

Process
BIVL Publication

BVL#9627

WILLIAM H. CLODE

Laboratório de Isótopos «Abílio Lopes do Rego»
do Instituto Português de Oncologia — Lisboa

MASTER

Evolução do Sarcoma 37 em murganhos CF₁

*Aspectos biológicos da cura espontânea
do tumor estudados após irradiação
e administração de soro «imune»*

Evaluation of Sarcoma 37 in CF₁ mice



LEGAL NOTICE

This report was prepared as an account of Government sponsored work. Neither the United States, nor the Commission, nor any person acting on behalf of the Commission:

A. Makes any warranty or representation, expressed or implied, with respect to the accuracy, completeness, or usefulness of the information contained in this report, or that the use of any information, apparatus, method, or process disclosed in this report may not infringe privately owned rights; or

B. Assumes any liabilities with respect to the use of, or for damages resulting from the use of any information, apparatus, method, or process disclosed in this report.

As used in the above, "person acting on behalf of the Commission" includes any employee or contractor of the Commission, or employee of such contractor, to the extent that such employee or contractor of the Commission, or employee of such contractor prepares, disseminates, or provides access to, any information pursuant to his employment or contract with the Commission, or his employment with such contractor.

LISBOA • 1965

DISCLAIMER

This report was prepared as an account of work sponsored by an agency of the United States Government. Neither the United States Government nor any agency Thereof, nor any of their employees, makes any warranty, express or implied, or assumes any legal liability or responsibility for the accuracy, completeness, or usefulness of any information, apparatus, product, or process disclosed, or represents that its use would not infringe privately owned rights. Reference herein to any specific commercial product, process, or service by trade name, trademark, manufacturer, or otherwise does not necessarily constitute or imply its endorsement, recommendation, or favoring by the United States Government or any agency thereof. The views and opinions of authors expressed herein do not necessarily state or reflect those of the United States Government or any agency thereof.

DISCLAIMER

Portions of this document may be illegible in electronic image products. Images are produced from the best available original document.

Evolução do Sarcoma 37 em murganhos CF₁

Aspectos biológicos da cura espontânea
do tumor estudados após irradiação
e administração de soro «imune» *

William H. Clode **

1 — INTRODUÇÃO.

Os primeiros trabalhos sobre transplantação de tumores datam do fim do século passado, mas foi nos últimos 15 anos que esta técnica se desenvolveu como instrumento de investigação em múltiplos aspectos da oncologia particularmente biológicos, terapêuticos, imunológicos e radiobiológicos. As revisões de HAALAND de 1908 (21) e de TYZZER de 1916 (57) sobre imunologia são ainda hoje bastante citadas, onde se revela que nessa data a maior parte dos problemas actuais já foram considerados.

* Trabalho realizado em Brookhaven National Laboratory, Medical Research Center, Upton, Long Island, New York, E. U. A.

** Bolseiro da Comissão de Estudos de Energia Nuclear do Instituto de Alta Cultura.

O aperfeiçoamento da selecção de animais de laboratório tornou a genética da transplantação de tumores um campo altamente especializado da investigação. Os tumores animais propagados por transplantação em hospedeiro conveniente tornaram-se material indispensável na investigação oncológica (26).

A necessidade de trabalhar com estirpes puras, resultantes de cruzamento entre irmãos da mesma ninhada, em condições de vida padronizadas, e do conhecimento da evolução biológica dos tumores nas mesmas, constitui uma medida elementar na ciência oncológica. As controvérsias que nascem de muitos trabalhos de oncologia dependem da dificuldade em reproduzi-los nas mesmas condições, acrescido do facto de raras vezes se ter usado quantidades de animais que permitam obter resultados com valor significativo.

Muitos tumores se têm tornado conhecidos pelo seu emprego durante anos. O S-37, pela facilidade com que se transplanta (23 e 24) é um dos mais usados. É conhecido desde 1906 e tem origem no carcinoma da mama do murganho. Descrito por HAALAND (21) e DUNHAM (8) foi estudado histologicamente por BASHFORD (4) e recentemente, citologicamente, por EPSTEIN (10). A evolução deste tumor em diferentes estirpes de murganhos descrita por LEITER e KLINE (34) apresenta-se com percentagens elevadas de regressão.

A regressão definitiva dum tumor ou cura espontânea, distinta da regressão parcial que é temporária é um fenómeno que tem atraído os investigadores. Pela semelhança com reacções imunológicas, muitos trabalhos se tem orientado neste sentido mas sem que haja uniformidade de opiniões.

Estudos experimentais de imunologia oncológica referem a existência da anticorpos (19, 20, 43 e 46) e mesmo os identificam (3 e 59) e têm sido feitas tentativas no sentido da terapêutica de tumores por métodos imunológicos (5, 6, 11, 32, 41 e 52). Mas aos entusiasmos iniciais tem sucedido o desânimo da dificuldade em reproduzir muitos dos resultados.

Ao estudarmos a evolução do S-37 em murganhos CF₁, a nossa atenção foi também atraída para o fenómeno da regressão espontânea do tumor. O comportamento dos animais tornados

imunes para o tumor levou-nos a várias experiências tendentes a melhor conhecer o mecanismo do fenómeno.

É o resultado destes trabalhos que iremos expor em seguida.

2 — MATERIAL E MÉTODOS

2.1 — Sarcoma 37 e murganhos CF₁.

O tumor utilizado neste trabalho, S-37, foi cedido pelo National Cancer Institute, de Washington, E. U. A., e os murganhos albinos, suíços, da estirpe CF₁, foram fornecidos pela casa «Carworth Farm», de New York, produtora de estirpes seleccionadas, homozigóticas, destinadas a trabalhos experimentais.

Só foram utilizados murganhos machos de idade entre 8 e 10 semanas, que eram mantidos em gaiolas em grupos de 10, cada um identificado por sinais nas orelhas. A alimentação era dada sob a forma de biscoito contendo uma mistura apropriada e constante de proteínas, hidratos de carbono, gorduras, vitaminas e sais minerais, da «Ralston Purina Company», St. Louis, E. U.A.

A temperatura ambiente do biotério em que os murganhos foram guardados era de 22° C., mantida por termostato. As condições de higiene eram as mais satisfatórias.

O número de murganhos com que trabalhamos ultrapassa o milhar, distribuídos em diversas experiências, que serão referidas adiante.

2.2 — Transplantação do tumor.

Na transplantação do tumor utilizou-se o método de suspensão de células, em soro fisiológico tamponado, com fosfato de sódio a Ph 7,1-7,2.

Em condições rigorosas de assepsia o tumor era extraído a um murganho numa fase em que não houvesse ulceração, nem muita necrose de tecido tumoral, em regra entre a 2.^a e a 3.^a semanas de evolução. A morte dos animais era provocada por estiramento cervical. Não se utilizaram anestésicos para

evitar fenómenos secundários, celulares, que porventura a acção de doses letais de éter ou clorofórmio pudesse causar. Retirava-se a parte necrosada do tumor e aproveitava-se todo o tumor «limpo» de aponevroses, músculos ou osso.

O tumor era então seccionado e os pequenos fragmentos esmagados num almofariz, adicionando a pouco e pouco soro, de modo a ir fazendo uma papa cada vez menos consistente. Quando o tumor estava bastante dividido, a suspensão de células e agregados celulares era passada para uma seringa de 10 cc. através agulhas de calibre cada vez mais pequeno. Logo que toda a suspensão passava sem dificuldade por uma agulha de calibre 20 (B-D) considerava-se terminada a preparação da suspensão.

A quantidade de soro empregada dependia da quantidade do tumor e da concentração que pretendíamos utilizar. Em regra, trabalhávamos com um volume de cerca de 5 c.c.

As células eram então contadas ao microscópio, seguindo exactamente o mesmo sistema utilizado para a contagem de glóbulos brancos do sangue. Contavam-se como unidades os grupos celulares que não tivessem sido desagregados.

Imediatamente se procedia à inoculação dos murganhos utilizando uma seringa de 1 c.c. graduada em centésimos. O volume injectado era dependente da concentração celular e, em regra, variava entre 0,03 e 0,1 c.c.

O local da injeção, nestas experiências, foi sempre a coxa do membro posterior direito, na face externa. A injeção era subcutânea.

2.3 — Medidas do tumor.

A evolução dos tumores transplantados era seguida todas as semanas. Com uma craveira, media-se o diâmetro lateral das patas com tumor. Neste trabalho considerou-se sempre o tumor desenvolvido, quando pelo menos, em duas medições, se confirmou uma tumefacção da pata inoculada superior à pata simétrica, sã.

Nos animais em que o S-37 se desenvolveu, este foi deixado evoluir até à morte do hospedeiro. Nos casos de cura espontânea,

os murganhos foram seguidos até, pelo menos, 2 meses depois da cura. O mesmo aconteceu para os animais que, excepcionalmente, não desenvolveram tumor.

2.4 — Reimplantações.

Murganhos que se curaram espontaneamente do S-37 foram reimplantados com o mesmo, alguns até 5 vezes, sendo o intervalo entre as reinoculações nunca inferior a 2 meses. Nenhuma reimplantação foi feita na pata onde se deu a cura. O número de células utilizado nas reinoculações variou entre 1 e 2 milhões. Cento e cinquenta e quatro murganhos foram reimplantados duas vezes, 108 três vezes, 58 quatro vezes e 12 cinco vezes. Em todas as reimplantações se preparou um grupo testemunha.

2.5 — Irradiação de corpo inteiro de murganhos.

Foram irradiados 251 murganhos pelos RX, irradiação de corpo inteiro, correspondente a 400 r. Dos murganhos irradiados 205 nunca tinham sido inoculados com S-37 e os restantes 46 foram animais que se tinham curado espontaneamente do tumor. Utilizou-se em todos os murganhos as mesmas condições de trabalho. O aparelho de RX (General Electric Maxitron, modelo 250) destinado exclusivamente a estudos experimentais, trabalhou a uma tensão de 250 Kv e a 30 mA, com filtro de 0,5 mm de cobre e de 1 mm de alumínio, com espessura semi-absorvente de 1,5 mm de cobre. A distância da ampola aos murganhos medida na vertical, era de 40 cm. Os animais durante a irradiação estavam contidos numa caixa redonda de plástico transparente, dividida em 10 compartimentos, de disposição radiária, cada um dos quais só tendo espaço para um murganho. Esta caixa era colocada sobre um disco de chumbo com movimento giratório, a fim de garantir uma dose homogênea. O débito do aparelho era sempre determinado antes de cada experiência, utilizando uma câmara de ionização «Victoreen». A dose era sempre calculada em relação à zona mais periférica da caixa, para que os animais não recebessem irradiação inferior à calculada. Nas condições estabelecidas, os débitos da ampola de RX variavam entre 208 e 233 r/m pelo

que a dose de radiação pretendida se obtinha em menos de 2 minutos.

Todos os murganhos depois de irradiados, no mesmo dia, foram transplantados com o S-37 numa quantidade de células de cerca de 1 milhão.

2.6 — Preparação de soro de murganhos «imunes».

Os murganhos que se curaram espontâneamente do sarcoma e que se tinha comprovado resistirem a nova inoculação do tumor, foram os «dadores» de sangue para as experiências em que se utilizou o soro «imune».

Os murganhos eram sangrados por punção no seio nasal, junto ao canto interno da órbita, sob anestesia superficial com éter. De cada murganho extraía-se um volume de sangue compreendido entre 0,5 e 1 c.c. deixando o animal vivo, para futura sangria, se necessário. O sangue era colectado em tubos de centrífuga de onde se extraía o soro.

2.7 — Plano de trabalho para o estudo do fenómeno «imunitário».

A existência de murganhos em que o S-37 regressou completamente e que se tornaram resistentes às reimplantações do tumor, levou-nos a considerar uma série de experiências no sentido de averiguar se o fenómeno «imunitário» dependia de um mecanismo celular, da existência de anticorpos circulantes ou dos dois factores.

Para inibir a possível reacção celular utilizou-se o RX, 400 r de irradiação de corpo inteiro. Deste modo irradiaram-se 46 murganhos em que se tinha dado a regressão completa do tumor e que foram reimplantados após a irradiação, 144 murganhos que foram em seguida implantados pela primeira vez e ainda 61 murganhos que, depois de irradiados e implantados pela primeira vez, começaram a ser injectados com soro «imune».

O estudo da transmissão de imunidade foi também feito em 67 murganhos injectados com o soro, após a implantação

do tumor. A quantidade de soro injectado nas veias atingiu um total de 2,2 c.c., dada em dias alternados, começando por 0,3 c.c. no dia da implantação, 0,3 c.c. dois dias depois, 0,2 c.c. no 4.º, 6.º e 8.º dias e 0,1 c.c. nos restantes dias.

Em todos os animais destas experiências, irradiados ou não, se estudou a evolução dos tumores e sobrevivências.

3 — RESULTADOS.

3.1 — Evolução do S-37 em murganhos CF₁.

Ao avaliar o comportamento dum tumor experimental em relação a determinada estirpe de animais em que é transplantedo, é necessário conhecer se todos os animais desenvolvem o tumor, como cresce e qual a evolução definitiva.

3.1.1 — Percentagem de murganhos que desenvolveram o tumor.

Num total de 809 murganhos implantados com o S-37, sem que qualquer factor externo directamente provocado possa ter influído na evolução do tumor, verificámos que 801 murganhos desenvolveram o sarcoma, ou seja, que 99 % dos animais foram susceptíveis à implantação.

A necessidade de conhecer se a quantidade de células utilizadas poderia influir nos resultados levou-nos à elaboração do Quadro I, onde se identificam as experiências, se indicam a quantidade de células, o número de murganhos e os resultados. Neste quadro podemos ver que mesmo com 50.000 células o S-37 se desenvolve em 100 % dos murganhos e que num total de 363 animais implantados, com células em suspensão atingindo 6×10^6 , a percentagem dos que desenvolvem tumor é, como no grupo primeiramente citado, de 99 %.

3.1.2 — Crescimento do tumor.

As células do S-37, inoculadas, originam um aumento de volume da coxa dos animais, correspondendo ao desenvolvi-

mento do tumor. As medidas do diâmetro da coxa, efectuadas com intervalos de dias, dão-nos uma ideia do modo de crescimento do tumor.

QUADRO I
**Desenvolvimento e cura espontânea do S-37 em murganhos CF₁,
em função do número de células inoculadas**

Experiência Número	Células × 10 ⁶	Murganhos inoculados	Murganhos com tumor	Percentagem de tumores	Cura espontânea	Percentagem de curas
23	0,05	20	20	100 %	7	35 %
23	0,1	18	17	94 %	12	70 %
23	0,5	21	21	100 %	8	38 %
36	1,0	20	20	100 %	6	30 %
13	1,1	7	7	100 %	1	14 %
20	1,2	16	16	100 %	5	31 %
43	1,2	11	10	100 %	2	20 %
49	1,2	50	49	98 %	20	41 %
25	1,3	10	10	100 %	0	0 %
37	1,3	12	12	100 %	4	33 %
20	1,4	10	10	100 %	3	30 %
20	1,5	20	20	100 %	5	25 %
23	1,5	10	10	100 %	0	0 %
31	1,5	31	31	100 %	6	19 %
32	1,5	11	11	100 %	3	27 %
50	1,5	33	33	100 %	3	10 %
34	2,5	10	10	100 %	4	40 %
23	3,0	11	11	100 %	2	18 %
38	6,0	24	24	100 %	4	17 %
23	6,0	18	18	100 %	4	22 %
Total		363	360	99 %	99	28 %

A figura 1 mostra as curvas de crescimento do S-37, nos murganhos da Experiência 23, divididos em 6 grupos conforme a quantidade de células injectadas: $0,05 \times 10^6$, $0,1 \times 10^6$, $0,5 \times 10^6$, $1,5 \times 10^6$, $3,0 \times 10^6$ e $6,0 \times 10^6$ células. Os pontos assinalados são as médias obtidas em todos os animais do grupo considerado. Pode verificar-se que as diferenças de crescimento são particularmente nítidas durante as 3 primeiras semanas. Já na 4.^a semana os tumores atingem volumes semelhantes em todos os grupos, o que indica que os tumores tendem a

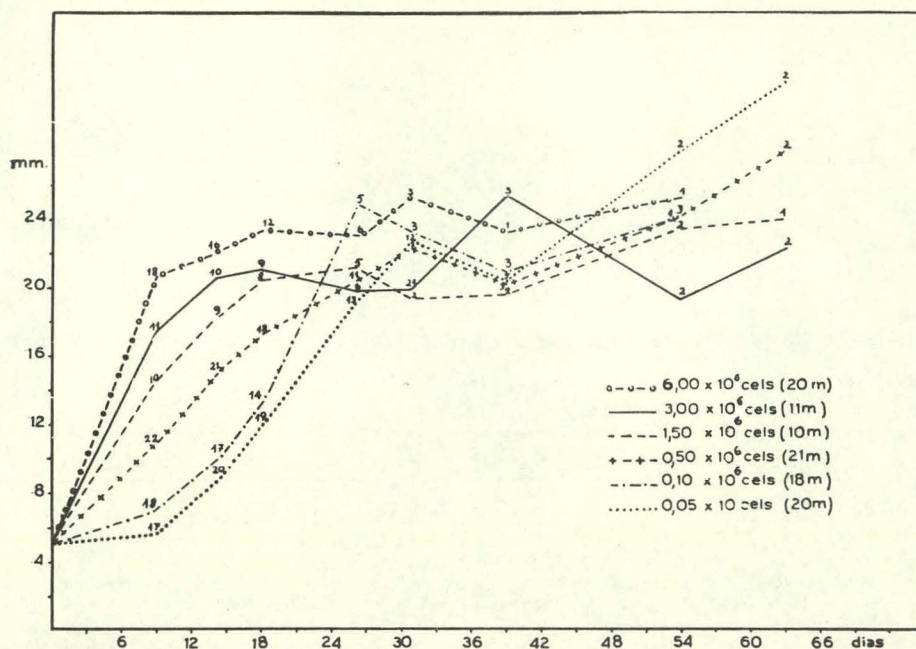


Fig. 1

Gráfico representativo do crescimento do S-37 em função da quantidade de células implantadas. Cada ponto representa a média da medida dos tumores do grupo considerado. Os números, em cada ponto representam a quantidade de murganhos medidos

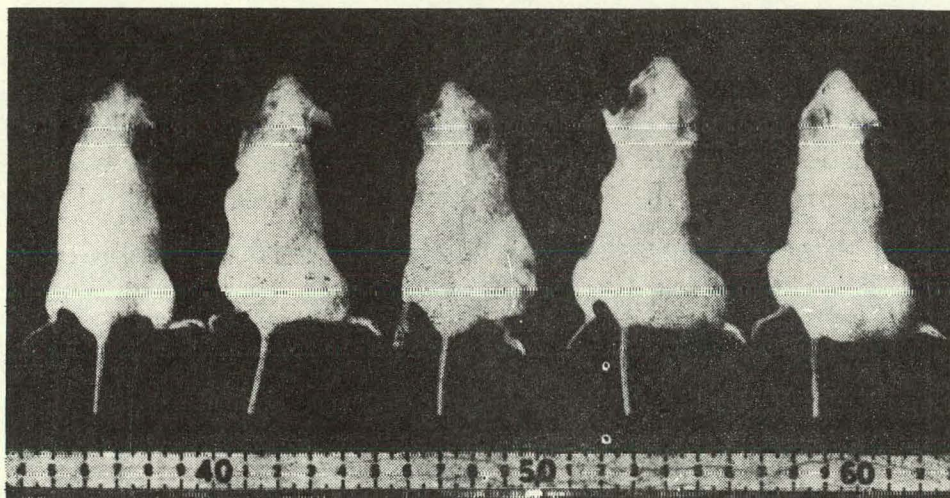


Fig. 2

Fotografia de murganhos CF₁, 15 dias depois de implantados com diferentes quantidades de células do S-37. Da esquerda para a direita, respectivamente, $0,05 \times 10^6$, $0,1 \times 10^6$, $0,5 \times 10^6$, $1,5 \times 10^6$, 3×10^6 e 6×10^6 . Notam-se bem as diferenças de tamanho dos tumores, dependentes da quantidade de células inoculadas

atingir um máximo de desenvolvimento independente da quantidade inicial implantada.

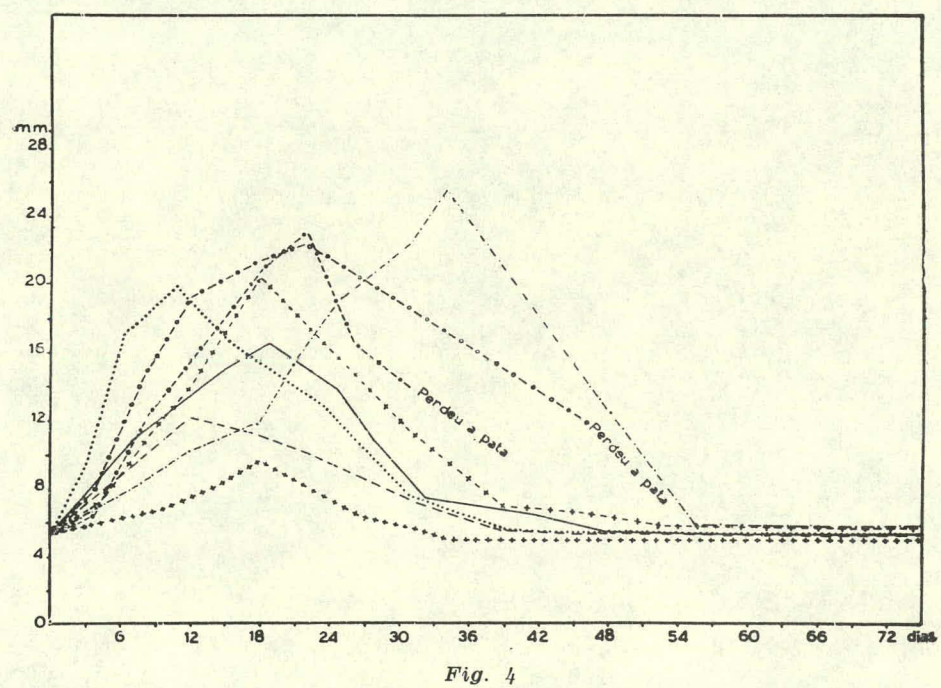
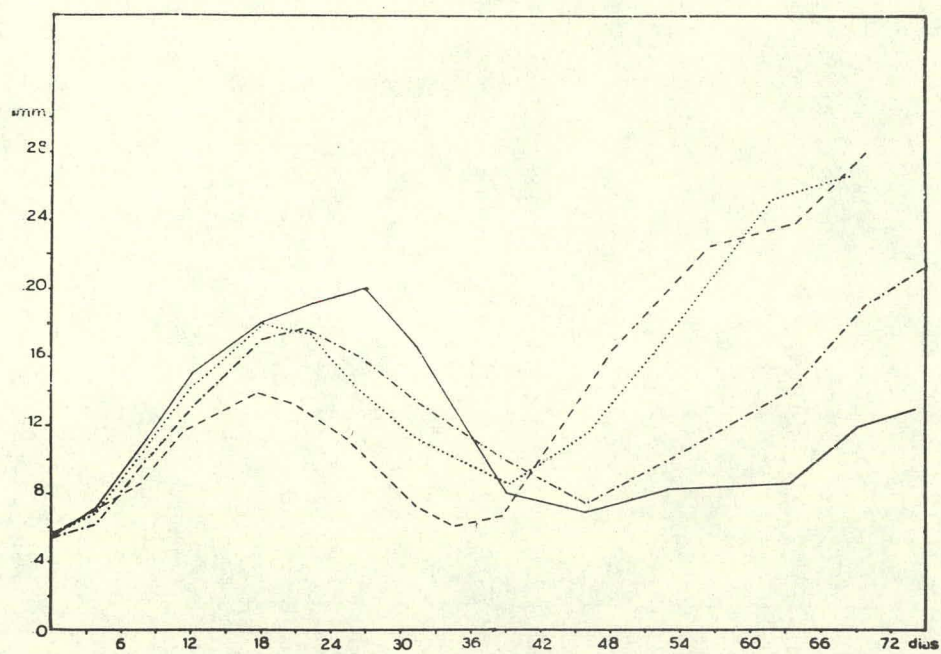
Conforme se pode observar nalgumas curvas de desenvolvimento, existem flutuações no crescimento parecendo que os tumores tendem a regressar. Se bem que isto aconteça no estudo individual dos tumores, no caso presente as interrupções no crescimento devem-se à falta dos murganhos que morrem ou que curam do sarcoma deixando ficar animais com tumores mais atrasados na evolução.

Na figura 2 mostram-se murganhos com S-37 em que são nítidas as diferenças de tamanho dos tumores ao fim de 15 dias de implantação, quando variou a quantidade de células inoculadas. Verifica-se que o volume do tumor depende da quantidade das células injectadas, sendo menor no murganho injectado com menos células e maior no inoculado com maior quantidade de células.

3.1.3 — Regressão de tumores e morte de murganhos.

Deixando evoluir naturalmente o S-37, o que mais frequentemente acontece na nossa experiência é a morte dos murganhos. Esta dá-se quase sempre por caquexia, se bem que também possa ser por ulceração do tumor e hemorragia, ou, infecção secundária. Em muitos murganhos que tivemos oportunidade de autopsiar nunca encontramos metastases macroscópicas do tumor que apenas revelava a sua malignidade pelo crescimento invasivo. Num grupo de 234 murganhos implantados com um número de células de S-37 entre $0,8 \times 10^6$ e $1,7 \times 10^6$ (fig 9) a média de vida dos murganhos foi de $36,35 \pm 14,3$ dias. Embora não tenhamos feito cálculos estatísticos para estudo de sobrevivências de murganhos em função da quantidade de células de S-37 implantadas, porquanto a população dos grupos era pouco numerosa, pensamos que a evolução mais rápida do tumor deve corresponder uma mais curta sobrevivência e que, portanto, esta deve estar na razão inversa do número de células.

Acontece, porém, que nalguns murganhos o tumor regressa levando, mesmo, à cura definitiva da doença.



A regressão de tumores está representada na figura 3, onde se mostram quatro curvas de desenvolvimento de S-37 em que súbitamente o tumor diminui de dimensões chegando quase a desaparecer. Em certa altura, contudo, a virulência do tumor recrudesce chegando a atingir grandes dimensões, o que origina a morte dos murganhos. Tudo se passa como se de uma luta entre o tumor e o hospedeiro, este, depois de estar a vencer, seja definitivamente vencido. Em 3 % dos murganhos encontram-se evoluções do sarcoma, deste tipo.

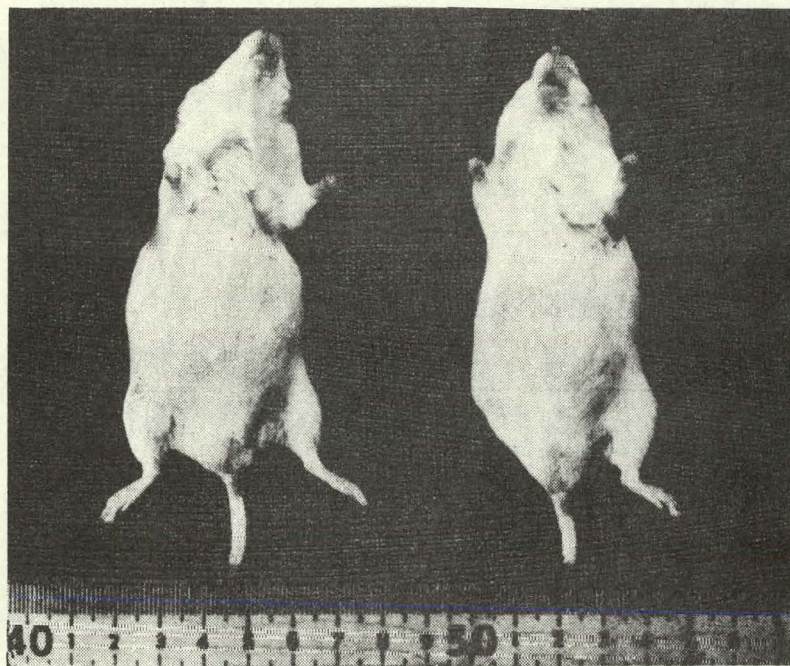


Fig. 5

Fotografia de murganhos CF₁ que se curaram do S-37, o da esquerda com integridade do membro implantado, o da direita com amputação total, espontânea, do membro.

A regressão definitiva é a mais frequente. Na figura 4 estão representadas diversas curvas da evolução do S-37 para a cura, representativas dos 99 murganhos que se curaram do tumor (Quadro I). Verifica-se que a regressão se dá com tumores de diferentes dimensões e que o início da regressão vai do 11.º ao 34.º dia da evolução do tumor. Contudo, o maior número de regressões dá-se depois da 2.ª semana. Nalguns animais a cura

do tumor é acompanhada por uma amputação espontânea, total ou parcial, da pata. A figura 5 mostra dois murganhos em que o S-37 regressou definitivamente, num sem deixar sequelas e noutro com amputação total do membro. A figura 6 mostra também dois murganhos curados do S-37, um com amputação de parte da pata e outro com cicatriz retrátil da pata.

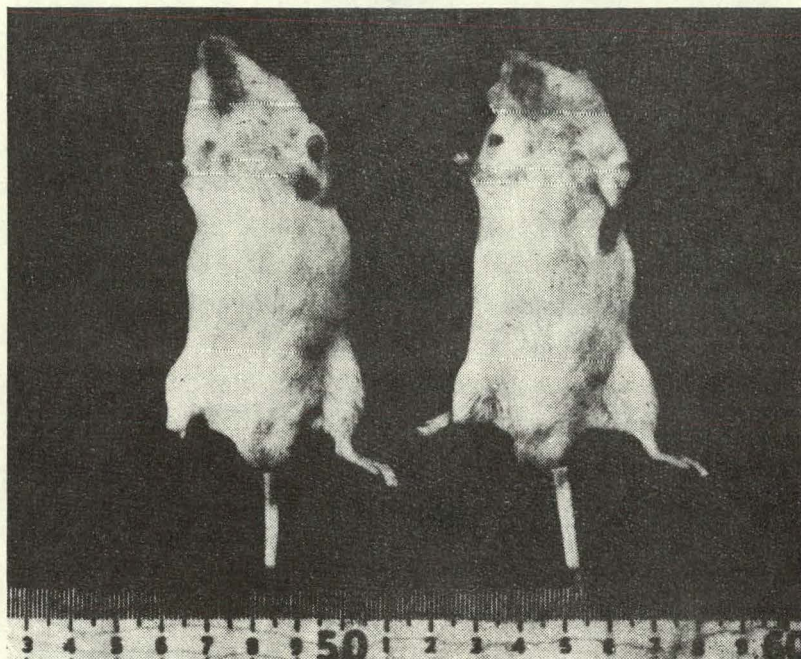


Fig. 6

Fotografia de murganhos CF₁ que se curaram do S-37, o da esquerda com amputação, espontânea, de parte da pata implantada, o da direita mostrando uma cicatriz retrátil no local da regressão do tumor.

A cura espontânea do S-37 em função do número de células implantadas, está representada no Quadro I e, em resumo, no Quadro II. A percentagem mais alta de curas (46 %) aparece no grupo implantado com menos de 1 milhão de células. Nos outros dois grupos as regressões definitivas foram semelhantes (24 % e 22 % respectivamente para valores de 1 a 2 milhões de células e de 2 a 6 milhões). No total de 363 murganhos a percentagem de curas do S-37 foi de 28 %.

Como já dissemos, todos os murganhos foram seguidos pelo menos dois meses depois da regressão e nalguns foi pos-

QUADRO II

Resumo de experiências para estudo da evolução do S-37 em função da quantidade de tumor implantado

Células inoculadas	$0,05 \times 10^6 \leq \text{cels} < 10^6$	$10^6 \leq \text{cels} < 2 \times 10^6$	$2 \times 10^6 \leq \text{cels} \leq 6 \times 10^6$	Total
Murganhos	59	241	63	363
Tumores	58	239	63	360
% tumores	98 %	99 %	100 %	99 %
Curas	27	58	14	99
% curas	46 %	24 %	22 %	28 %

sível ir aos 10 meses. Nunca nenhum voltou a desenvolver tumor.

3.2 — Reimplantações.

Nos murganhos em que os tumores se curaram espontaneamente reimplantou-se o tumor em pata diferente da primeira inoculação. Utilizaram-se nesta experiência 154 murganhos que foram reimplantados duas vezes, 108 murganhos três vezes, 58 quatro vezes e 12 cinco vezes (Quadro III). O número de

QUADRO III

Reimplantações do S-37 em murganhos CF₁ que curaram o S-37

Reimplantações			Testemunhas	
Número de vezes	Murganhos	Tumor	Murganhos	Tumor
2	154	1	166	165
3	108	2 *	100	100
4	58	0	40	40
5	12	0	20	20

* Estes tumores curaram-se espontaneamente.

tumores desenvolvidos foi apenas de 3, um na segunda reimplantação e 2 na terceira. Estes dois regressaram rapidamente. O correspondente à segunda reimplantação foi o único tumor que se desenvolveu até à morte do murganho.

Cada experiência teve sempre um grupo testemunha, representado também no Quadro III, em que apenas 1 murganho do controle da segunda reimplantação não desenvolveu o tumor.

3.3 — Influência da irradiação de corpo inteiro no desenvolvimento do S-37.

3.3.1 — Em murganhos que curaram o tumor.

Foram utilizados nesta experiência 46 murganhos que foram submetidos a uma dose de 400 r, corpo inteiro, antes da reimplantação do S-37. Quatro murganhos desenvolveram tumores que cresceram pouco e regressaram completamente. Do grupo testemunha, todos os 135 murganhos desenvolveram o tumor, na forma usual.

Dos animais irradiados, apenas 1 morreu, sem tumor, um mês depois de irradiado. Todos os outros sobreviveram além de 2 meses.

3.3.2 — Em murganhos normais.

Nos murganhos irradiados com 400 r, dose de corpo inteiro, o S-37 desenvolveu-se em 100 % de 144 e curou-se espontaneamente em 18 %. No grupo testemunha, de 133 murganhos, o S-37 desenvolveu-se em 98 % e regressou definitivamente em 30 % (Quadro IV).

QUADRO IV
Evolução do S-37 em murganhos irradiados com 400 r

Experiência	Animais irradiados				Testemunhas			
	Murganhos	Tumores	Curas	% curas	Murganhos	Tumores	Curas	% curas
29	18	18	6	33 %	13	13	5	37 %
31	29	29	7	24 %	31	31	6	18 %
36	27	27	0	0 %	19	19	5	26 %
43	20	20	7	35 %	20	18	6	33 %
49	50	50	5	10 %	50	49	18	37 %
Total	144	144	25	18 %	133	130	40	30 %

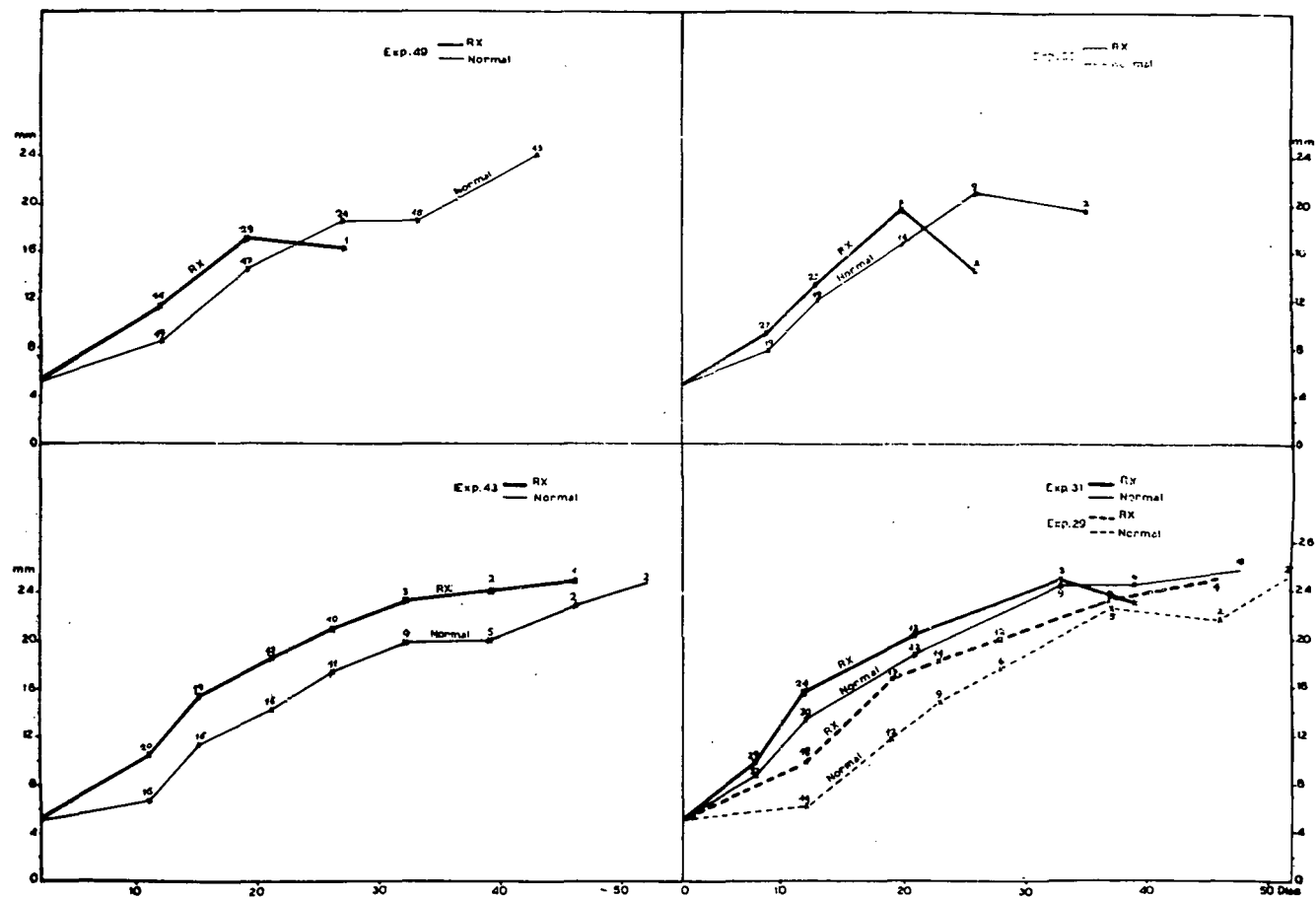


Fig. 7

Gráficos representando a evolução do 3-37 em murganhos previamente irradiados com RX, dose 400 r, corpo inteiro (traços grossos) e a evolução nos grupos testemunhas não irradiados (traços finos). Cada ponto é a média das medidas dos murganhos do grupo considerado. Os números representam a quantidade de murganhos medidos

O desenvolvimento dos tumores nos animais irradiados está representado nos gráficos da figura 7 onde também se mostra o crescimento do S-37 nos grupos testemunhas. Os pontos traçados correspondem à média do crescimento dos tumores em cada grupo. Verifica-se, nos murganhos irradiados, que o tumor cresce nas primeiras semanas sempre mais rapidamente, do que nos não irradiados que acabam por atingir dimensões comuns aos submetidos à radiação.

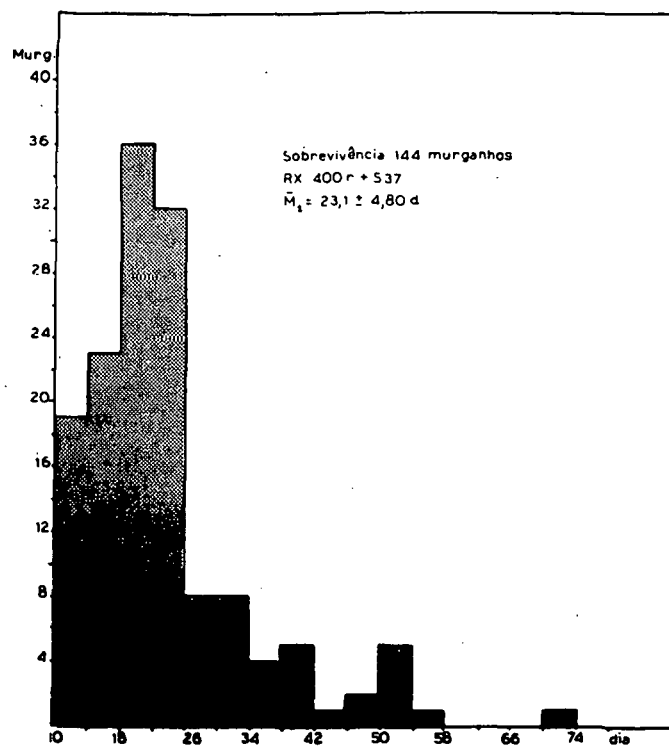


Fig. 8

Histograma relativo à sobrevivência de murganhos CF₁ irradiados com RX, 400 r, corpo inteiro, e implantados com S-37

A sobrevivência de animais irradiados com 400 r e implantados com S-37, com uma quantidade de células de cerca de 1 milhão, comparada com um grupo controle, não irradiado e transplantado com uma quantidade de células da mesma ordem de grandeza, é nitidamente inferior no grupo dos murganhos irradiados.

A média de vida dos murganhos irradiados é de $M_1 = 23,10 \pm 4,80$ dias e no grupo não irradiado é $M_2 = 36,35 \pm 14,30$ dias. O erro padrão das amostras é de 1,036 dias. A diferença de valores médios $M_2 - M_1 = 11,1$ dias, muito maior do que duas vezes o erro padrão e portanto altamente significativa quanto à diferença das duas populações.

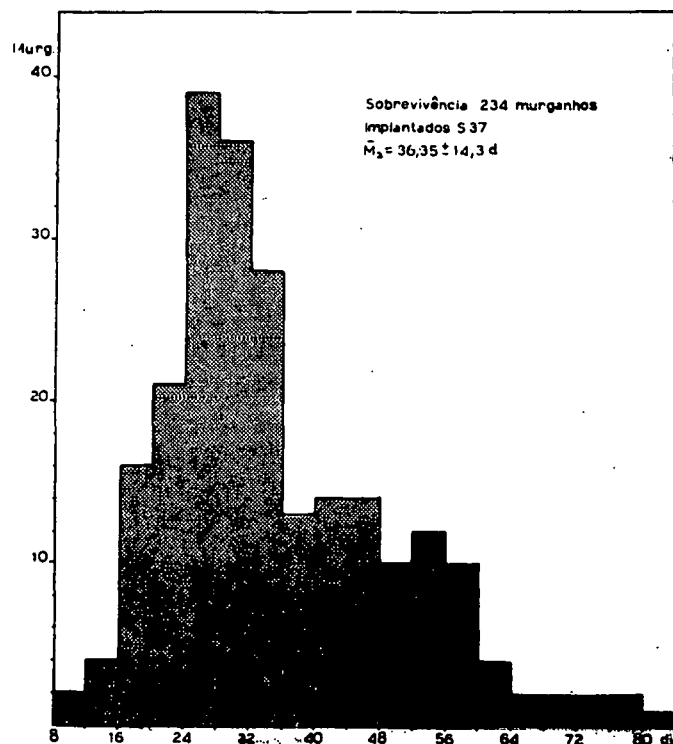


Fig. 9
Histograma relativo à sobrevivência de murganhos CF₁,
implantados com S-37, mas não irradiados

As figuras 8 e 9 mostram o histograma representativo dos dois grupos considerados. A figura 8 refere-se à sobrevivência de 144 murganhos irradiados com 400 r e que morreram com o S-37, a figura 9 é respeitante à sobrevivência de 234 murganhos que morreram com o sarcoma.

3.4 — Influência do soro «imune» na evolução do S-37.

3.4.1 — Em murganhos irradiados e implantados com o S-37.

Foram irradiados 61 murganhos com 400 r, irradiação de corpo inteiro, que em seguida foram implantados com S-37 e começaram a ser injectados com soro de murganhos curados do sarcoma. Como testemunhas empregaram-se 70 murganhos, nas mesmas condições, mas que não levaram soro (Quadro V).

QUADRO V

Influência do soro «imune» em murganhos irradiados e implantados com S-37

Experiência		Murganhos	Tumores	Curas	% curas
Exp. 43	RX-400	20	20	7	35 %
	RX-400 + soro	15	15	4	26 %
Exp. 49	RX-400	50	50	5	10 %
	RX-400 + soro	46	46	11	23 %
Total	RX-400	70	70	12	17 %
	RX-400 + soro	61	61	15	25 %

Nos dois grupos o tumor desenvolveu-se em 100 % dos animais e regressou em 17 % das testemunhas e 25 % dos murganhos injectados com soro. Referente a estes dois grupos a prova de significação estatística do X^2 deu para este valor igual a 1,12, uma probabilidade $P = 0,30$ o que é pouco significativo. A evolução do S-37 no que respeita a crescimento e sobrevivência, foi semelhante nos dois grupos.

3.4.2 — Em murganhos implantados com S-37 mas não irradiados.

Dos 68 murganhos injectados com soro, desenvolveram tumor apenas 63 (92 %). No grupo controle de 61 murganhos

o S-37 desenvolveu-se em 59 (97 %) (Quadro VI). As curas espontâneas foram de 37 % nos dois grupos. O crescimento do tumor e as sobrevivências, igualmente, não foram influenciados pela injeção de soro.

QUADRO VI
Influência do soro «imune» em murganhos implantados com S-37
mas não irradiados

Experiência		Murganhos	Tumores	Curas	% curas
Exp. 43	S-37	11	10	2	20 %
	S-37 + soro	19	18	8	44 %
Exp. 49	S-37	50	49	20	40 %
	S-37 + soro	49	45	15	33 %
Total	S-37	61	59	22	37 %
	S-37 + soro	68	63	23	37 %

4 — CONCLUSÕES E DISCUSSÃO.

I — O S-37 desenvolveu-se em 99 % das implantações efectuadas em 809 murganhos machos da estirpe CF₁, de idade entre 8 e 10 semanas. Esta percentagem está de acordo com resultados obtidos por ANDERVOT (1) e LETTER e KLINE (34) com o mesmo tumor e em estirpes diferentes.

O estudo da influência da quantidade de células implantadas, no desenvolvimento do tumor revelou que se obtinha a mesma percentagem de desenvolvimento do tumor inoculado desde $0,05 \times 10^6$ a 6×10^6 células. A quantidade de células influiu no ritmo de crescimento dos tumores, ocasionando uma nítida diferença de dimensões particularmente até à terceira semana de evolução (figs. 1 e 2). Notou-se ao fim da quarta semana uma tendência para a uniformidade do tamanho dos tumores que não deixaram, contudo, de crescer, mas a um ritmo mais lento.

Além da quantidade de células implantadas influir no crescimento inicial mais ou menos rápido do tumor, também influiu nas curas espontâneas. Se bem que o número de animais

utilizados nos diferentes grupos não permita conclusões definitivas, parece, contudo, que a vida média dos murganhos também depende da quantidade inicial de células inoculadas, uma vez que o volume do tumor atinge tanto mais rapidamente os valores máximos de desenvolvimento, quanto maior o número de células injectadas.

II — A evolução natural do S. 37 segue duas alternativas: ou regressa espontâneamente e se cura, ou evolui até à morte do hospedeiro, que é o mais frequente.

A média de vida dos murganhos que morrem com o S-37, num grupo de 234 implantado com uma quantidade de células entre $0,8 \times 10^6$ e $1,7 \times 10^6$ (a quantidade mais empregada nas nossas experiências) foi de $36,35 \pm 14,3$ dias.

O fenómeno da regressão espontânea deu-se em 28 % da totalidade dos murganhos, independentemente da quantidade de células inoculadas. LETTER e KLEIN (34) descrevem-no entre 0 e 78 % em treze estirpes totalizando 2.000 murganhos, sendo de 67 % nos murganhos CF₁. DILLER, BECK e BLAUCH (7) observaram regressão do S-37 em 27 % de murganhos CF₁, fêmeas e 14 % em machos. Nenhum dos autores refere a quantidade de células neoplásicas implantadas.

Quando se considerou a importância do número de células na regressão (Quadro II) verificou-se que, abaixo de 1 milhão se encontraram mais regressões (46 %) do que nos outros dois grupos com maior quantidade de células (22 % e 25 % de regressões respectivamente entre 1 e 2 milhões e entre 2 e 6 milhões de células). É de supor que a influência da quantidade de células na regressão, dependa da evolução mais lenta dos tumores provenientes de menor quantidade implantada. Deste modo o animal tem mais oportunidade de oferecer a sua resistência, específica ou não, ao desenvolvimento do tumor que se mantém mais tempo e de menores dimensões em contacto com o hospedeiro. RUSSEL (49) já havia chamado a atenção para o facto de tumores que se desenvolviam pouco, servirem de mais «eficiente antigénico».

O aspecto da luta entre o tumor e o hospedeiro é bem evidente nas regressões temporárias (fig. 3) em que o tumor

depois de ter diminuído muito de tamanho, volta a desenvolver-se matando o animal. A regressão parcial observou-se em 3 % dos nossos animais.

Nas regressões definitivas os murganhos foram seguidos entre 2 e 10 meses, sem que tenham sido observadas recidivas.

A maior frequência de regressões do tumor iniciou-se depois da segunda semana de evolução (fig. 4), com tumores de dimensões variadas. Este é mais um dado sugestivo da produção de substâncias antitumor, resultantes de mecanismos de defesa ainda não esclarecidos (1, 2, 36, 40 e 57) aos quais a imunidade não deve ser estranha, tanto mais que a produção de anticorpos é um fenómeno progressivo necessitando de um certo tempo para atingir os níveis máximos (54).

III — A reimplantação de murganhos que se curaram espontâneamente do S-37 revelou que os animais passaram a ser resistentes ao tumor, mesmo à quinta tentativa de implantação. Fizeram excepção 1 em 154 murganhos, que morreu com tumor e dois que desenvolveram um pequeno tumor que regressou. Esta resistência à implantação já citada por TYZZER (57) em 1916, com diversos tumores em murganhos e ratos, tem sido posteriormente comprovada e nela se têm baseado numerosas investigações que procuram explicar o fenómeno pela imunidade (9, 26, 28, 37, 44, 45 e 51).

IV — A investigação do fenómeno «imunitário», sugerido pela resistência dos murganhos «imunes» à reimplantação, levou-nos ao emprego do RX como inibidor dos mecanismos celulares.

A acção da radiação sobre os mecanismos de imunidade, tem sido, recentemente, motivo de interesse de alguns investigadores. A dose de radiações que inibe a produção do anticorpos referida por TALIAFERRO e TALIAFERRO (56) e estudada em pormenor por STONER (54 e 55) e HALE (22), levaram-nos a concluir que a dose de 400 r seria a mais conveniente para os nossos trabalhos, uma vez que é suficiente para inibir a produção de anticorpos sem provocar a morte de grande número de animais. O intervalo de tempo entre a irradiação

e a implantação do tumor foi sempre apenas de algumas horas de acordo com experiências de FITCH, WISSLER, LAVIA e BARKER (13) e MAKINOHIAN e GEMGOZIAN (35).

Uma vez que a irradiação, nestas circunstâncias, não afecta anticorpos circulantes mas apenas o mecanismo celular que os produz ou que é directamente responsável pelos fenómenos imunitários, as nossas experiências começaram pela irradiação dos murganhos resistentes à reimplantação do S-37. Num grupo de 46 animais apenas 4 desenvolveram um pequeno tumor que rapidamente regressou. Este resultado parece indicar que a resistência ao tumor se dá principalmente ao nível humoral se bem que não seja de desprezar um provável factor celular (36).

A irradiação de murganhos normais seguida da primeira implantação do S-37 mostrou que 100 % dos animais desenvolveram o tumor que cresceu mais rapidamente do que os do grupo testemunha (Fig. 7) e que sobreviveram menos tempo que os do grupo não irradiado, conforme o provou o cálculo estatístico efectuado (Figs. 8 e 9).

No que diz respeito a regressões verificaram-se nos murganhos irradiados, 18 % de curas espontâneas e 30 % nas testemunhas.

Conclui-se, portanto, que a dose de 400 r teve influência nítida sobre a evolução do tumor manifestada no crescimento, na regressão e na média de vida dos murganhos.

Se a irradiação inibiu a resposta imunitária ou actuou inespecificamente sobre as defesas do organismo não nos é possível decidir. O facto de murganhos irradiados apresentarem regressões do tumor, não exclui a presença de um mecanismo imunitário, pois o efeito inibidor da radiação desaparece ao fim de uma semana (13) com a recuperação progressiva da integridade celular. Nestas circunstâncias não se pode excluir que alguns animais recuperaram as suas defesas e reagiram contra o tumor.

O uso de doses maiores de RX tem a desvantagem de matar os animais não permitindo, portanto, tirar conclusões senão da fase respeitante ao desenvolvimento e evolução inicial do tumor.

V — A irradiação de murganhos normais alterou, como vimos, a evolução do S-37 implantado, mas não modificou

substancialmente a resistência à reimplantação de animais «imunes». Por esta razão se tentou averiguar se a «imunidade» era transmissível pelo soro.

Começámos por utilizar o soro «imune» em 61 murganhos irradiados e implantados com S-37 (Quadro V), e verificámos que o crescimento do tumor e as sobrevivências foram semelhantes ao grupo testemunha. As regressões foram em maior percentagem no grupo injectado com soro (25 %) do que no grupo controle (17 %) mas, no entanto, estatisticamente estes resultados não são significativos.

O soro «imune» injectado por via endovenosa em 68 murganhos implantados com S-37 não foi responsável por alterações significativas na evolução do tumor, quando comparado com o grupo testemunha (Quadro VI). No entanto teremos que averiguar a razão por que, apenas 92 % dos murganhos injectados com soro desenvolveram tumor, facto verificado pela primeira vez na nossa experiência e que poderá deixar uma porta aberta para futuras investigações.

A imunidade passiva dos tumores já foi objecto de estudo de TYZZER (57) em 1916, que não a demonstrou. Posteriormente tem sido investigada e os resultados não têm sido concordantes.

GORER e AMOS (17) referem que células de linfoma podem ser neutralizadas, in vitro, pelo anti-soro e observam transferência passiva de imunidade, com o que concorda HELLSTROM (25) no respeitante a cinco linfomas estudados, mas em sarcomas não conseguiu demonstrar este tipo de imunidade. MITCHISON (38 e 39) também considera o soro inefectivo na passagem de imunidade e observa que os tumores parecem crescer mais rapidamente quando os animais são injectados com o soro. KLEIN e SJOGREN (30) e KLEIN, SJOGREN e HELLSTRON (31) chegam a resultados que sugerem a existência de mecanismos imunitários, mas não os demonstram, o mesmo acontecendo com outros autores (48, 53 e 58).

Concluindo, podemos dizer que no respeitante ao fenómeno «imunitário» não nos foi possível transferir passivamente as propriedades «imunitárias» do soro de murganhos tornados resistentes ao S-37, a murganhos implantados recentemente com o tumor. O facto de animais tornados «imunes» não se

terem modificado com a irradiação, leva-nos a admitir, apesar de tudo, que algum factor deve existir no soro, que não se transmitiria por dificuldades técnicas associadas à conservação do soro «imune».

Agradecimentos

A realização deste trabalho só foi possível devido ao bom acolhimento que sempre nos dispensou o Dr. LEE FARR, director do Medical Research Center, de Brookhaven National Laboratory, pelo que lhe estamos muito agradecidos. Aos Drs. V. BOND e R. STONER estamos igualmente gratos pelos seus conselhos e orientação em muitas fases da investigação realizada. Ao Prof. Dr. E. LIMA BASTO queremos agradecer o seu interesse na nossa ida ao estrangeiro, bem assim ao Prof. Dr. ANTÓNIO BAPTISTA que pelo seu entusiasmo e amizade nos tornou possível o estágio em Brookhaven e ainda nos auxiliou nalgumas interpretações dos resultados apresentados.

Ao Instituto de Alta Cultura agradecemos a equiparação a bolseiro que nos foi concedida.

A preciosa ajuda técnica de Mr. L. COOK e Mr. W. LEHMAN não pode ser esquecida.

Sumário

A transplantação do S-37 foi estudada, tendo-se verificado que 99 % de 809 murganhos CF₁ desenvolveram o tumor. A evolução deste em função de uma quantidade de células variável foi analisada, tendo-se concluído que o número de células influi no crescimento inicial do tumor, na cura espontânea e na média de vida do murganho.

A reimplantação do S-37 em murganhos que se curaram do tumor revelou grande resistência dos animais ao sarcoma, mesmo à quinta tentativa de reinoculação.

A irradiação com RX de murganhos na dose de 400 r, de corpo inteiro, antes da implantação do S-37 tornou a evolução do tumor mais rápida, encurtou a média de vida dos murganhos e proporcionou uma mais baixa percentagem de curas espontâneas.

A irradiação dos murganhos «imunes» e reimplantados não alterou a reacção dos animais ao tumor. Não foi possível transmitir passivamente, pelo soro de animais «imunes» qualquer factor que influísse decisivamente na evolução do sarcoma, ainda que a percentagem de animais que desenvolveram o tumor tivesse sido de 92 %, a mais baixa em todo o nosso trabalho.

BIBLIOGRAFIA

- 1 — ANDERVONT, H. B. — The use of pure strain animals in studies of natural resistance to transplantable tumors. Pub. Health Rep., 52: 1885-1895, 1937.
- 2 — ANDERVONT, H. B. — Susceptibility of mice to spontaneous induced and transplantable tumors. Comparative study of 8 strains. Pub. Health Rep., 53: 1647-1665, 1938.
- 3 — BARRETT, M. K. — Some observations on the nature of «antigen» in tumor «immunity». Acta U. I. C. C., 15: 940-942, 1959.
- 4 — BASHFORD, E. F. — The behaviour of tumor cells during propagation. Imp. Cancer Research Fund, Fourth Sci Rep., 131-214, 1911.
- 5 — BUINAUSKAS, P., MCCREDIE, J. A., BROWN, E. R. e COLE, W. H. — Experimental treatment of tumors with antibodies. A. M. A. Arch. Surg., 79: 432-439, 1959.
- 6 — CARVALHO, S. — Preliminary experimentation with specific immunotherapy of neoplastic disease in man. I — Immediate effects of hyperimmune equine gammaglobulins. Cancer, 16: 306-330, 1963.
- 7 — DILLER, I. C., BECK, L. V. e BLAUCH, B. — Effect of adrenal cortical extract on the growth of certain mouse tumors. Cancer Research., 8: 581-589, 1948.
- 8 — DUNHAM, L. J. — A survey of transplantable and transmissible animal tumors. Journ. Nat. Cancer Inst., 13: 1295-1377, 1953.
- 9 — EICHWALD, E. J. — The mite of immunology. Cancer Research, 16: 918-920, 1956.
- 10 — EPSTEIN, M. A. — The fine structure of the cells in mouse sarcoma 37 ascitic fluids. J. Biophys. & Biochem. Cytol., 3: 567-576, 1957.
- 11 — EVERSON, C. E. e COLE, W. H. — Spontaneous regress of cancer; preliminary report. Annals of Surgery, 144: 336-383, 1956.
- 12 — FITCH, F. W. — Immunohistochemical study of Ehrlich ascites tumor. Arch. Pathol., 73: 144-160, 1962.
- 13 — FITCH, F. W., WISSLER, R. W., LAVIA, M. e BARKER, P. — The timing of antigen injection relative to whole body X — irradiation and the development of circulating antibody and the splenic histologic reaction in the rat. Journ. Immunology., 76: 151-160, 1956.
- 14 — FOLEY, E. J. — Antigenic properties of methylcholanthrene induced tumors in mice of the strain of origin. Cancer Research, 13: 458, 1961.

- 15 — FREUND, E. e KAMINER, G. — Über die Beziehungen zwischen Tumorzellen und Blutserum. *Biochem. Ztschr.*, 26: 312-324, 1910.
- 16 — GORER, P. A. — Some recent work on tumor immunity. *Adv. Cancer Research*, 4: 149-186, 1956.
- 17 — GORER, P. A. e AMOS, D. B. — Passive immunity in mice against the C₃BL Leukosis E. L. 4 by means of isoimmune serum. *Cancer Research*, 16: 338-343, 1956.
- 18 — GORER, P. A. e BOYSE, E. A. — Some reactions observed with reticulo-endotelial cells in mice. *Biological problems of grafting. Universitet de Liege* pp. 192-206, 1959.
- 19 — GRAHAM, J. B. e GRAHAM, R. M. — Antibodies elicited by cancer in patients. *Cancer*, 8: 409-416, 1955.
- 20 — GRAHAM, J. B. e GRAHAM, R. M. — The effect of vaccine on cancer patients. *Surg. Gyn. & Obst.*, 109: 131-138, 1959.
- 21 — HAALAND, M. — Contribution to the study of the development of sarcoma under experimental conditions. *Imp. Cancer Research Fund, Third Sci. Rep.*, 175-261, 1908.
- 22 — HALE, W. M. e STONER, R. D. — Effects of ionizing radiation on immunity. *Radiation Research*, 1: 459-691, 1954.
- 23 — HAUSCHKA, T. S. — Relationship between chromosome ploidy and histocompatibility in mouse astices tumors (abstract). *Cancer Research*, 12: 269, 1952.
- 24 — HAUSCHKA, T. S. e LEVAN, A. — Inverse relationship of sixteen transplantable tumors. *Exper. Cell Research*, 4: 457-467, 1953.
- 25 — HELLSTROM, K. E. — Cytotoxic effect of isoantibodies on mouse tumor cells in vitro. *Transpl. Bull.*, 6: 411-416, 1959.
- 26 — KALISS, N. — The transplanted tumor as a research tool in cancer immunology. *Cancer Research*, 21: 1203-1208, 1961.
- 27 — KALISS, N., MOLOMIT, N., HARRIS, J. e GAULT, S. — Effect of previously injected immune serum and tissue on the survival of tumors grafts in mice. *Journ. Nat. Canc. Inst.*, 13: 847-850, 1953.
- 28 — KIDD, J. — Does the host react against his own cancer cells? *Cancer Research*, 21: 1170-1183, 1961.
- 29 — KIDD, J. G. — Experimental necrobiosis aventure in cytopathology. *Proc. Inst. Med. Chicago*, 18: 50-60, 1950.
- 30 — KLEIN, E. e SJOGREN, H. O. — Humoral and cellular factors in homograft and isograft immunity against sarcoma cells. *Cancer Research*, 20: 452-461, 1960.
- 31 — KLEIN, G., SJOGREN, H., KLEIN, E. e HELLSTROM, K. E. — Demonstration of resistance against methylcholanthrene-induced sarcomas in the primary autochthonous host. *Cancer Research*, 20: 1561-1562, 1960.
- 32 — KNOCK, F. E. — Perfusion of chemically modified antibodies for the therapy of cancer. *Surg. Gynec. & Obstet.*, 111: 322-328, 1960.

- 33 — LANDY, M., MICHAEL, J. G., TRAPANI, R. J., ACHINSTEIN, M. W. W. e SHEAR, M. J. — An antibody complement system in normal serum lethal to mouse tumor cells. *Cancer Research*, 20: 1279-1291, 1960.
- 34 — LEITER, J. e KLINE, I. — Growth of sarcoma 37 in various mouse stocks. *Journ. Nat. Canc. Inst.*, 14: 449-454, 1953.
- 35 — MAKINODIAN, T. e GENGOZIAN, N. — Primary antibody response to a closely related heterologous antigen after varying doses of X-radiation and its significance to related biologic phenomena. *J. Immunology*, 81: 513-518, 1958.
- 36 — MIHICH, E. — Host defense mechanisms in the regression of sarcoma 180 in pyridoxine-deficient mice. *Cancer Research*, 22: 218-227, 1962.
- 37 — MILGROM, F. — A short review of immunological investigation on cancer. *Cancer Research*, 21: 862-868, 1961.
- 38 — MITCHISON, N. A. — Passive transfer of transplantation immunity. *Proc. Roy. Soc. London S. B.*, 142: 72-87, 1954.
- 39 — MITCHISON, N. A. — Studies on the immunological response to foreign tumor transplants in the mouse. I — The role of lymph node cells in conferring immunity by adoptive transfer. *Journ. of Exp. Medicine*, 102: 157-177, 1955.
- 40 — MOLONEY, J. B. — Biological studies on a lymphoid leukemia virus extracted from Sarcoma 37. *Journ. Nat. Canc. Inst.*, 24: 933-954, 1960.
- 41 — MORITA, H. — Studies on the influence of general immunity upon the growth of malignant tumors. *Nagoya Med. Journ.*, 5: 19-29, 1959.
- 42 — MORTON, J. J. — The resistance to cancer. *Surgery*, 40: 641-656, 1956.
- 43 — NARCISSOV, N. V. e ABELEV, G. I. — Antibody formation in primary rat sarcomas induced with carcinogens. *Neoplasma*, 6: 353-359, 1959.
- 44 — PREHN, R. T. e MAIN, J. M. — Mobile resistance factor in acquired immunity to homologous tissue transplantation. *Journ. Nat. Cancer Inst.*, 14: 537-546, 1953.
- 45 — PREHN, R. T. e MAIN, J. M. — Immunity to methylcholanthrene induced sarcomas. *Journ. Nat. Cancer Inst.*, 18: 769-778, 1957.
- 46 — PRESSMAN, D. e DAY, E. D. — In vivo cross reaction in the localization of anti-rat tumor antibodies. The localization in other tumors of antibodies prepared against a particular tumor. *Acta U. I. C. C.*, 15: 971-975, 1959.
- 47 — RAPPORT, M. M. e GRAF, Z. — Cancer antigens: how specific should they be? *Cancer Research*, 21: 1225-1237, 1961.
- 48 — REVESZ, L. — Detection of antigene differences in isologous host-tumor systems by pretreatment with heavily irradiated tumor cells. *Cancer Research*, 20: 443-451, 1960.
- 49 — RUSSELL, B. R. G. — The manifestation of active resistance to the growth of implanted cancer. *Fifth Sc. Report Imperial Cancer Research Fund, London 1912*, 1.
- 50 — SCOTT, O. C. A. — Some observations on the use of transplanted tumors in radiobiological research. *Radiation Research*, 14: 643-652, 1961.

- 51 — SPENCER, R. R. — Tumor immunity. *Journ. Nat. Cancer Inst.*, 2: 317-332, 1942.
- 52 — STONE, M. J., DZOGA, K. e WISSLER, R. W. — Combined inhibitory effect of antitumor antibody and oncolytic virus on the solid Ehrlich tumor. *Laboratory Investigation*, 11: 306-310, 1962.
- 53 — LINH, D. B. e DUFOUR, D. — Etude de la survie des anticorpe isologue antitumeur chez le rat porteur de la tumeur de Walker. *Bulletin du Cancer*, 47: 427-433, 1960.
- 54 — STONER, R. D. e HALE, W. M. — Radiation effects on primary and secondary antibody responses. *Effects of ionizing radiations on immune processes*. Ed. Charles A. Leone, Gordon and Breach Science Publisher, New York, p. p. 183-219, 1962.
- 55 — STONER, R. D. — Radiation effects on immune mechanisms. *New York State Journ. of Medicine*, 63: 693-698, 1963.
- 56 — TALIAFERRO, W. H. e TALIAFERRO, L. G. — Further studies on the radiosensitive stages in hemolysin formation. *J. Infect. Diseases*, 95: 134-141, 1954.
- 57 — TYZZER, E. E. — Tumor Immunity. *Journ. Cancer Research*, 1: 125-153, 1916.
- 58 — WITEBSKY, R. N. R. e SHULMAN, S. — Studies of normal and malignant tissue antigens. *Cancer Research*, 16: 831-841, 1956.
- 59 — ZILBER, L. A. — A study of tumor antigens. *Acta U. I. C. C.*, 15: 934-938, 1959.