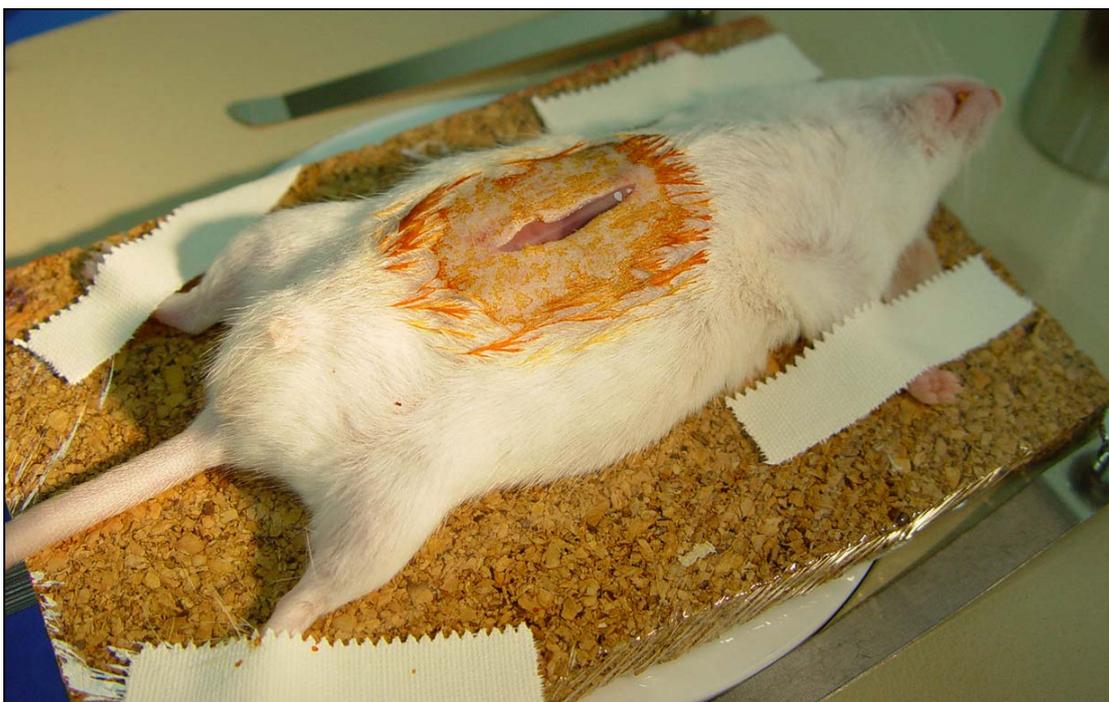
### **Anestesia**

A técnica anestésica foi a seguinte: pré-medicação com Atropina na dose 0,04 mg/kg subcutânea e 10 minutos após anestesia com Quetamina 50 mg/kg, juntamente com Xilazina 20 mg/kg intraperitoneal. (89,90) O jejum observado foi de 6 horas.

### **Técnica Cirúrgica**

Anestesiados, os animais são fixados a uma placa de cortiça plastificada com fitas adesivas nas extremidades dos membros e realizada tricotomia abdominal, seguida de laparotomia mediana (comprimento aproximado de 2,5 cm) com início no apêndice xifóide (figura 3). A dissecação inicia com exposição do pâncreas após separação delicada do duodeno e do cólon. Nesta etapa, um sangramento dos vasos de um dos órgãos acima é de difícil controle. Esta manobra expõe o parênquima pancreático desde a porção cefálica até o corpo e cauda (figura 4). Após, faz-se uma sutura em bolsa na cabeça e corpo pancreático, com fio de polipropileno 7-0 (B-BRAUN©). A bolsa deve ter o tamanho

necessário para abrigar todo o conteúdo a ser aplicado e não incluir o duodeno. Os pontos são aplicados de forma superficial, para que não haja sangramento de vasos mesentéricos e nem oclusão do ducto biliar (figura 5). No interior desta bolsa injeta-se 1 mg de DMBA (figura 6). Fecha-se a sutura em bolsa, retira-se o aparelho injetor, fecha-se o nó da sutura e corta-se o excesso do fio. Revisa-se o local da bolsa, retirando-se algum eventual excesso de DMBA (figura 7). A contaminação da cavidade abdominal por cristais de DMBA deve ser evitada, porque causa peritonite química grave, com morte dos animais. A sutura da laparotomia é feita com pontos em X, separados, em plano único de parede abdominal e pele. (8,9,87) A cirurgia é realizada com auxílio de microscópio cirúrgico, com aumento de 2,5 a 10 vezes.



**Figura 3. Camundongo anestesiado fixado à placa de cortiça. Laparotomia mediana.**



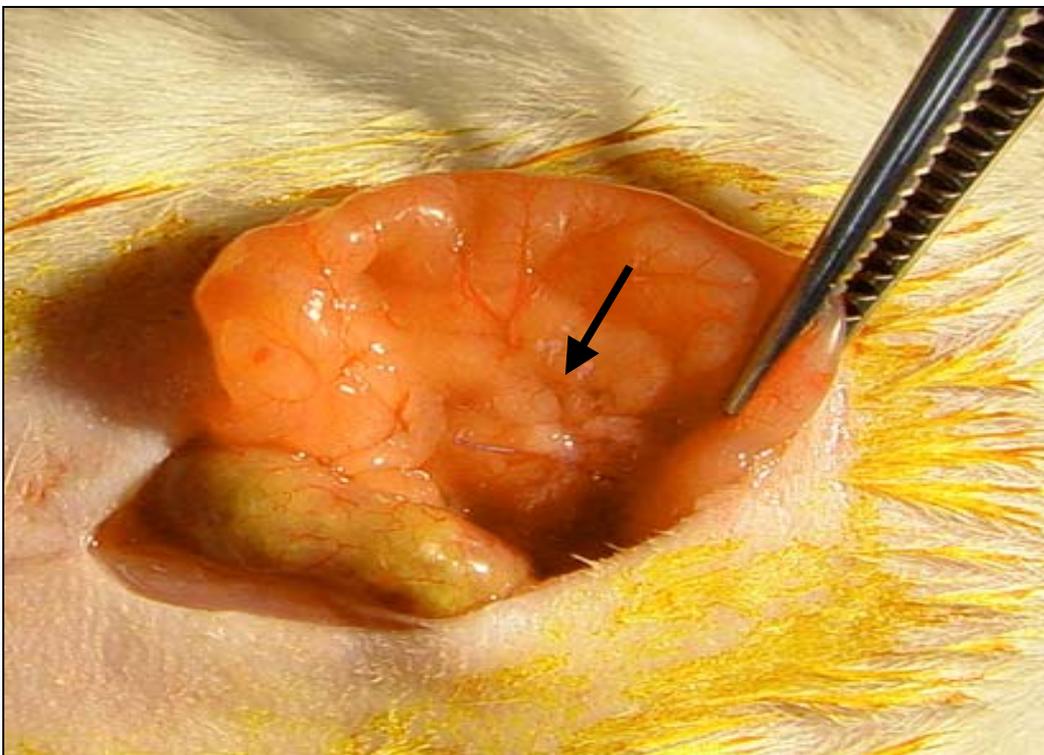
**Figura 4. Exposição do pâncreas após separação do duodeno e do cólon.**



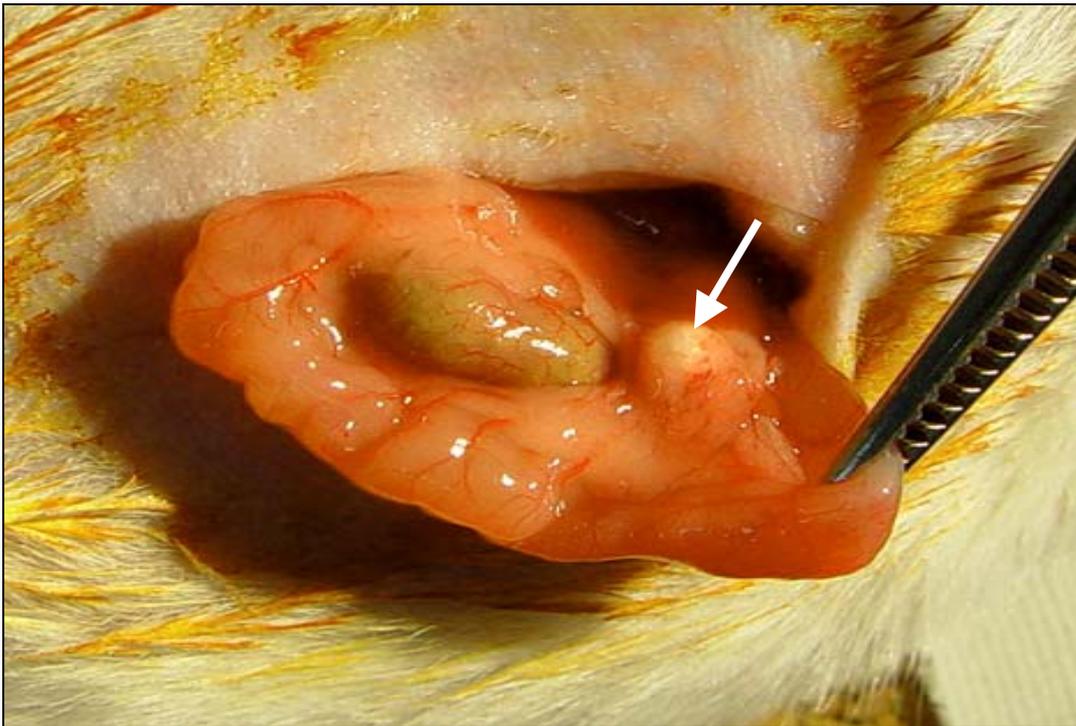
**Figura 5. Sutura em bolsa no pâncreas (área tracejada).**



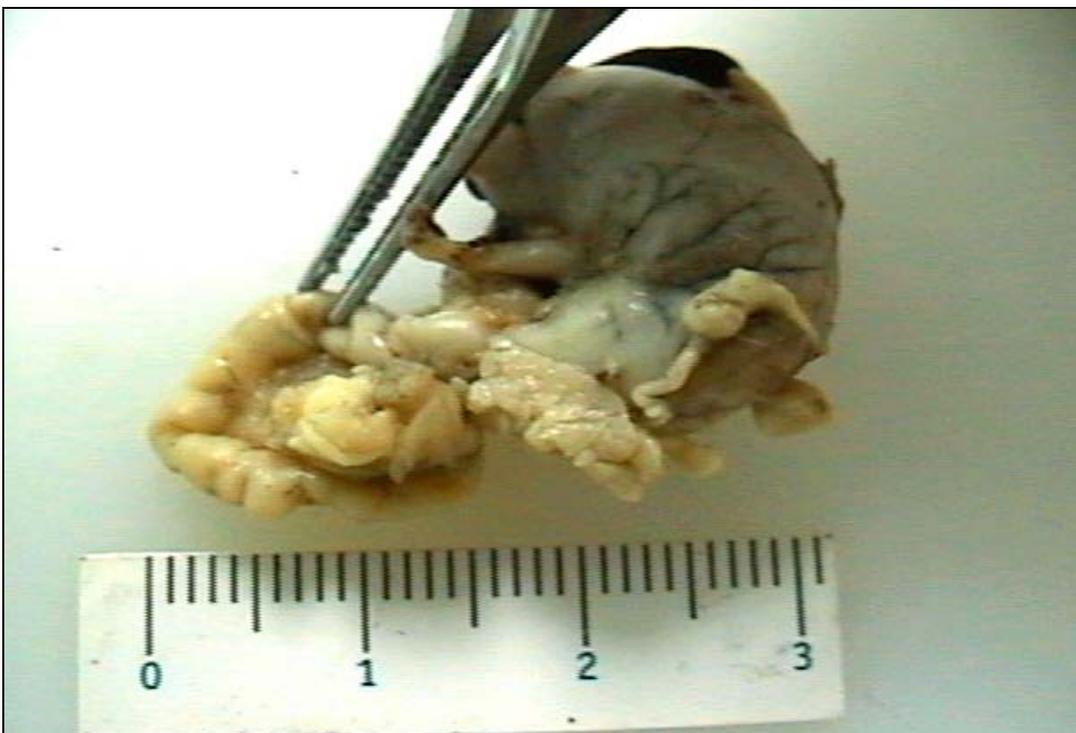
**Figura 6. Fechamento do nó da sutura com aplicador no interior da bolsa.**



**Figura 7. Visão anterior do pâncreas após fechamento da sutura da bolsa (seta).**



**Figura 8. Visão posterior do pâncreas com o DMBA implantado (seta).**



**Figura 9. Peça, após fixação em formalina, com tumor pancreático.**

### **Morte dos animais**

Os animais foram mortos 30 e 60 dias após o procedimento por exposição, em ciclo de 20 minutos, em câmara fechada de CO<sub>2</sub>. (88) Os animais que morreram antes do período estabelecido foram submetidos à necrópsia.

### **ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA**

Os espécimes histopatológicos foram obtidos por incisão toracoabdominal com retirada de fígado, vias biliares, pâncreas e duodeno em bloco. As peças foram fixadas em formalina tamponada a 10% durante 3 dias. Após foi realizada macroscopia (figura 9) e dissecação das peças, incluindo-se em parafina somente o pâncreas, seccionado em três partes iguais. Cada parte sofreu corte micrométrico, a partir dos quais foram confeccionadas lâminas coradas por hematoxilina-eosina (H&E).

Os três cortes foram analisados, observando-se os seguintes parâmetros: o diagnóstico histológico, o tipo de alterações inflamatórias, a presença de complexos tubulares e a presença de cristais de DMBA no seu interior. Quando necessário, foram realizados novos cortes de aprofundamento.

A avaliação foi realizada por dois patologistas com desconhecimento o grupo a que os animais pertenciam (cegos). Após a primeira avaliação foi realizada uma reunião de consenso entre os mesmos.

### **CRITÉRIOS DOS DIAGNÓSTICOS HISTOLÓGICOS**

Os diagnósticos histológicos foram baseados nos seguintes critérios (10,91):

**Epitélio ductal ou ductular normal:** o epitélio cuboidal ou colunar baixo com citoplasma anfófilico e ausência de mucina citoplasmática, hipercromatismo, amoldamento nuclear e atípicas.

**Hiperplasia reacional:** proliferação de células ductais, onde são observadas inúmeras mitoses típicas, presença de neutrófilos que geralmente ocorrem ao redor da zona de implantação do DMBA e dos ductos.

**Complexos Tubulares:** são arranjos de vários ductos com células ductais típicas em substituição às células acinares, localizadas na região parenquimatosa ao redor da bolsa onde foi implantado o DMBA. (84) Nestes locais, estão presentes áreas de atrofia pancreática, com proeminência do estroma fibroso, comparativamente ao glandular atrófico.

**Neoplasia Intra-epitelial Pancreática 1A (NIPan 1A):** lesões planas compostas por células de epitélio colunar alto, com núcleo basal e mucina citoplasmática supranuclear. Os núcleos são pequenos de forma redonda ou ovalada. Quando ovais, seu maior eixo longitudinal é perpendicular à membrana basal dos ductos.

**Neoplasia Intra-epitelial Pancreática 1B (NIPan 1B):** são semelhantes ao NIPan 1A, exceto pelo formato papilar, micropapilar ou de pseudoestratificação basal.

**Neoplasia Intra-epitelial Pancreática 2 (NIPan 2):** estruturalmente são lesões mucinosas que podem ser planas, mas a maioria é papilar. Na avaliação citológica, apresentam núcleos aumentados em tamanho e número, hipercromáticos, com perda da polaridade e de pseudoestratificação. Mitoses são raras e quando presentes são basais.

**Neoplasia Intra-epitelial Pancreática 3 (NIPan 3):** estruturalmente, na sua maioria, são lesões papilares ou micropapilares, raramente, planas. São cribiformes e o desprendimento de grupos de células (decapitação) ou necrose intraluminal sugere o

diagnóstico de NIPan 3. A citologia dessas lesões apresenta perda da polaridade dos núcleos, células calciformes distróficas (células calciformes com núcleos orientados para a porção apical, luminal da célula e a mucina citoplasmática predominante na membrana basal), mitoses anormais, irregularidades nucleares e nucléolos proeminentes (macronúcleolos). A arquitetura citonuclear é semelhante ao carcinoma, sem invasão à camada basal. O sinônimo para esta alteração é o carcinoma *in situ*. (10,53,92) Algumas vezes podem adotar um padrão cribriforme.

**Carcinoma invasor:** glândulas pequenas, com irregularidade de contorno, uma camada de células associadas com desmoplasia periductal e estromal hialinizada. As características celulares são de pleomorfismo, nucléolos evidentes e diminuição da relação citoplasma/núcleo. Os núcleos são de volume aumentado, com esvaziamento da cromatina e pleomórficos. Alterações glandulares com as características nucleares do NIPan 3, acrescidas de extensão irregular com infiltração glandular neoplásica da camada basal, circundada por estroma desmoplásico. (91)

Quando o foco de invasão era mínimo e muito próximo ao epitélio ductal atípico, ou não apresentava espaço preenchido por estroma desmoplásico, a neoplasia era considerada microinvasora, subtraindo-se os casos onde se considerou artefato de corte (tangenciamento de lesões intraductais).

Na presença de mais de uma alteração patológica, foi considerada a alteração mais grave.

**Alterações Inflamatórias:** as propriedades histopatológicas da pancreatite aguda avaliadas foram: a reação inflamatória aguda com predomínio de leucócitos polimorfonucleares, edema intersticial e focos de hemorragia intersticial. A pancreatite crônica foi caracterizada por fibrose irregular, ácinos reduzidos em número e em tamanho e obstrução com dilatação dos ductos pancreáticos e predomínio de linfócitos. Quando as

alterações inflamatórias ficaram restritas às proximidades da bolsa, foram consideradas como pancreatite dependente da bolsa.

## **ÉTICA**

O protocolo de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre sob nº 01-320.

## **ANÁLISE ESTATÍSTICA**

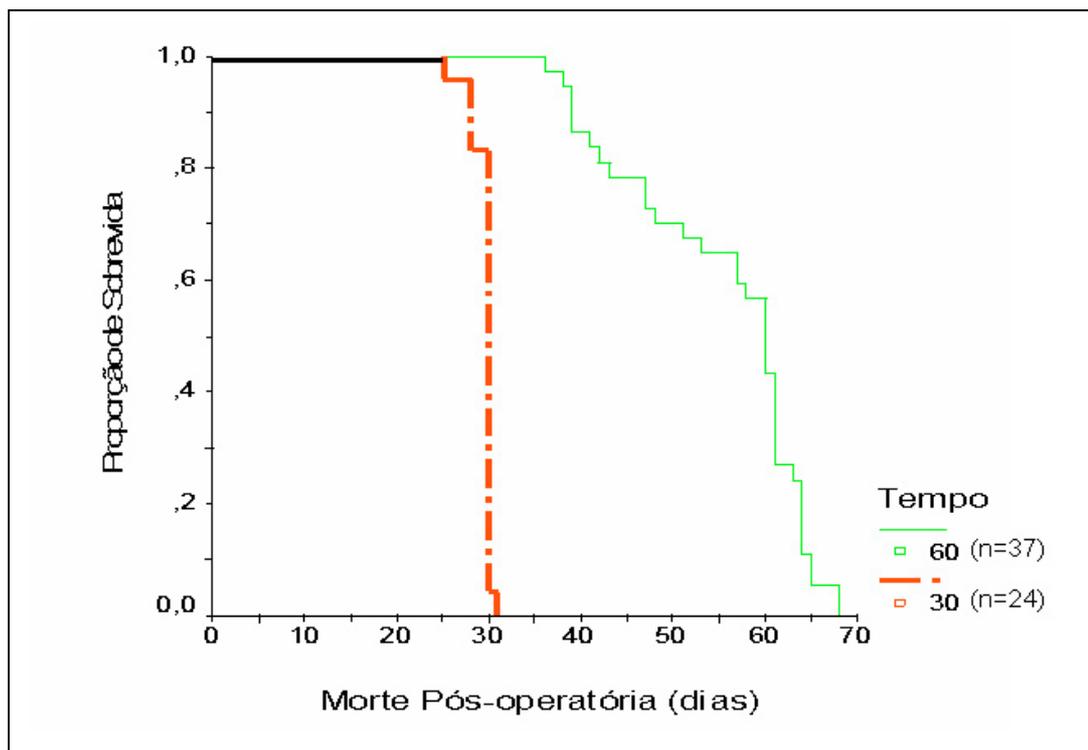
Os dados foram inicialmente descritos com frequências e percentuais. Foram obtidas tabelas de contingência em que foram comparados os grupos de 30 e 60 dias. A significância das comparações foi obtida pelo teste de qui-quadrado e pelo teste exato de Fisher. Também foram calculadas curvas de Kaplan-Meier com significância pelo teste de Log Rank. (93) O nível de significância adotado foi de  $\alpha=0,05$ . Os dados foram analisados com o auxílio do Programa SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) versão 11.0.

## RESULTADOS

Do total de 90 animais operados, 20 (22,22%) morreram num período de 1 a 19 dias, com as seguintes complicações pós-operatórias: peritonite (n=4), evisceração (n=3), necrose do cólon (n=2), abscesso pancreático (n=2), indeterminada (n=2), ascite quilosa (n=2), anestesia (n=1), hemoperitônio (n=1), ascite (n=1), pancreatite hemorrágica (n=1) e canibalismo (n=1). Esses espécimes não puderam ser utilizados para análise patológica.

Dos 70 animais restantes para a análise histológica, 9 peças (12,9%), 1 no grupo 30 dias e 8 no de 60 dias, tiveram sua avaliação prejudicada devido à autólise do material, no quesito diagnóstico histológico. Assim, o total de perdas foi de 29 (32,22%) animais, 6 (20%) pertenciam ao grupo de 30 dias e 23 (38,3%) ao de 60 dias ( $P=0,062$ ; teste exato de Fisher).

O número de animais que sobreviveram até o tempo determinado para fim do experimento foi de 20 (83,3%)/24 animais, em 30 dias e de 21(56,7%)/37 no grupo de 60 dias. A mediana do tempo de sobrevivência foi de 30 dias e de 60 dias, respectivamente. ( $P < 0,001$ ; teste de Log Rank), conforme curva de sobrevida na figura 10.



**Figura 10. Curva de Kaplan-Meier com a proporção de sobrevivência para os grupos de 30 e 60 dias em animais submetidos à implantação pancreática de DMBA.**

A análise macroscópica das peças apresentava grande aderência às estruturas adjacentes e massa na zona de implantação do DMBA conforme a figura 9.

Os resultados da avaliação histopatológica estão dispostos na tabela 1 e na figura 11. Para efeito de análise estatística, foram agrupados os dados das lesões intra-epiteliais e dos carcinomas em cada grupo, formando uma tabela de contingência 3 X 3 (tabela 2). Foi observada uma maior ocorrência de neoplasias intra-epiteliais (NIPan) no grupo de 30 dias (16 casos; 67%), quando comparado com grupo de 60 dias (13 casos; 35%). Por outro lado, a ocorrência de carcinoma foi maior aos 60 dias (14 casos; 38%) Todos os carcinomas foram bem (n=5) ou moderadamente (n=13) diferenciados. As fotomicrografias representativas do modelo experimental, incluindo o pâncreas normal, as neoplasias intra-epiteliais pancreáticas e os carcinomas podem ser vistas nas figuras de 12 a 20.

Tabela 1. Diagnóstico histológico conforme o tempo de exposição ao DMBA.

Diagnóstico	Tempo (dias)		Total n (%)
	30	60	
Hiperplasia Reacional	4	10	14 (23)
NIPan 1A	1	0	1 (1,6)
NIPan 1B	4	6	10 (16,4)
NIPan 2	8	7	15 (24,6)
NIPan 3	3	0	3 (4,9)
Carcinoma Microinvasor	0	3	3 (4,9)
Carcinoma Invasor	4	11	15 (24,6)
<b>Total</b>	<b>24</b>	<b>37</b>	<b>61 (100)</b>

NIPan = Neoplasia Intra-epitelial Pancreática

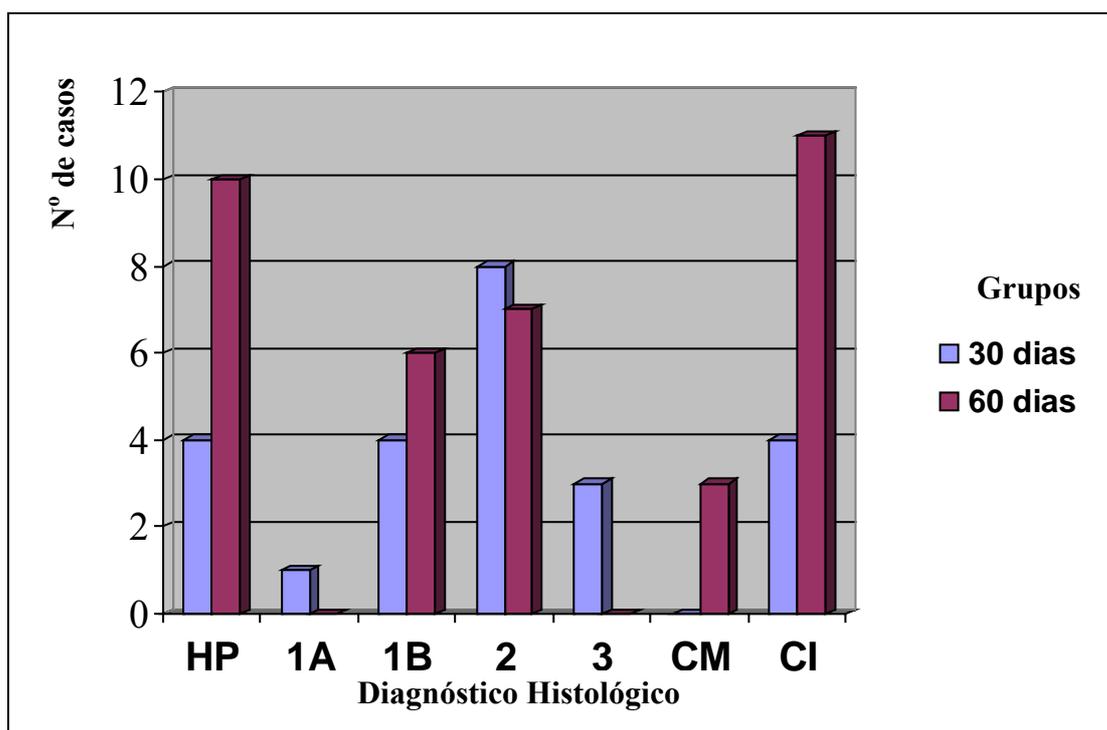


Figura 11. Gráfico dos diagnósticos histológicos em 30 e 60 dias. HP (hiperplasia reacional), NIPan (Neoplasia Intra-epitelial Pancreática) 1A, 1B, 2 e 3, CM (carcinoma microinvasor) e CI (carcinoma invasor).

**Tabela 2. Diagnóstico histológico agrupado conforme o tempo de exposição ao DMBA.**

Diagnóstico	Tempo (dias)		Total n (%)
	30 (%)	60 (%)	
Hiperplasia Reacional	4 (16,7)	10 (27,1)	14 (23,0)
NIPan *	16 (66,6)	13 (35,1)	29 (47,5)
Carcinoma *	4 (16,7)	14 (37,8)	18 (29,5)
<b>Total</b>	24 (100)	37 (100)	61 (100)

\* P < 0,05 – teste exato de Fisher

Quanto ao tipo de alteração inflamatória presente nos cortes examinados, houve predomínio de pancreatite aguda no grupo de 30 dias e de alterações crônicas do tipo pancreatite crônica e fibrose, no grupo de 60 dias (P<0,001). A pancreatite dependente da bolsa só foi verificada no grupo de 30 dias em 8 casos, conforme tabela 3.

**Tabela 3. Alterações inflamatórias pancreáticas nos grupos de 30 e 60 dias em animais submetidos à implantação de DMBA.**

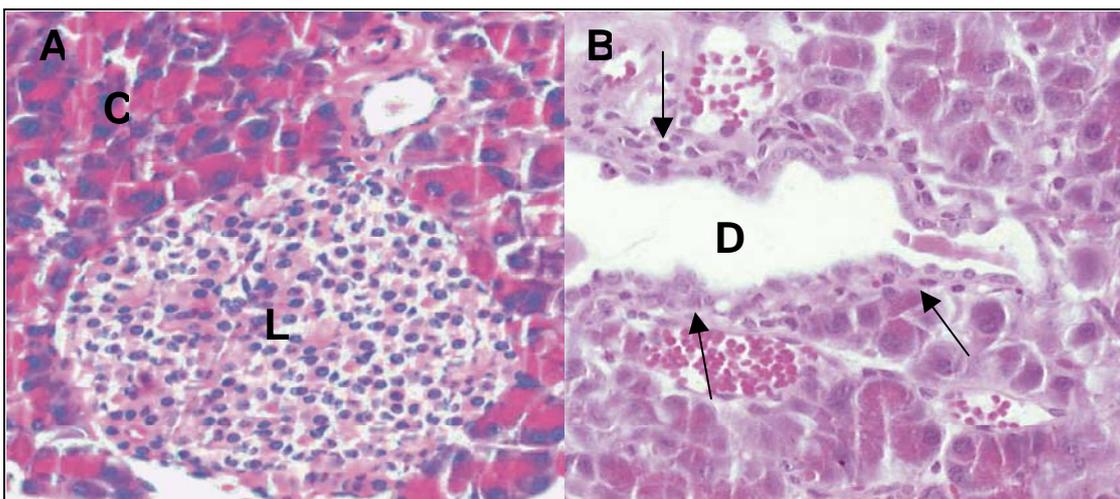
Alterações Inflamatórias	Tempo (dias)		Total n (%)
	30 (%)	60 (%)	
Pancreatite Aguda	11 (45,8)	11 (29,7)	22 (36,1)
Pancreatite Crônica	5 (20,8)	26 (70,3)	31 (50,8)
Dependente da Bolsa	8 (33,3)	0	8 (13,1)
<b>Total</b>	24 (100)	37 (100)	61 (100)

$\chi^2$  20,381 P < 0,001

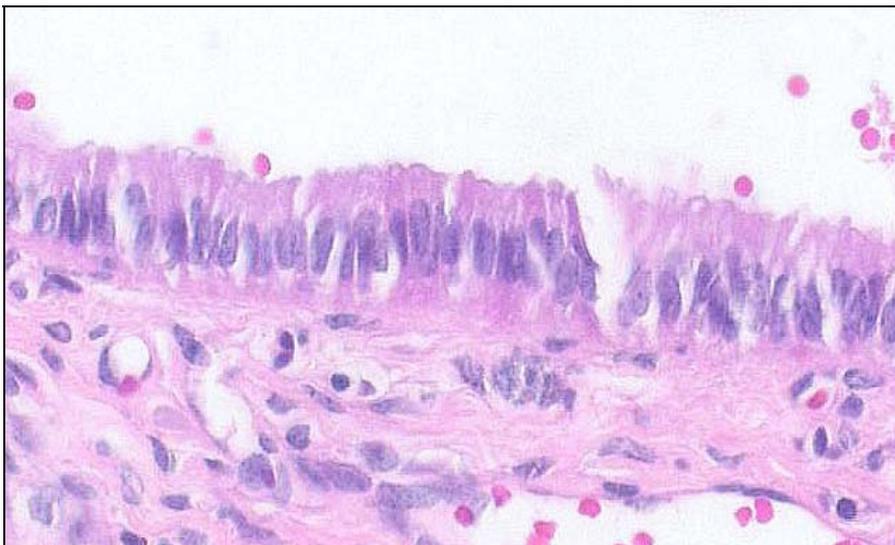
A bolsa, realizada na cirurgia para conter o DMBA, não foi visualizada em 10 cortes analisados (1 no grupo de 30 dias e 9 no grupo de 60 dias –  $P = 0,073$ ; teste exato de Fisher). O conteúdo da bolsa (cristais de DMBA – figura 18) não foi encontrado em 3 cortes no grupo de 30 dias e 17 no de 60 dias ( $P = 0,004$ ; teste exato de Fisher).

Apenas em dois cortes examinados, no grupo de 60 dias, não foi verificada presença de complexos tubulares ( $P = 0,515$ ; teste exato de Fisher), ver a figura 19.

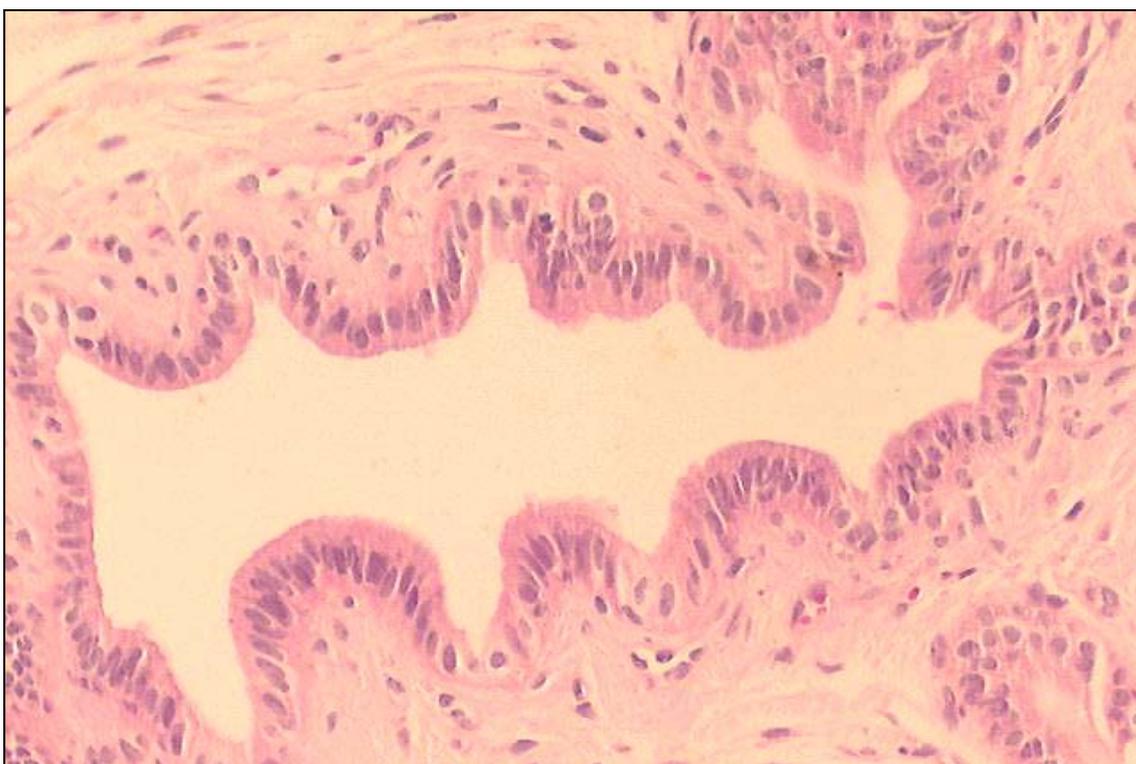
Em alguns cortes examinados foram visualizados processos de transdiferenciação de células acinares em células ductais (figura 20).



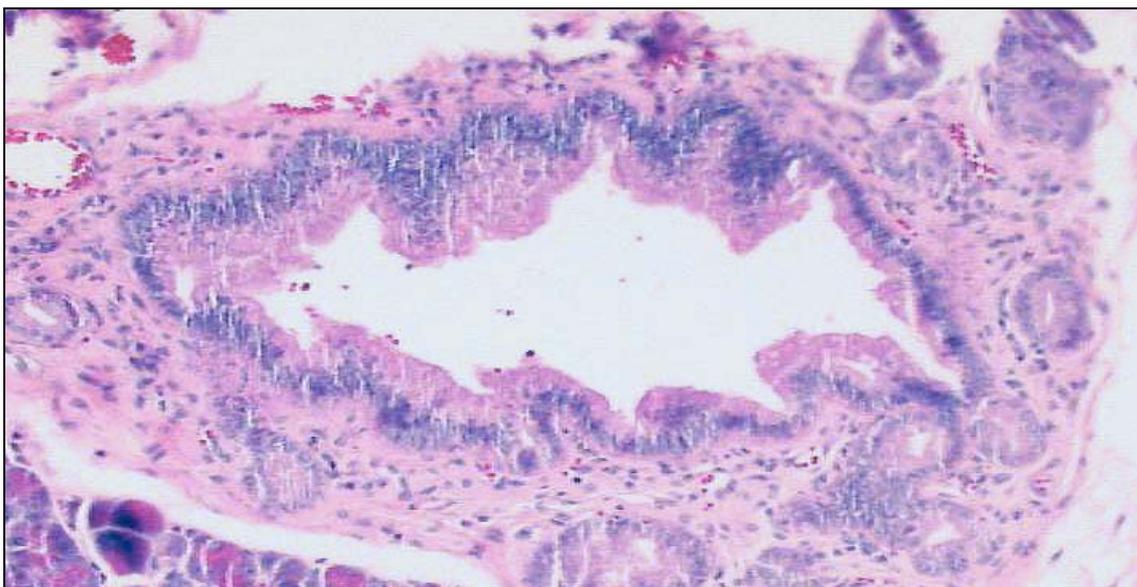
**Figura 12. Pâncreas normal. Em A, (C) células acinares, (L) ilhota de Langerhans e em B, (D) ducto centro-acinar (setas). Coloração com H&E. Aumento de 20 vezes no original.**



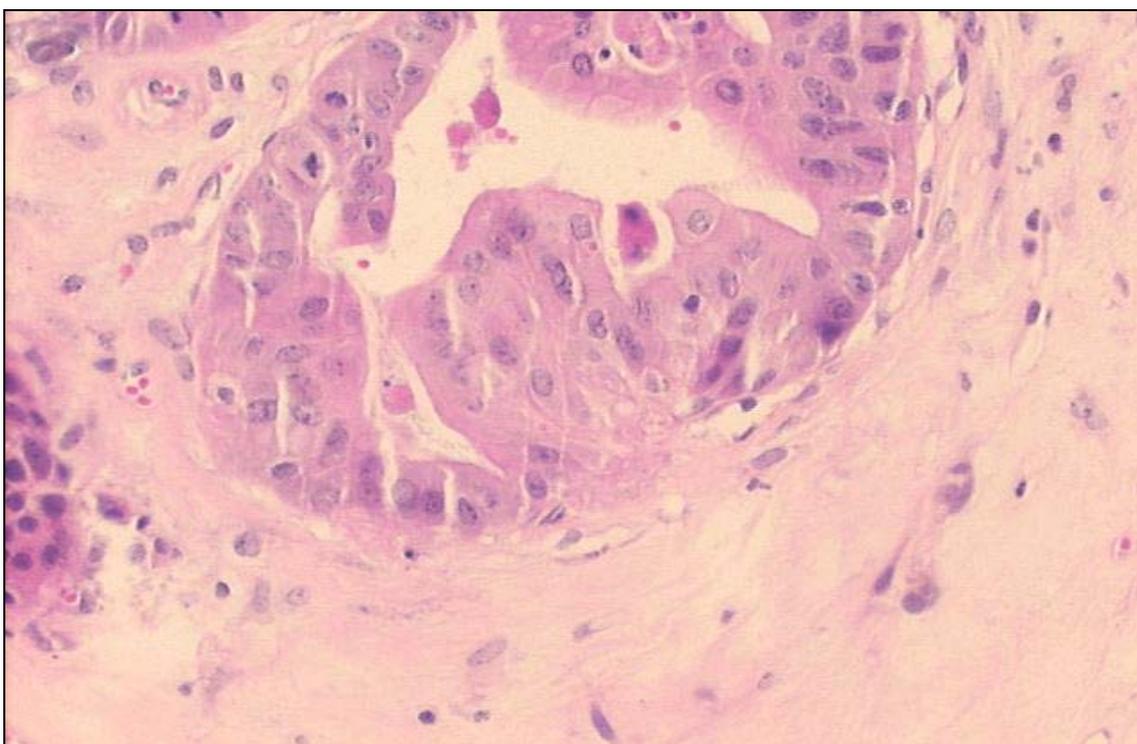
**Figura 13. NIPan 1A. Células colunares altas com núcleo alongado e basal. Coloração com H&E. Aumento de 40 vezes no original.**



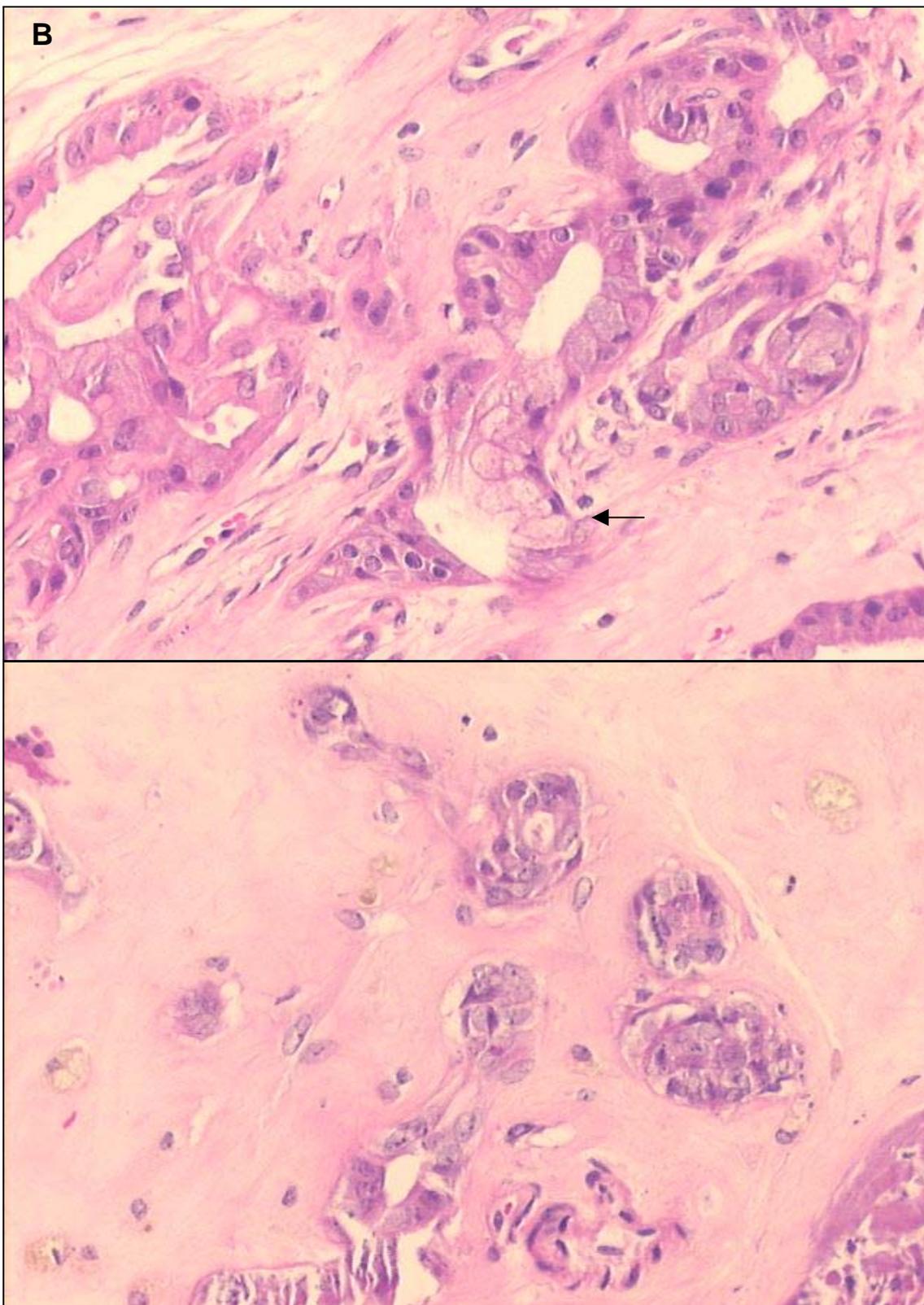
**Figura 14. NIPan 1B. Epitélio colunar com projeções papilares para o interior do ducto. Coloração com H&E. Aumento de 20 vezes no original.**



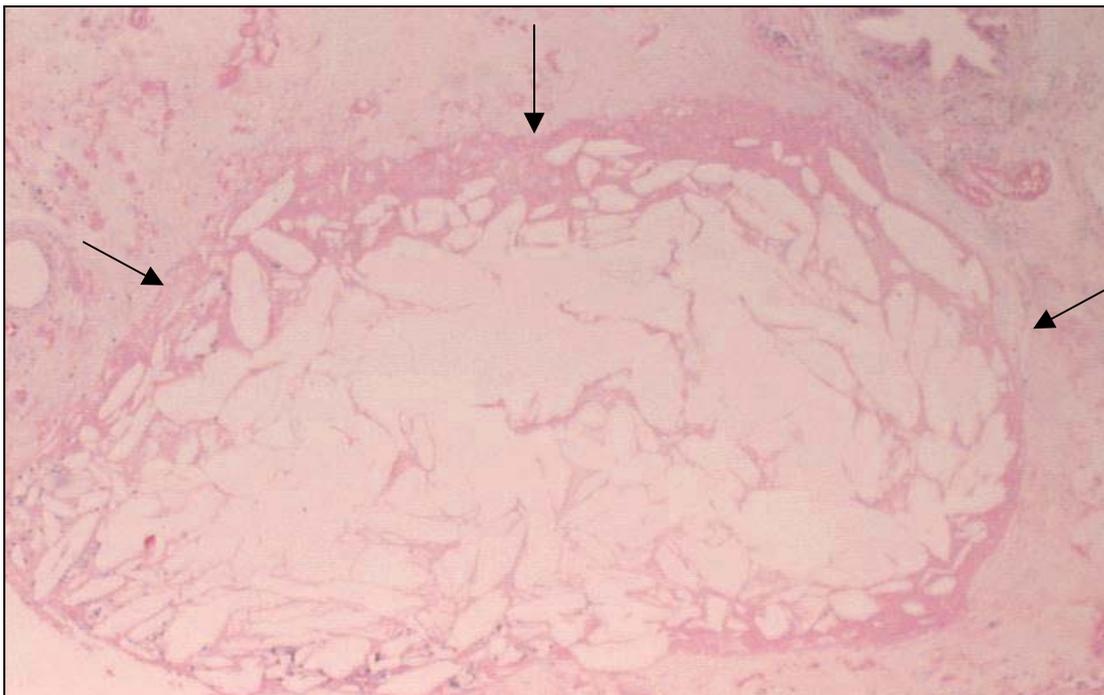
**Figura 15. NIPan 2. Os núcleos estão aumentados em tamanho e número; hiper Cromáticos, com perda da polaridade e pseudoestratificação. Coloração com H&E. Aumento de 10 vezes no original.**



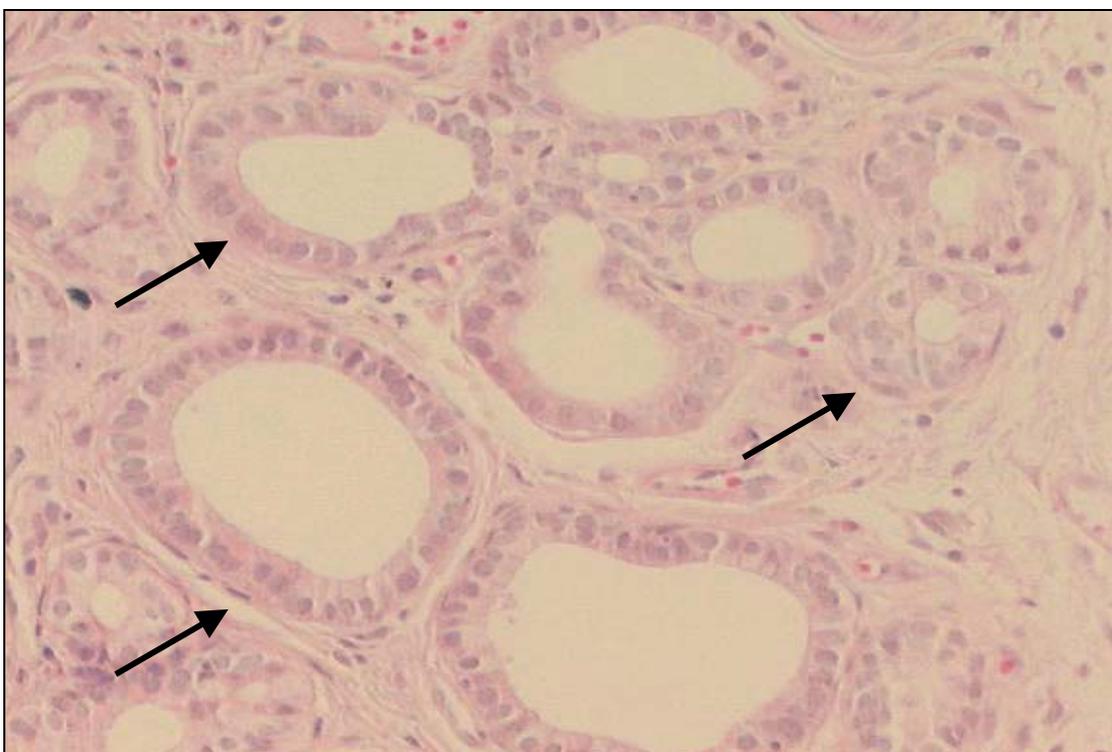
**Figura 16. NIPan 3. Projeção papilar intraductal com núcleos aumentados com nucléolos evidentes. Coloração com H&E. Aumento de 10 vezes no original.**



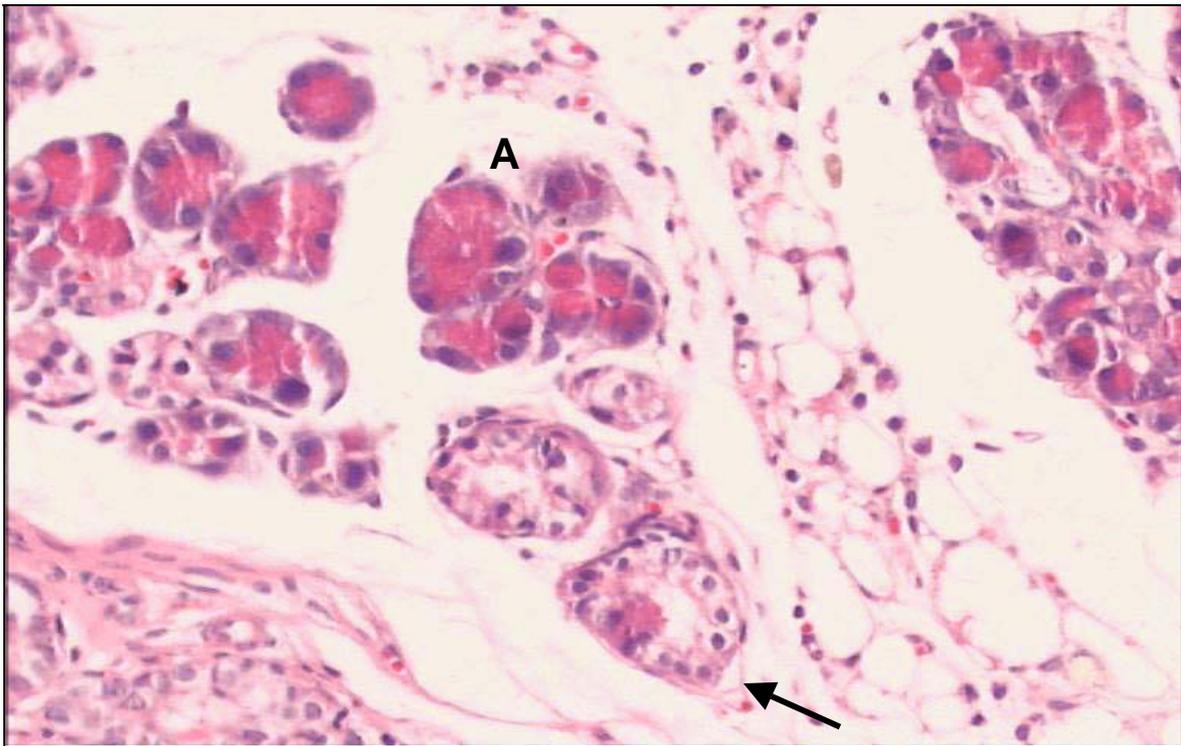
**Figura 17. (A e B) Carcinoma Invasor. (A) Metaplasia mucinosa (seta). Coloração com H&E. Aumento de 20 vezes no original.**



**Figura 18.** Bolsa pancreática (setas) com cristais de DMBA no seu interior. Coloração com H&E. Aumento de 4 vezes no original.



**Figura 19.** Complexos tubulares (setas). Coloração com H&E. Aumento de 20 vezes no original.



**Figura 20. Processo de transdiferenciação. (A) Células acinares e abaixo célula ductal resultante (seta). Coloração com H&E. Aumento de 10 vezes no original.**

## DISCUSSÃO

Este experimento foi desenvolvido para avaliar um modelo de indução de adenocarcinoma ductal pancreático (ADP) em camundongos, opcional ao modelo do 7,12-dimetilbenzantraceno (DMBA) em ratos. Serão discutidos a seguir: a técnica de indução, a perda de animais, o efeito do tempo de indução sobre o desenvolvimento de lesões precursoras e do adenocarcinoma e a reprodução dos resultados, comparando-os com outras casuísticas. Também serão abordadas, a fisiopatologia do DMBA na carcinogênese, as suas inter-relações com as alterações inflamatórias decorrentes, os complexos tubulares e as vantagens da utilização de camundongos neste modelo.

A técnica de indução foi semelhante à descrita por Rivera et al, (8) com adaptações feitas por Zehnder et al (9). A quantidade de DMBA utilizada por Rivera et al foi de 5 mg em ratos de 150 a 200 mg. Zehnder et al utilizaram, em camundongos, 1 mg de DMBA mantendo a proporcionalidade em relação ao peso dos animais. Por isso, foi escolhida para este experimento a dose de 1 mg. A anestesia utilizada nestes estudos previa a inalação de éter e a injeção intraperitoneal de quetamina (40 mg/kg) e de fenobarbital (20 mg/kg). No projeto inicial, o éter foi vetado pela comissão de ética que avaliou o projeto devido ao seu paraefeito de irritação da mucosa respiratória e por ser um agente inflamável e explosivo. No projeto piloto, a primeira tentativa foi a de associar um anestésico dissociativo (tiletamina) e um benzodiazepínico (zolazepan), o Zoletil®. Com esta associação houve uma incidência aumentada de óbitos decorrentes de depressão respiratória. O mesmo ocorreu com o uso do tiopental. A técnica de pré-medicação com atropina seguida de

quetamina e xilazina intraperitoneal propiciou uma analgesia e anestesia adequada para todo o procedimento com paraefeitos desprezíveis e um bom relaxamento muscular.

O projeto experimental previa 3 grupos de 30 animais, com eutanásia programada para 30, 60 e 90 dias após a cirurgia. Como houve um aumento proporcional do número de óbitos, após o 40º dia pós-operatório, os animais do grupo de 90 dias foram re-locados no grupo de 60 dias. Macroscopicamente, as principais causas de mortalidade foram: peritonite, necrose do cólon, abscesso pancreático, ascite e icterícia obstrutiva. A mortalidade encontrada foi decorrente de complicações relacionadas ao grande porte da cirurgia em relação ao tamanho dos animais e do efeito de massa causado pela implantação do DMBA. Assim, um percentual significativo de animais (56,7%) sobreviveu o tempo previsto inicialmente. O grupo controle (sham operation) neste trabalho não foi realizado porque, em experimentos anteriores, nestes grupos não ocorreu neoplasia. (8,9,84) Evitou-se assim, o sacrifício desnecessário de camundongos, respeitando-se a ética que rege a experimentação animal. (94)

O número de perdas no experimento foi de 29 animais (32,2%). Dissin et al (7) relataram uma mortalidade total de (18,5%) com tempo de morte variável. No estudo de Rivera et al, o número de ratos alocados foi definido, pelas próprias palavras do autor, como: “The number of animals ultimately included in each group was affected by the mortality rates encountered; rats were added as needed to assure a sufficient number of long-term survivors to provide meaningful data at the various time points.” (8) A sobrevivência em 10 meses foi de somente 49 (32,7%), em 150 animais em que foi implantado o DMBA, ou seja, a mortalidade antes do período desejado de 67,3%. Z'graggen et al reportaram uma mortalidade tardia entre 39 e 41% e perioperatória de 3 e 5% nos grupos experimentais (87). O único estudo em camundongos de Zehnder et al apresentou mortalidade geral de 17%. (9) Muitos estudos não referiram a mortalidade dos experimentos nem a quantidade

de animais que foram mortos antes do final do experimento. Comparativamente, nosso estudo não apresenta um excesso de mortalidade, como potencial viés de amostragem (tabela 4).

**Tabela 4. Comparação entre os experimentos com indução química por DMBA em ratos e camundongos.**

<b>Autores, ano</b>	<b>Modelo</b>	<b>Perdas</b>	<b>%Neoplasia</b>	<b>% Lesões precursoras</b>	<b>Tempo</b>	<b>Animal</b>
<b>Dissin et al, 1975(7)</b>	DMBA	18,5%	63,3%	Não descritas	4 a 12 meses	Ratos
<b>Rivera, et al.,1997(8)</b>	DMBA	67,3%	39%	Displasia baixo grau 8% Displasia alto grau e Ca <i>in situ</i> 10%	10 meses	Ratos
<b>Zehnder et al, 2000(9)</b>	DMBA	17%	Displasia/adenocarcinoma 30 dias 40% Displasia/adenocarcinoma 60 dias 72%		30 e 60 dias	Camundongos
<b>Z'graggen et al, 2001(87)</b>	DMBA	39%	17%	4%	9 meses	Ratos
	DMBA + Dieta HL/HP*	41%	23%	11%	9 meses	Ratos
<b>Osvoldt</b>	DMBA	32,2%	29,5%	47,5%	30 e 60 dias	Camundongos

\* Dieta hiperlipídica (HL) e hiperprotéica (HP).

O modelo como indutor de neoplasia foi satisfatório, porque apresentou 16 (66,6%) animais com NIPan e 4 (16,7%) carcinomas no grupo de 30 dias (tabela 4). No grupo de 60 dias, o número de NIPan diminuiu para 13 (35,1%), mas o número de carcinomas (14 animais, 37,8%) aumentou proporcionalmente 2,26 vezes. O número menor de lesões precursoras aos 60 dias, provavelmente tem três motivos: o primeiro, a maior progressão das lesões precursoras para carcinoma, devido ao maior tempo de exposição ao carcinógeno; o segundo, as lesões NIPan 1A, 1B e 2 são mais frequentes, isoladamente, ao passo que a NIPan 3 é vista em associação com o carcinoma invasor (95) e o terceiro, a regressão de algumas lesões precursoras para o epitélio normal. Se considerarmos a

mutação do *K-ras*, uma condição indispensável para desenvolvimento de carcinoma, a sua baixa frequência nos NIPan (ao redor de 30%), pode explicar a regressão para o epitélio normal. (96) Este fato também foi verificado por Z'graggen et al onde a prevalência de carcinomas em ratos, submetidos à implantação do DMBA decresceu de 29%, em 30 dias para 17% em 9 meses. (87) Na análise global houve indução de alterações pré-neoplásicas ou neoplásicas, em 77% dos animais, número levemente superior ao encontrado por Zehnder et al que apresentaram entre displasia e adenocarcinoma um percentual de 72%. (9)

A classificação das lesões precursoras de neoplasias intra-epiteliais pancreáticas (10) foi adequada para descrever os achados histopatológicos neste estudo. As classificações prévias, envolvendo hiperplasias papilares e não-papilares, displasia em vários graus e neoplasia, permite uma grande combinação de diagnósticos cujo entendimento não é universal. (10) A unificação da terminologia é importante para comparação de estudos multicêntricos. (92) Outra evidência da utilidade dessa classificação é que há uma correspondência entre as alterações moleculares, descritas para o ADP humano e as alterações histológicas evolutivas das NIPans. Por exemplo, a mutação do *K-ras* está presente em mais de 90% dos adenocarcinomas pancreáticos. A elevada frequência da sua mutação demonstra que esta deva ser uma característica presente, desde os primeiros clones de células neoplásicas. (53,97) A análise do NIPan 1A já demonstra a presença de 30% de células com *K-ras* mutado que vai aumentando em frequência a medida que aumenta a complexidade das lesões precursoras até carcinoma. (44,98) Observação contrária pode ser feita para o p53 mutante que está presente em 50% dos carcinomas e só se expressa a partir do NIPan 3, provavelmente porque é uma alteração mais tardia na carcinogênese e não presente no primeiro clone de células mutadas. (1,47,56)

Para que a carcinogênese induzida pelo DMBA seja um modelo que reproduza fielmente a carcinogênese pancreática humana, há necessidade de estudar a biologia molecular das lesões encontradas. Em ratos, Z'graggen et al encontraram uma prevalência de 21% de mutações do *K-ras* na hiperplasia ductal, 50% quando havia displasia ou carcinoma *in situ* e de 91% nos carcinomas. (87) Em camundongos, o estudo das alterações moleculares é uma futura linha de pesquisa para o aprimoramento deste modelo.

O DMBA e outros hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, induzem a carcinogênese, através de ligações covalentes do DMBA com o DNA tecidual (DNA adducts) produzindo mutações em oncogenes e genes supressores de tumores. (87) A presença continuada do DMBA, em situações de proliferação celular constante aumenta a suscetibilidade tecidual à carcinogênese porque supera a capacidade de reparo do DNA alterado. (28,99) No modelo experimental com DMBA, o estímulo para mutações ocorre porque há o implante do carcinógeno. Secundário a isto e ao trauma cirúrgico, ocorre uma reação inflamatória tecidual (pancreatite). Em humanos, a exposição a um carcinógeno (fumo ou outro qualquer) em pâncreas com inflamação crônica, seria uma explicação para ocorrência aumentada de carcinoma, em pacientes com pancreatite crônica.

O tempo de indução foi determinante para o tipo de alteração inflamatória presente. Proporcionalmente, a pancreatite aguda e a dependente da bolsa predominaram no grupo de 30 dias e a pancreatite crônica preponderou no grupo 60 dias. As lesões inflamatórias conseqüentes à implantação do carcinógeno não prejudicaram a avaliação histológica.

A tendência na literatura é a de considerar os complexos tubulares, induzidos pelo DMBA, como lesões pré-malignas da carcinogênese pancreática. (83,87) Estes complexos localizam-se ao redor da bolsa onde foi implantado o DMBA. Este também foi o sítio onde se originaram as lesões pré-malignas e malignas em nosso estudo. Da mesma forma, o modelo experimental de ligadura do ducto principal em cães e de carcinogênese, induzida

pelo BOP, originaram complexos tubulares. (100,101) No pâncreas humano, estas lesões também têm sido classificadas como metaplasia ductal. Estão presentes, no pâncreas normal, mas com frequência maior na pancreatite crônica e no adenocarcinoma pancreático. (102-104) Apesar destas evidências, não há uma certeza quanto ao potencial de malignização deste arranjo celular no carcinoma pancreático humano.

O fenótipo dos tumores foi ductal e nenhum outro tipo histológico tumoral se desenvolveu. A origem das células neoplásicas não foi um dos desfechos avaliados, mas foram observadas, em várias peças, a presença de um processo de transdiferenciação (figura 20) a semelhança do descrito por Bockmann et al. (82,84) Este processo já foi demonstrado em outros estudos. Sob certas condições de cultura celular, células acinares sem divisão transformaram-se em células ductais, expressando citoqueratinas. (105) A afirmação contrária de Jimenez et al, baseou-se na análise por imunohistoquímica da expressão para quimotripsina e de citoqueratinas das regiões, contendo complexos tubulares e de parênquima normal. No parênquima normal, as células acinares expressaram somente a quimotripsina. Ao contrário, nos complexos tubulares há exclusiva expressão de citoqueratinas. Apesar da veracidade desta constatação, não se pode excluir que a origem das células ductais seja as células acinares e das ilhotas de Langherhans transformadas, pois nos cortes analisados após 2 semanas da cirurgia, já havia a presença inequívoca de complexos ao redor da bolsa pancreática. A pergunta continuava sem resposta. Qual a célula que forma os complexos tubulares? Na opinião de Jimenez et al, a proliferação de células centro-lobulares. (83,87) Confrontando este entendimento, Bockmann et al estudaram os eventos celulares, ocorridos a partir de 24 horas da implantação do DMBA e verificaram que nas zonas de transição das células glandulares para complexos tubulares havia expressão tanto das citoqueratinas (complexos tubulares maduros) como de quimotripsina (resquício de células acinares). (84) Assim, na carcinogênese pancreática

experimental, ocorre uma seqüência de transformação de células acinares e das ilhotas de Langherhans para célula ductal e destas para carcinoma. (106)

Um aspecto muito importante é a utilização do camundongo como animal de experimentação. Houve uma redução do tempo de indução de neoplasia que é muito inferior aos 9 a 12 meses necessários para indução em ratos (ver tabela 4), com uma freqüência maior de tumores. (7,8,87). Esta diminuição de tempo de indução representa um custo de manutenção dos animais, pelo menos quatro vezes menor e uma maior rapidez na condução dos experimentos.

A indução química do adenocarcinoma pancreático pela implantação do DMBA em camundongos provou ser um modelo adequado para o estudo do desenvolvimento da neoplasia e suas lesões precursoras. Apresenta maior freqüência de NIPans e adenocarcinomas com menor tempo de indução e custo.

## **CONCLUSÕES**

A implantação de 7,12-dimetilbenzantraceno (DMBA) no pâncreas, em camundongos, é um modelo eficaz para indução da carcinogênese pancreática.

A prevalência, no grupo de 30 dias, das neoplasias intra-epiteliais pancreáticas (NIPan) foi de 16 (66,6%) e de adenocarcinoma de 4 (16,7%). No grupo de 60 dias foi de 13 (35,1%) animais com NIPan e de 14 (37,8%) com adenocarcinoma.

## **PERSPECTIVAS**

A consolidação deste modelo experimental cria uma linha de pesquisa na carcinogênese pancreática possibilitando a realização de estudos no âmbito da genética molecular e de fatores promotores ou protetores.

## REFERÊNCIAS

- (1) Real FX. A "catastrophic hypothesis" for pancreas cancer progression. *Gastroenterology* 2003 Jun;124(7):1958-64.
- (2) PDQ Editorial Board. Pancreatic Cancer (PDQ®): Treatment. Disponível em: <http://www.nci.nih.gov/cancertopics/pdq/treatment/pancreatic/healthprofessional> 2004 May 10. Último acesso em 1 Nov 2004;1-17.
- (3) Alexakis N, Halloran C, Raraty M, Ghaneh P, Sutton R, Neoptolemos JP. Current standards of surgery for pancreatic cancer. *Br J Surg* 2004 Nov;91(11):1410-27.
- (4) Li D, Xie K, Wolff R, Abbruzzese JL. Pancreatic cancer. *Lancet* 2004 Mar 27;363(9414):1049-57.
- (5) Neoptolemos JP, Stocken DD, Friess H, Bassi C, Dunn JA, Hickey H, et al. A randomized trial of chemoradiotherapy and chemotherapy after resection of pancreatic cancer. *N Engl J Med* 2004 Mar 18;350(12):1200-10.
- (6) Sener SF, Fremgen A, Menck HR, Winchester DP. Pancreatic cancer: a report of treatment and survival trends for 100,313 patients diagnosed from 1985-1995, using the National Cancer Database. *J Am Coll Surg* 1999 Jul;189(1):1-7.
- (7) Dissin J, Mills LR, Mains DL, Black O, Jr., Webster PD, III. Experimental induction of pancreatic adenocarcinoma in rats. *J Natl Cancer Inst* 1975 Oct;55(4):857-64.
- (8) Rivera JA, Graeme-Cook F, Werner J, Z'graggen K, Rustgi AK, Rattner DW, et al. A rat model of pancreatic ductal adenocarcinoma: targeting chemical carcinogens. *Surgery* 1997 Jul;122(1):82-90.
- (9) Zehnder P, Z'Graggen K, Ozawa F, Mazzucchelli L, Büchler MW. First description of a carcinogen induced mouse model of ductal pancreatic

adenocarcinoma: dimethylbenzanthraceno induces ductal adenocarcinoma of the pancreas in a dysplasia-carcinoma type sequence. *HPB* 2000;2(2):124.

- (10) Hruban RH, Adsay NV, Albores-Saavedra J, Compton C, Garrett ES, Goodman SN, et al. Pancreatic intraepithelial neoplasia: a new nomenclature and classification system for pancreatic duct lesions. *Am J Surg Pathol* 2001 May;25(5):579-86.
- (11) Kern S, Hruban R, Hollingsworth MA, Brand R, Adrian TE, Jaffee E, et al. A white paper: the product of a pancreas cancer think tank. *Cancer Res* 2001 Jun 15;61(12):4923-32.
- (12) Cooperman AM. Pancreatic cancer: the bigger picture. *Surg Clin North Am* 2001 Jun;81(3):557-74.
- (13) Yeo TP, Hruban RH, Leach SD, Wilentz RE, Sohn TA, Kern SE, et al. Pancreatic cancer. *Curr Probl Cancer* 2002 Jul;26(4):176-275.
- (14) Informações de Saúde: Mortalidade Brasil. MS/SVS/DASIS - Sistema de Informações sobre Mortalidade - SIM 2003 Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sim/cnv/obtuf.def>. Último acesso em: 1 Nov 2004.
- (15) Ministério da Saúde do Brasil. Secretaria Nacional de Assistência à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Atlas de mortalidade por câncer no Brasil 1979-1999. 25 maio 2004. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/atlas/>. Último acesso em: 1 Nov 2004.
- (16) Simon B, Printz H. Epidemiologic Trends in Pancreatic Neoplasias. *Dig Dis* 2001;19(1):6-14.
- (17) Everhart J, Wright D. Diabetes mellitus as a risk factor for pancreatic cancer. A meta-analysis. *JAMA* 1995 May 24;273(20):1605-9.
- (18) Gapstur SM, Gann PH, Lowe W, Liu K, Colangelo L, Dyer A. Abnormal glucose metabolism and pancreatic cancer mortality. *JAMA* 2000 May 17;283(19):2552-8.

- (19) Michaud DS, Liu S, Giovannucci E, Willett WC, Colditz GA, Fuchs CS. Dietary sugar, glycemic load, and pancreatic cancer risk in a prospective study. *J Natl Cancer Inst* 2002 Sep 4;94(17):1293-300.
- (20) Lowenfels AB, Maisonneuve P, Cavallini G, Ammann RW, Lankisch PG, Andersen JR, et al. Pancreatitis and the risk of pancreatic cancer. International Pancreatitis Study Group. *N Engl J Med* 1993 May 20;328(20):1433-7.
- (21) Malka D, Hammel P, Maire F, Rufat P, Madeira I, Pessione F, et al. Risk of pancreatic adenocarcinoma in chronic pancreatitis. *Gut* 2002 Dec;51(6):849-52.
- (22) Boyle P, Maisonneuve P, Bueno dM, Ghadirian P, Howe GR, Zatonski W, et al. Cigarette smoking and pancreas cancer: a case control study of the search programme of the IARC. *Int J Cancer* 1996 Jul 3;67(1):63-71.
- (23) Lowenfels AB, Maisonneuve P. Environmental factors and risk of pancreatic cancer. *Pancreatology* 2003;3(1):1-7.
- (24) Chowdhury P, MacLeod S, Udupa KB, Rayford PL. Pathophysiological effects of nicotine on the pancreas: an update. *Exp Biol Med (Maywood )* 2002 Jul;227(7):445-54.
- (25) Hecht SS. Biochemistry, biology, and carcinogenicity of tobacco-specific N-nitrosamines. *Chem Res Toxicol* 1998 Jun;11(6):559-603.
- (26) Berrington dG, Sweetland S, Spencer E. A meta-analysis of obesity and the risk of pancreatic cancer. *Br J Cancer* 2003 Aug 4;89(3):519-23.
- (27) Silverman DT, Swanson CA, Gridley G, Wacholder S, Greenberg RS, Brown LM, et al. Dietary and nutritional factors and pancreatic cancer: a case-control study based on direct interviews. *J Natl Cancer Inst* 1998 Nov 18;90(22):1710-9.
- (28) Li D, Jiao L. Molecular epidemiology of pancreatic cancer. *Int J Gastrointest Cancer* 2003;33(1):3-14.

- (29) Tascilar M, van Rees BP, Sturm PD, Tytgat GN, Hruban RH, Goodman SN, et al. Pancreatic cancer after remote peptic ulcer surgery. *J Clin Pathol* 2002 May;55(5):340-5.
- (30) Schernhammer ES, Michaud DS, Leitzmann MF, Giovannucci E, Colditz GA, Fuchs CS. Gallstones, cholecystectomy, and the risk for developing pancreatic cancer. *Br J Cancer* 2002 Apr 8;86(7):1081-4.
- (31) Talamini G, Falconi M, Bassi C, Casetti L, Fantin A, Salvia R, et al. Previous cholecystectomy, gastrectomy, and diabetes mellitus are not crucial risk factors for pancreatic cancer in patients with chronic pancreatitis. *Pancreas* 2001 Nov;23(4):364-7.
- (32) Ghadirian P, Liu G, Gallinger S, Schmocker B, Paradis AJ, Lal G, et al. Risk of pancreatic cancer among individuals with a family history of cancer of the pancreas. *Int J Cancer* 2002 Feb 20;97(6):807-10.
- (33) Klein AP, Brune KA, Petersen GM, Goggins M, Tersmette AC, Offerhaus GJ, et al. Prospective risk of pancreatic cancer in familial pancreatic cancer kindreds. *Cancer Res* 2004 Apr 1;64(7):2634-8.
- (34) Cowgill SM, Muscarella P. The genetics of pancreatic cancer. *Am J Surg* 2003 Sep;186(3):279-86.
- (35) La Vecchia C, Negri E, d'Avanzo B, Ferraroni M, Gramenzi A, Savoldelli R, et al. Medical history, diet and pancreatic cancer. *Oncology* 1990;47(6):463-6.
- (36) Newmark HL. Squalene, olive oil, and cancer risk. Review and hypothesis. *Ann N Y Acad Sci* 1999;889:193-203.
- (37) Michaud DS, Giovannucci E, Willett WC, Colditz GA, Stampfer MJ, Fuchs CS. Physical activity, obesity, height, and the risk of pancreatic cancer. *JAMA* 2001 Aug 22;286(8):921-9.
- (38) Anderson KE, Johnson TW, Lazovich D, Folsom AR. Association between nonsteroidal anti-inflammatory drug use and the incidence of pancreatic cancer. *J Natl Cancer Inst* 2002 Aug 7;94(15):1168-71.

- (39) Hitt E. Aspirin may lower risk of pancreatic cancer. *Lancet Oncol* 2002 Sep;3(9):518.
- (40) Menezes RJ, Huber KR, Mahoney MC, Moysich KB. Regular use of aspirin and pancreatic cancer risk. *BMC Public Health* 2002 Sep 4;2(1):18.
- (41) Jacobs EJ, Connell CJ, Rodriguez C, Patel AV, Calle EE, Thun MJ. Aspirin use and pancreatic cancer mortality in a large United States cohort. *J Natl Cancer Inst* 2004 Apr 7;96(7):524-8.
- (42) Schernhammer ES, Kang JH, Chan AT, Michaud DS, Skinner HG, Giovannucci E, et al. A prospective study of aspirin use and the risk of pancreatic cancer in women. *J Natl Cancer Inst* 2004 Jan 7;96(1):22-8.
- (43) Klöppel G, Hruban RH, Longnecker D, Adler G, Kern S, Partanen TJ. Ductal adenocarcinoma of the pancreas. In: Hamilton SR, Aaltonen LA, editors. *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System*. Lyon: IARC Press; 2000. p. 219-50.
- (44) Hruban RH, Goggins M, Parsons J, Kern SE. Progression model for pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 2000 Aug;6(8):2969-72.
- (45) Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 1988 Sep 1;319(9):525-32.
- (46) Hulst SPL. Zur kenntnis der genese des adenokarzinoms und karzinoms des pankreas. *Virchows Arch B* 1905;180:288-316.
- (47) Takaori K, Hruban RH, Maitra A, Tanigawa N. Pancreatic intraepithelial neoplasia. *Pancreas* 2004 Apr;28(3):257-62.
- (48) Sommers SC, Murphy SA, Warren S. Pancreatic duct hyperplasia and cancer. *Gastroenterology* 1954 Nov;27(5):629-40.
- (49) Cubilla AL, Fitzgerald PJ. Morphological lesions associated with human primary invasive nonendocrine pancreas cancer. *Cancer Res* 1976 Jul;36(7 PT 2):2690-8.

- (50) Kozuka S, Sassa R, Taki T, Masamoto K, Nagasawa S, Saga S, et al. Relation of pancreatic duct hyperplasia to carcinoma. *Cancer* 1979 Apr;43(4):1418-28.
- (51) Kozuka S. Pathogenesis of duct hyperplasia in the pancreas. *Digestion* 1980;20(4):234-47.
- (52) Luttges J, Reinecke-Luthge A, Mollmann B, Menke MA, Clemens A, Klimpfnger M, et al. Duct changes and K-ras mutations in the disease-free pancreas: analysis of type, age relation and spatial distribution. *Virchows Arch* 1999 Nov;435(5):461-8.
- (53) Brat DJ, Lillemoe KD, Yeo CJ, Warfield PB, Hruban RH. Progression of pancreatic intraductal neoplasias to infiltrating adenocarcinoma of the pancreas. *Am J Surg Pathol* 1998 Feb;22(2):163-9.
- (54) Brockie E, Anand A, Albores-Saavedra J. Progression of atypical ductal hyperplasia/carcinoma in situ of the pancreas to invasive adenocarcinoma. *Ann Diagn Pathol* 1998 Oct;2(5):286-92.
- (55) Hruban RH, Adsay NV, Albores-Saavedra J, Compton C, Garrett ES, Goodman SN, et al. New Nomenclature for Classification of Duct Lesions in the Pancreas. 2002. Disponível em: [http://pathology.jhu.edu/pancreas\\_panin/](http://pathology.jhu.edu/pancreas_panin/). Último acesso em: 1 Nov 2004.
- (56) Maitra A, Adsay NV, Argani P, Iacobuzio-Donahue C, De Marzo A, Cameron JL, et al. Multicomponent analysis of the pancreatic adenocarcinoma progression model using a pancreatic intraepithelial neoplasia tissue microarray. *Mod Pathol* 2003 Sep;16(9):902-12.
- (57) van Heek NT, Meeker AK, Kern SE, Yeo CJ, Lillemoe KD, Cameron JL, et al. Telomere shortening is nearly universal in pancreatic intraepithelial neoplasia. *Am J Pathol* 2002 Nov;161(5):1541-7.
- (58) Kubrusly MS, Cunha JE, Bacchella T, Abdo EE, Jukemura J, Penteadó S, et al. Detection of K-ras point mutation at codon 12 in pancreatic diseases: a study in a Brazilian casuistic. *JOP* 2002 Oct;3(5):144-51.

- (59) Day JD, Digiuseppe JA, Yeo C, Lai-Goldman M, Anderson SM, Goodman SN, et al. Immunohistochemical evaluation of HER-2/neu expression in pancreatic adenocarcinoma and pancreatic intraepithelial neoplasms. *Hum Pathol* 1996 Feb;27(2):119-24.
- (60) Apple SK, Hecht JR, Lewin DN, Jahromi SA, Grody WW, Nieberg RK. Immunohistochemical evaluation of K-ras, p53, and HER-2/neu expression in hyperplastic, dysplastic, and carcinomatous lesions of the pancreas: evidence for multistep carcinogenesis. *Hum Pathol* 1999 Feb;30(2):123-9.
- (61) Thayer SP, di Magliano MP, Heiser PW, Nielsen CM, Roberts DJ, Lauwers GY, et al. Hedgehog is an early and late mediator of pancreatic cancer tumorigenesis. *Nature* 2003 Oct 23;425(6960):851-6.
- (62) Anderson KM, Harris JE. Selected features of nonendocrine pancreatic cancer. *Exp Biol Med (Maywood)* 2001 Jun;226(6):521-37.
- (63) Biankin AV, Kench JG, Morey AL, Lee CS, Biankin SA, Head DR, et al. Overexpression of p21(WAF1/CIP1) is an early event in the development of pancreatic intraepithelial neoplasia. *Cancer Res* 2001 Dec 15;61(24):8830-7.
- (64) Wilentz RE, Iacobuzio-Donahue CA, Argani P, McCarthy DM, Parsons JL, Yeo CJ, et al. Loss of expression of Dpc4 in pancreatic intraepithelial neoplasia: evidence that DPC4 inactivation occurs late in neoplastic progression. *Cancer Res* 2000 Apr 1;60(7):2002-6.
- (65) Naderi A, Couch FJ. BRCA2 and pancreatic cancer. *Int J Gastrointest Cancer* 2002;31(1-3):99-106.
- (66) Hingorani SR. New Pathways to Pancreatic Cancer. *Cancer Biol Ther* 2004 Feb;3(2):170-2.
- (67) Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000 Jan 7;100(1):57-70.

- (68) Wei D, Xiong HQ, Abbruzzese JL, Xie K. Experimental animal models of pancreatic carcinogenesis and metastasis. *Int J Gastrointest Cancer* 2003;33(1):43-60.
- (69) Lacaine F, Petroni R. Experimental models of pancreatic cancer. In: Neoptolemos JP, Lemoine NR, editors. *Pancreatic Cancer Molecular and Clinical Advances*. 1 ed. Great Britain: Blackwell Science; 1996. p. 105-12.
- (70) Hotz HG, Hines OJ, Foitzik T, Reber HA. Animal models of exocrine pancreatic cancer. *Int J Colorectal Dis* 2000 Jun;15(3):136-43.
- (71) Lowy AM. Transgenic models of pancreatic cancer. *Int J Gastrointest Cancer* 2003;33(1):71-8.
- (72) Standop J, Schneider MB, Ulrich A, Pour PM. Experimental animal models in pancreatic carcinogenesis: lessons for human pancreatic cancer. *Dig Dis* 2001;19(1):24-31.
- (73) Leach SD. Mouse models of pancreatic cancer: the fur is finally flying! *Cancer Cell* 2004 Jan;5(1):7-11.
- (74) Hingorani SR, Petricoin EF, Maitra A, Rajapakse V, King C, Jacobetz MA, et al. Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse. *Cancer Cell* 2003 Dec;4(6):437-50.
- (75) Hotz HG, Reber HA, Hotz B, Foitzik T, Buhr HJ, Cortina G, et al. An improved clinical model of orthotopic pancreatic cancer in immunocompetent Lewis rats. *Pancreas* 2001 Mar;22(2):113-21.
- (76) Makinen K, Loimas S, Kosma VM, Wahlfors J, Pettengill OS, Longnecker DS, et al. Azaserine-induced rat pancreas tumor model with transplantable cultured cells. *Pancreas* 1998 Mar;16(2):160-4.
- (77) Wenger FA, Kilian M, Achucarro P, Heinicken D, Schimke I, Guski H, et al. Effects of Celebrex and Zylflo on BOP-induced pancreatic cancer in Syrian hamsters. *Pancreatology* 2002;2(1):54-60.

- (78) International Agency for Research on Cancer. Certain Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Heterocyclic Compounds. 2004 Disponível em: <http://monographs.iarc.fr/htdocs/monographs/vol32/benz%5Ba%5Danthracene.html>. Último acesso em : 1 Nov 2004.
- (79) Satake K, Umeyama K, Kamino K, Uchima K, Yamashita K. Pancreatic cancer developing in Sprague-Dawley rats after local application of 7,12-dimethyl benzanthracene (DMBA). *Osaka City Med J* 1975;21(2):119-26.
- (80) Satake K, Mukai R, Kato Y, Shim K, Umeyama K. Experimental pancreatic carcinoma as a model of human pancreatic carcinoma. *Clin Oncol* 1984 Mar;10(1):27-34.
- (81) Bockman DE, Black O, Jr., Mills LR, Mainz DL, Webster PD, III. Fine structure of pancreatic adenocarcinoma induced in rats by 7,12-dimethylbenz(a)anthracene. *J Natl Cancer Inst* 1976 Oct;57(4):931-6.
- (82) Bockman DE, Black O, Jr., Mills LR, Webster PD. Origin of tubular complexes developing during induction of pancreatic adenocarcinoma by 7,12-dimethylbenz(a)anthracene. *Am J Pathol* 1978 Mar;90(3):645-58.
- (83) Jimenez RE, Z'graggen K, Hartwig W, Graeme-Cook F, Warshaw AL, Fernandez-Del Castillo C. Immunohistochemical characterization of pancreatic tumors induced by dimethylbenzanthracene in rats. *Am J Pathol* 1999 Apr;154(4):1223-9.
- (84) Bockman DE, Guo J, Buchler P, Muller MW, Bergmann F, Friess H. Origin and development of the precursor lesions in experimental pancreatic cancer in rats. *Lab Invest* 2003 Jun;83(6):853-9.
- (85) Satake K, Yoshimoto T, Mukai R, Umeyama K. Estrogen receptors in 7,12-dimethylbenz (a) anthracene (DMBA) induced pancreatic carcinoma in rats and in human pancreatic carcinoma. *Clin Oncol* 1982 Mar;8(1):49-54.

- (86) Sperti C, Militello C, Rovati L, Behboo R, Khajeturian E, Perasole A, et al. Effect of cholecystokinin analogue caerulein and cholecystokinin antagonist lorglumide on pancreatic carcinogenesis in the rat. *J Surg Oncol* 1994 Sep;57(1):11-6.
- (87) Z'graggen K, Warshaw AL, Werner J, Graeme-Cook F, Jimenez RE, Fernandez-Del Castillo C. Promoting effect of a high-fat/high-protein diet in DMBA-induced ductal pancreatic cancer in rats. *Ann Surg* 2001 May;233(5):688-95.
- (88) Commission on Life Sciences National Research Council. Guide for Care and Use of Laboratory Animals. 7 ed. Washington DC: National Academy Press; 1996.
- (89) Wagner JE, Harkness JE. *Biologia e Clínica de Coelhos e Roedores*. 3 ed. São Paulo: Rocca; 1993.
- (90) Fantoni DT, Cortopassi SRG. Técnicas anestésicas em animais de laboratório. In: de Luca RR, Alexandre SR, Marques T, Souza NLd, Merusse JLB, Neves SP, editors. *Manual para técnicos em bioterismo*. 2 ed. São Paulo: Winner Graph; 1996. p. 157-64.
- (91) Klöppel G, Hruban RH, Longnecker D, Adler G, Kern SE, Partanen TJ. Tumors of the Exocrine Pancreas. In: Hamilton SR, Aaltonen LA, editors. *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System*. Lyon:France: YARC Press; 2000. p. 219-50.
- (92) Kern SE. Molecular genetic alterations in ductal pancreatic adenocarcinomas. *Med Clin North Am* 2000 May;84(3):691-5, xi.
- (93) Bland JM, Altman DG. The logrank test. *BMJ* 2004 May 1;328(7447):1073.
- (94) Raymundo M, Goldim J. Diretrizes para utilização de animais em experimentos científicos. 2000. Disponível em: [http://www.bioetica\\_ufrgs\\_br/animdir.html](http://www.bioetica_ufrgs_br/animdir.html). Último acesso em: 1 Nov 2004.
- (95) Hruban RH, Takaori K, Klimstra DS, Adsay NV, Bores-Saavedra J, Biankin AV, et al. An illustrated consensus on the classification of pancreatic intraepithelial

neoplasia and intraductal papillary mucinous neoplasms. *Am J Surg Pathol* 2004 Aug;28(8):977-87.

- (96) Andea A, Sarkar F, Adsay VN. Clinicopathological correlates of pancreatic intraepithelial neoplasia: a comparative analysis of 82 cases with and 152 cases without pancreatic ductal adenocarcinoma. *Mod Pathol* 2003 Oct;16(10):996-1006.
- (97) Hruban RH, Iacobuzio-Donahue C, Wilentz RE, Goggins M, Kern SE. Molecular pathology of pancreatic cancer. *Cancer J* 2001 Jul;7(4):251-8.
- (98) Luttges J, Neumann S, Jesnowski R, Borries V, Lohr M, Kloppel G. Lack of apoptosis in PanIN-1 and PanIN-2 lesions associated with pancreatic ductal adenocarcinoma is not dependent on K-ras status. *Pancreas* 2003 Oct;27(3):e57-e62.
- (99) Khan SA, Beck A, Carmichael PL, Taylor-Robinson SD. Unfriendly chemicals in pancreatic cancer. *Pancreatology* 2003;3(1):7-8.
- (100) Bockman DE. Cells of origin of pancreatic cancer: experimental animal tumors related to human pancreas. *Cancer* 1981 Mar 15;47(6 Suppl):1528-34.
- (101) Pour P, Althoff J, Takahashi M. Early lesions of pancreatic ductal carcinoma in the hamster model. *Am J Pathol* 1977 Aug;88(2):291-308.
- (102) Kloppel G, Longnecker DS. Hyperplastic and metaplastic changes in pancreatic ducts: nomenclature and preneoplastic potential. *Ann N Y Acad Sci* 1999 Jun 30;880:66-73.
- (103) Bockman DE. Toward understanding pancreatic disease: from architecture to cell signaling. *Pancreas* 1995 Nov;11(4):324-9.
- (104) Bockman DE, Boydston WR, Parsa I. Architecture of human pancreas: implications for early changes in pancreatic disease. *Gastroenterology* 1983 Jul;85(1):55-61.

- (105) Rooman I, Heremans Y, Heimberg H, Bouwens L. Modulation of rat pancreatic acinoductal transdifferentiation and expression of PDX-1 in vitro. *Diabetologia* 2000 Jul;43(7):907-14.
- (106) Wagner M, Luhrs H, Kloppel G, Adler G, Schmid RM. Malignant transformation of duct-like cells originating from acini in transforming growth factor transgenic mice. *Gastroenterology* 1998 Nov;115(5):1254-62.

**ANEXO****SIGMA-ALDRICH****Certificate of Analysis**

<b>Product Name</b>	7,12-Dimethylbenz[a]anthracene
<b>Product Number</b>	D3254
<b>Product Brand</b>	SIGMA
<b>CAS Number</b>	57-97-6
<b>Molecular Formula</b>	C <sub>20</sub> H <sub>16</sub>
<b>Molecular Weight</b>	256.34

**TEST****SPECIFICATION****LOT 021K3688 RESULTS****APPEARANCE**

YELLOW TO YELLOW WITH A TAN TO BROWN OR GREEN CAST POWDER  
YELLOW POWDER WITH A GREEN CAST

**SOLUBILITY**

CLEAR TO SLIGHTLY HAZY YELLOW TO YELLOW-GREEN SOLUTION AT 50MG/ML IN  
TOLUENE  
SLIGHTLY HAZY LIGHT YELLOW-GREEN

**ELEMENTAL ANALYSIS**

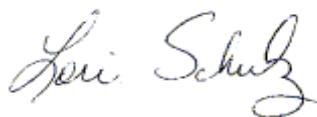
91.4 TO 96.0% CARBON  
92.9%

**PURITY BY THIN LAYER CHROMATOGRAPHY**

MINIMUM 97%  
>99%

**QC ACCEPTANCE DATE**

FEBRUARY 2001

A handwritten signature in cursive script that reads "Lori Schulz". The signature is written in black ink and is positioned above the printed name and title.

Lori Schulz, Manager  
Analytical Services  
St. Louis, Missouri USA