

Revisão e atualização sobre carcinogênese química cutânea

Maria Angélica Guzmán-Silva¹

Resumo

A pele de camundongo tem uma longa história como modelo experimental vantajoso no estudo da carcinogênese. As informações adquiridas através da indução química de tumores cutâneos indicam que o desenvolvimento neoplásico consiste de múltiplas etapas. As pesquisas mais recentes têm elucidado alguns dos eventos moleculares e celulares essenciais nas etapas de iniciação, promoção e progressão. Este artigo descreve os conceitos atuais sobre carcinogênese química cutânea multifásica e os mecanismos biológicos relacionados à iniciação tumoral.

Unitermos: Carcinogênese; iniciação; promoção; pele.

Histórico da indução química de neoplasias

A primeira observação relacionando uma substância química como agente etiológico de neoplasia foi realizada em 1775, quando Percival Pott associou a elevada incidência de tumores cutâneos em limpadores de chaminé com o fato desses indivíduos estarem continuamente expostos a fuligem. Só 140 anos depois, em 1915, Yamagiwa e Ichikawa comprovaram a existência de um agente químico cancerígeno, ao induzir experimentalmente tumores cutâneos em coelhos, através do pincelamento repetido das orelhas com alcatrão de hulha^(1,3).

Na década de 1930, o trabalho realizado por Cook e colaboradores possibilitou a extração do cancerígeno benzopireno (BP) do alcatrão da hulha. Na mesma época, outros pesquisadores efetuaram a síntese de diversos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP) cancerígenos, tais como dibenzantraceno (DBA), dimetilbenzantraceno (DMBA) e metilcolantreno (MC)^(3,4). O tratamento repetido da pele com qualquer uma das referidas substâncias induz à formação de tumores e constitui o chamado modelo cumulativo de carcinogênese cutânea.

Desde a década de 1920, os estudos feitos por Deelman indicavam a natureza bifásica da carcinogênese. Esse autor observou que, tratando a pele de camundongo com alcatrão até surgir o primeiro tumor, as feridas feitas nessa pele, previamente tratada, provocavam o crescimento de múltiplos tumores⁽¹⁾. Mas foi só na década de 1940 que Rous e sua equipe, ao estudar a relação exis-

tente entre cancerígenos, agentes irritantes hiperplásicos e produção de tumores na pele de coelhos, indicaram a existência de duas fases distintas na carcinogênese, sendo definidas como iniciação e promoção^(5,6). Uma das experiências consistiu no pincelamento das orelhas de coelhos com cancerígeno, por um determinado número de vezes; depois, as orelhas ainda aparentemente normais eram perfuradas, ocorrendo então a formação rápida de tumores no local das feridas.

Na mesma época, Berenblum⁽⁷⁾ determinou o efeito co-cancerígeno do óleo de cróton (OC) e da sua resina, ao aplicá-los na pele de camundongo juntamente com o cancerígeno. O OC é uma mistura complexa de substâncias lipídicas – ésteres de forbol – extraída das sementes da planta *Croton tiglium* L, que tem efeitos altamente flogísticos e hiperplásicos na pele^(8,10).

Entende-se por co-carcinogênese o fenômeno de aumento na produção de tumores, devido à interferência de um outro fator cancerígeno ou não, ao atuar simultaneamente com o cancerígeno original ou de forma sucessiva a ele. São co-cancerígenos agentes tais como radiações, vírus, irritantes inespecíficos e traumas. A carcinogênese com agentes iniciadores e promotores é considerada um modelo especial de co-carcinogênese^(1,11-13).

Ainda na década de 1940, Mottram simplificou os procedimentos experimentais, ao comprovar que uma única aplicação de cancerígeno, seguida de aplicações repetidas de OC, induz à formação de tumores⁽¹⁾. Estudos posteriores, aplicando-se a técnica de Mottram, confirmaram os conceitos de ini-

¹Professor Adjunto do Departamento de Patologia da Universidade Federal Fluminense.
Endereço para correspondência: Rua Marquês de Paraná, 303 – Niterói – RJ – CEP 24030-210.

ciação e promoção, descritos inicialmente por Rous e colaboradores^(14,15).

Ficou assim estabelecido o modelo bifásico de carcinogênese cutânea, e do ponto de vista operacional foram então definidos os seguintes aspectos:

a) A iniciação e a promoção são fases distintas mas interdependentes nessa seqüência para que a ação seja eficaz, isto é, iniciação seguida de promoção. Esse fenômeno foi comprovado pela experiência inversa, sendo empregado o promotor de forma prévia ao iniciador sem obter-se a formação de tumores⁽¹⁶⁾. A iniciação, sem o tratamento subsequente de promoção, não induz à formação de tumores durante toda a vida do animal. Nesta etapa ocorre a transformação de algumas células normais em células tumorais latentes.

b) A iniciação é um processo rápido e irreversível. O caráter permanente da iniciação foi demonstrado pela experiência do retardo da promoção por um ano, sendo comprovado que o intervalo de tempo entre a iniciação e a promoção não alterava o período de latência e só havia uma leve diminuição na incidência tumoral⁽¹⁷⁾. Para efetivar a iniciação é necessária apenas uma única aplicação de cancerígeno incompleto ou de uma pequena quantidade – dose subcancerígena – de cancerígeno completo. Entende-se por cancerígeno completo – DMBA, MC e outros HAP – aquele que induz à formação de tumores, seja com uma única dose maciça ou quando aplicado em pequenas doses de forma repetida, tendo então efeito cumulativo; portanto, possui atividade iniciadora e promotora. Já o cancerígeno incompleto só possui atividade iniciadora, como é o caso do uretano quando aplicado na pele^(18,19).

c) A promoção é um processo lento e gradual, que consiste na progressão de efeitos, os quais isoladamente são reversíveis, requerendo-se assim a exposição contínua da pele iniciada a agentes que provocam o crescimento de papilomas e de carcinomas em períodos mais prolongados de tratamento. Boutwell⁽¹⁾ demonstrou que o efeito promotor do OC só é efetivo quando este é aplicado numa quantidade suficiente de cada vez e com um intervalo de tempo não muito longo entre as aplicações.

Embora Berenblum⁽⁷⁾, ao utilizar a resina de OC, já tivesse observado um efeito co-cancerígeno mais acentuado do que o registrado com o OC bruto, a purificação, a identificação e a síntese dos ésteres de forbol, bem como do agente promotor mais potente na pele de camundongo, o 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA), devem-se, po-

rém, aos trabalhos realizados na década de 1960 pelas equipes de Hecker⁽²⁰⁾ e de Van Duuren⁽⁹⁾.

O conceito de carcinogênese bifásica foi posteriormente comprovado em diversos órgãos e tecidos, aplicando-se, em cada caso, modelos experimentais específicos, com iniciadores e promotores adequados^(1,11,21-23).

Ainda na década de 1960, Boutwell⁽¹⁾, mediante diversos estudos experimentais, demonstrou que o processo de promoção consiste em duas etapas, por ele definidas como conversão e propagação. Na conversão, pelo tratamento com algumas doses de OC, as células anteriormente iniciadas passam a ser células tumorais “adormecidas”. Na propagação, as células tumorais “adormecidas”, pelo estímulo subsequente com agentes irritantes, como terebintina, proliferam constituindo tumores visíveis. Portanto, pode-se considerar o OC, e por conseguinte o TPA, como promotores completos, dessa forma convertendo e propagando as células iniciadas, enquanto que a terebintina, outros irritantes e as feridas só têm atividade propagadora e são promotores incompletos.

No início da década de 1980, os estudos de Slaga e sua equipe^(24,25) e de Fürstenberger e colaboradores^(26,27), utilizando respectivamente mezeireína e 12-O-retinoilforbol-13-acetato (RPA), ambos diterpenos semelhantes ao TPA tanto na sua estrutura quanto nos seus efeitos biológicos, mas que são promotores incompletos dentro do modelo de carcinogênese trifásica – iniciação/conversão/propagação –, confirmaram e ampliaram o conceito de Boutwell, ao concluir que a promoção, e portanto a carcinogênese química, é um processo que consiste de múltiplas etapas, sendo individualizada ainda a progressão de papilomas e carcinomas^(28,29) (Figura 1).

Cada uma das diversas etapas envolve mecanismos específicos e, ainda, agentes inibidores e/ou modificadores afetam distintamente iniciação, conversão e propagação^(28,30-34).

A partir do reconhecimento de várias etapas no processo de carcinogênese, e considerando-se o efeito irritativo de diversas substâncias químicas, foi pesquisado o potencial cancerígeno destas e sua possível participação em etapas específicas do processo.

Substâncias oxidantes, como os peróxidos, demonstraram ser promotores tumorais em pele de camundongo previamente iniciada com HAP – DMBA, BP – ou com agentes alquilantes como metilnitro-N-nitrosoguanidina (MNNG)⁽³⁵⁻⁴⁰⁾. Particularmente, o peróxido de benzoíla (PB) também age na progressão tumoral, ou seja, no modelo

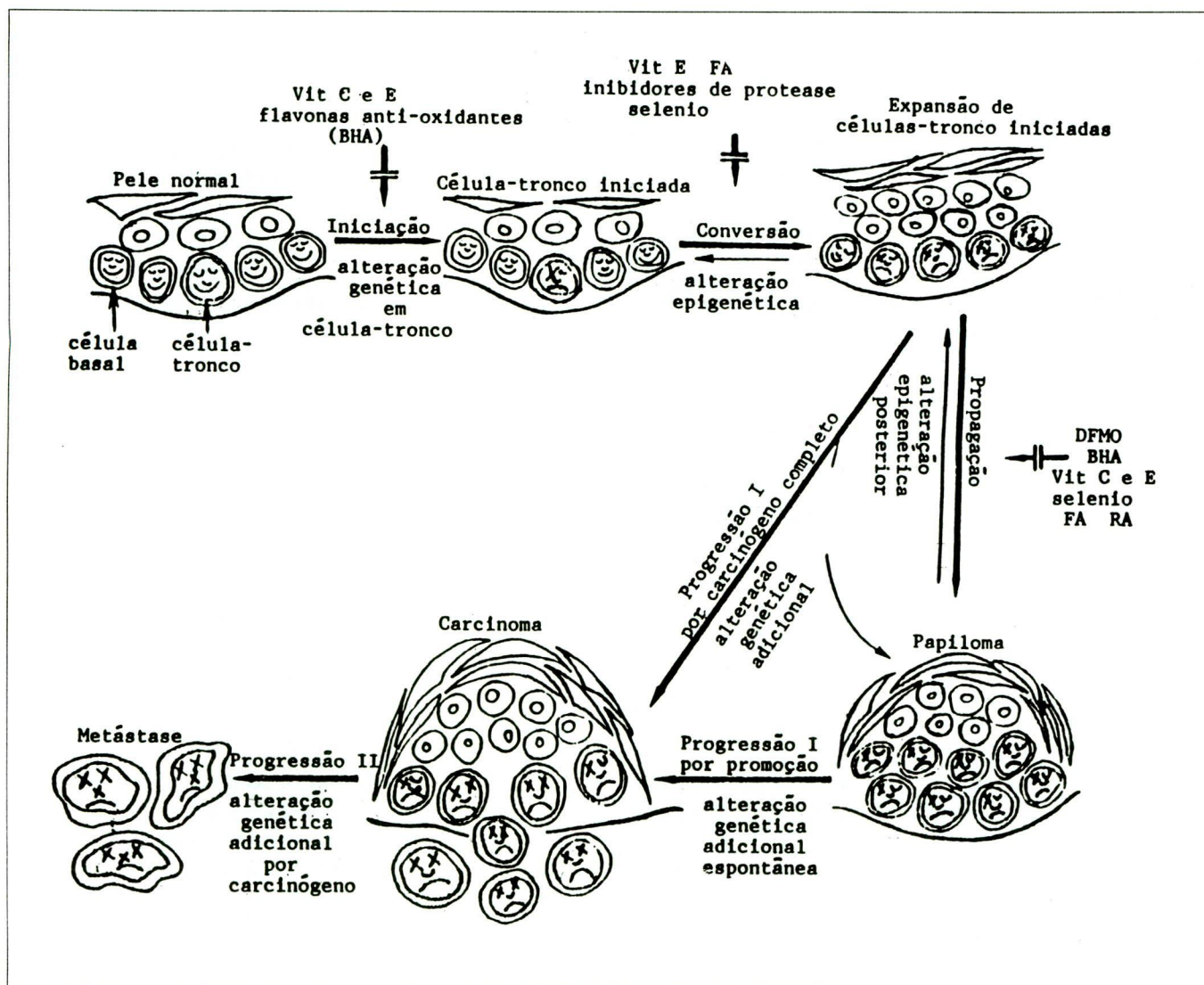


Figura 1 – Diagrama dos vários estágios da carcinogênese química cutânea, segundo Slaga e Butler⁽²⁸⁾.

iniciação – HAP/promoção – TPA/progressão – PB; o tratamento repetido de papilomas com PB aumenta significativamente o número de carcinomas e queratoacantomas⁽⁴¹⁾.

Estas observações experimentais geraram, na década de 1980, grande controvérsia quanto ao potencial cancerígeno do PB e ao risco existente para seres humanos expostos na vida diária a esta substância⁽⁴²⁻⁴⁵⁾.

O PB é um composto gerador de radicais livres, derivado de subprodutos do alcatrão de hulha e utilizado pelo homem, desde o início do século, por suas propriedades anti-sépticas, favorecendo a cura de feridas. Atualmente, o PB é largamente utilizado na indústria de plásticos e resinas como agente inicial da polimerização, na indústria alimentícia como agente de branqueamento de vários produtos – farinha, leite, queijo – e na indústria farmacêutica como agente terapêutico do *acné vulgaris*^(42,46). O conteúdo de PB nas diversas fórmulas

farmacológicas para tratamento tópico do acné, varia entre 5% e 10%^(38,39,42,43,46), sendo esta utilização a fonte potencial de risco carcinogênico mais discutida⁽⁴³⁻⁴⁵⁾.

Estudos preliminares sobre o efeito biológico do PB administrado por diversas vias – oral, subcutânea, tópica – em ratos e camundongos não demonstraram qualquer efeito carcinogênico desta substância⁽⁴⁷⁾. Entretanto, após análise da literatura existente até 1985, os pesquisadores da Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC) concluíram que as evidências sobre a carcinogenicidade em animais e humanos eram inadequadas, por haver falhas metodológicas nos delineamentos experimentais e/ou na apresentação dos resultados⁽⁴²⁾.

As evidências experimentais indicam que o PB exerce, sim, efeito promotor tumoral em pele de camundongo apenas quando da iniciação com HAP ou agente alquilante^(35-37,40), e não chega a influen-

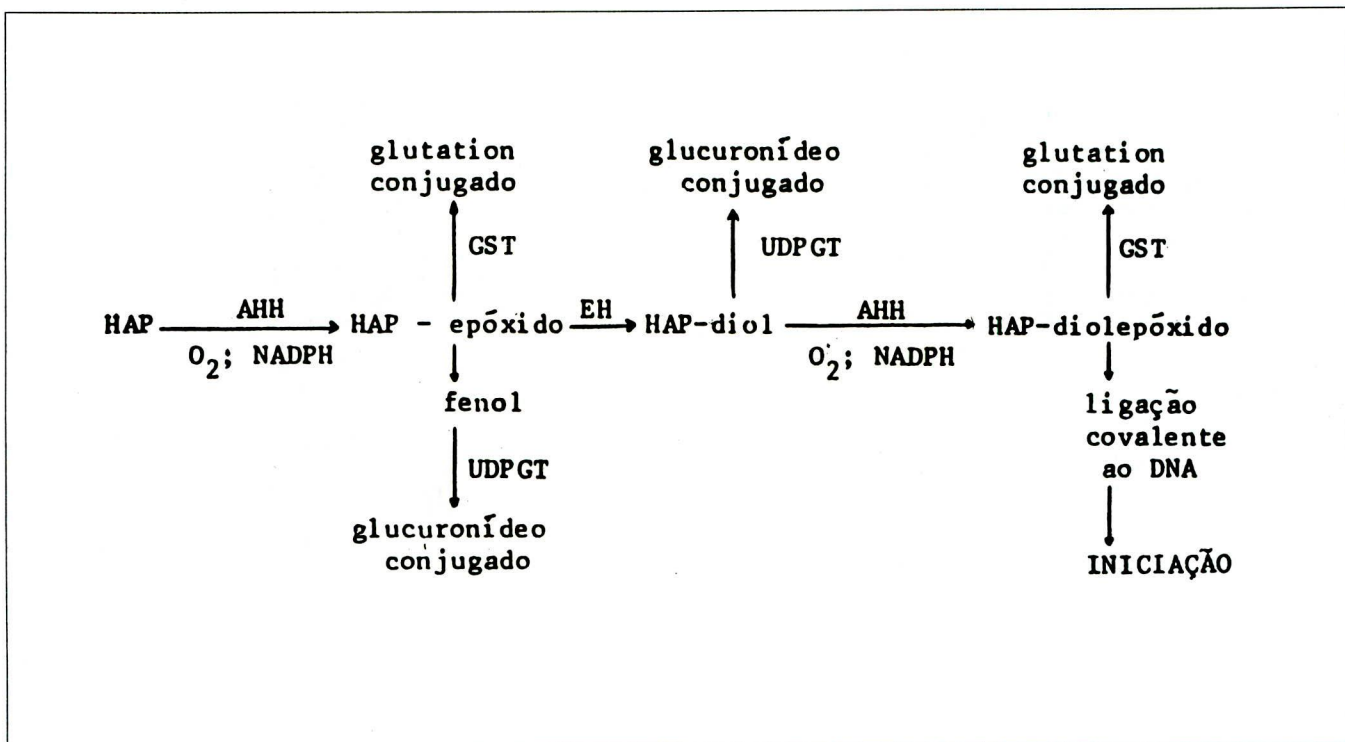


Figura 2 – Diagrama da iniciação, segundo Slaga e colaboradores⁽²⁵⁾.

ciar a carcinogênese cutânea iniciada por radiação UV^(38,39). Estas observações sobre a especificidade – espécie animal, iniciação química – do efeito promotor do PB têm sustentado a continuidade no uso desta substância como agente terapêutico do acné, uma vez que a carcinogênese cutânea humana é relacionada principalmente à exposição e radiação UV⁽⁴⁵⁾.

Mecanismos de ação

Iniciação

Hennings e Boutwell⁽⁴⁸⁾ afirmaram que nas células iniciadas a alteração crítica ocorre no DNA que normalmente não é transcrito em qualquer etapa do ciclo celular.

Yuspa e colaboradores⁽⁴⁾, ao referir-se à natureza irreversível da iniciação, sugeriram que a transformação de células normais em células tumorais latentes deveria envolver alterações na informação genética que controla o crescimento e a diferenciação celular. O fenótipo tumoral poderia resultar de modificações no material genético – DNA – ou poderia refletir efeitos epigenéticos, através de moléculas protéicas e RNA alterados. Em qualquer um desses eventos, a ligação covalente do carcinógeno químico a moléculas críticas na célula parece estar relacionada ao mecanismo de transformação neoplásica.

O estudo da interação dos HAP cancerígenos com as macromoléculas teciduais foi iniciado na década de 1950 por Miller⁽⁴⁹⁾, que confirmou a ligação do cancerígeno BP com proteínas da pele de camundongo. Posteriormente, Brookes & Lawley⁽⁵⁰⁾ demonstraram a ligação de vários HAP cancerígenos com DNA, RNA e proteínas isolados de pele de camundongo, e acharam que há uma boa correlação entre a quantidade de HAP ligada ao DNA e a potência cancerígena deles, correlação essa que não existe na ligação com RNA ou proteínas. Os autores, empregando métodos de extração do HAP ligado ao DNA, indicaram a ocorrência de ligação covalente entre essas moléculas, baseados na resistência da extração do HAP. A relação da ligação dos HAP ao DNA de origem epidérmico com a carcinogenicidade deles foi confirmada por Goshman & Heidelberg⁽⁵¹⁾ e, mais tarde, por Slaga e sua equipe^(25,30).

Sabe-se, atualmente, que os HAP requerem ativação metabólica para interagir com as macromoléculas teciduais. Existe na pele e em outros órgãos-alvo, um sistema enzimático microsomal que consiste de um grupo de oxidases de função associada, denominado arilhidrocarbonetohidroxilase (AHH) e relacionado ao sistema citocromo P-450. Esse sistema enzimático metaboliza os HAP em epóxidos que, seguindo diversas vias, resultam na detoxificação ou na ativação da forma original –

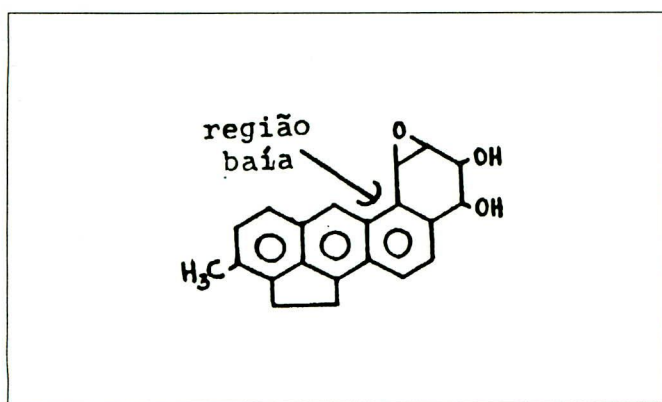


Figura 3 – Estrutura de 9,10-diolepóxido de 3-metilcolantreno, mostrando a “região baía”.

pró-cancerígeno – para formas reativas eletrofílicas que agem como cancerígeno terminal^(2,4,13,25,52).

De acordo com Van Lancker⁽²⁾, o epóxido, produto da oxidação do HAP, mediada pela enzima AHH, pode:

- reagir espontaneamente com grupos nucleofílicos de proteínas, RNA e DNA;
- ser conjugado com glutation, através da enzima glutation-S-epoxidotransferase (GST);
- isomerizar-se espontaneamente, formando fenol, que por sua vez se conjuga ao ácido glucurônico ou a radicais sulfato;
- ser hidratado pela ação da enzima epoxidohidrase (EH), originando dihidrodiol.

O produto dihidrodiol pode entrar num outro ciclo de ativação metabólica, mediada também por oxidases microssômicas, dando origem a diolepóxidos, que têm uma potência cancerígena muito maior que o epóxido de origem⁽²⁵⁾ (Figura 2).

Eastman e Bresnick⁽⁵³⁾ estudaram o metabolismo do MC e a ligação dos produtos metabólicos ao DNA. A cromatografia do produto da incubação de MC com microssomas isolados de fígado de rato, revelou 17 metabólitos que, submetidos a metabolismo adicional, ligavam-se ao DNA com uma eficiência variável, sendo que sete metabólitos eram mais efetivos que o HAP de origem. O maior percentual de ligação ao DNA foi obtido com o metabólito identificado como trans-9,10-dihidrodiol, isso devido provavelmente ao metabolismo subsequente, que originaria o diolepóxido correspondente na “região baía” do HAP.

Ao ser estudada a atividade tumorigênica de diversos metabólitos do MC na pele de camundongos CD-1, observou-se uma maior atividade com o hidróxi-9,10-dihidrodiol, apesar de que outros metabólitos também mostraram atividade superior ao MC⁽⁵⁴⁾. Já outros autores, ao utilizar diversos dihidrodiois derivados de MC, em camundongos

da mesma linhagem referida acima, acharam que o 9,10-dihidrodiol, embora tendo atividade iniciadora, não era, todavia, superior à obtida com o HAP de origem⁽⁵⁵⁾.

Muito embora exista alguma discrepância quanto ao metabólito mais efetivo, ambos trabalhos reforçam a teoria da “região baía”, que se refere à ativação dos HAP. De acordo com essa teoria, o cancerígeno terminal de um HAP é o diolepóxido, formado em carbonos vizinhos, relacionados à “região baía”⁽⁵⁶⁾, a qual ocorre no HAP pela fusão angular de anéis benzênicos (Figura 3). A potência cancerígena desse diolepóxido pode, inclusive, ser incrementada pela presença de grupo metilo na “região baía”^(57,58).

Há referências na literatura, indicando que o cancerígeno se liga de forma preferencial às bases purínicas, e que essa ligação ao DNA não requer divisão celular e ocorre predominantemente na fase de síntese⁽⁵⁹⁾. Além disso, existe um outro fator que interfere no processo de iniciação: é o mecanismo de reparo do DNA^(2,21,52,60).

Na década de 1980, com o surgimento da teoria dos oncogenes a partir dos estudos com retrovírus, e a constatação do elo entre oncogenes e componentes protéicos das vias de comunicação intracelular, pode-se entender que qualquer aberração no funcionamento desses genes poderia levar a distúrbios do crescimento celular típicos de neoplasia^(52,61,62).

Dentre os diversos oncogenes identificados, alguns são relacionados ao ciclo celular proliferativo, outros a fatores de crescimento – PDGF – ou a receptores – tirosina quinase – para fatores de crescimento, e ainda, outros são relacionados aos sistemas que participam da transdução de sinais a partir da membrana celular, como proteína G e via do inositol^(52,61) (Figura 4).

Os oncogenes podem ser ativados por diversos mecanismos, tais como mutação pontual, amplificação gênica ou translocação, sendo que todas essas mutações são efetivamente induzidas por vários agentes químicos, sejam HAP – DMBA – ou carcinógenos alquilantes como MNNG⁽⁶³⁾.

Dentre os diversos oncogenes atualmente reconhecidos, a indução de mutações específicas no gene *Ha-ras* tem-se verificado mais constantemente em tumores cutâneos induzidos quimicamente. Essas mutações explicam-se pela interação do carcinógeno terminal com o gene alvo durante a etapa de iniciação⁽⁶⁴⁻⁶⁸⁾.

Balmain e sua equipe tem demonstrado que uma alta percentagem, > 90%, dos tumores cutâneos, papilomas e carcinomas, iniciados com

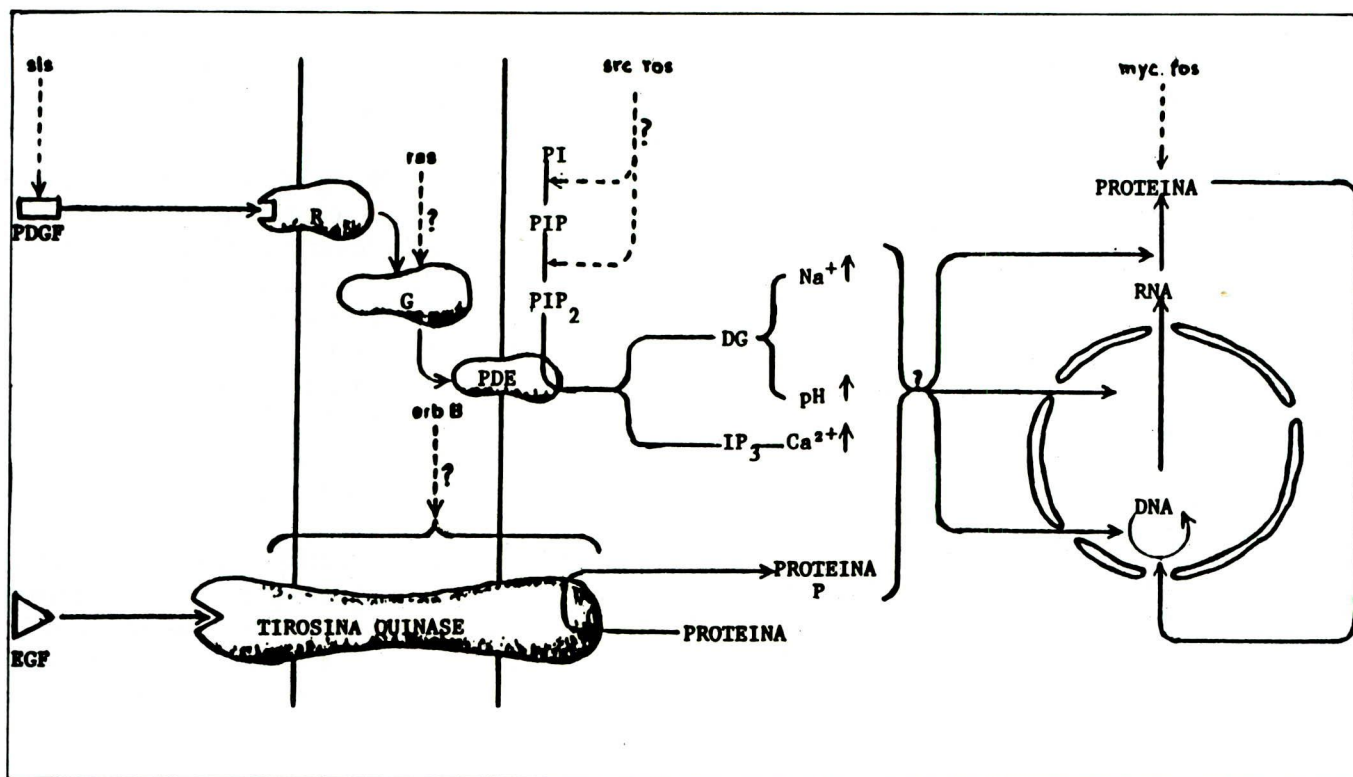


Figura 4 – Diagrama do controle do crescimento celular via "segundo mensageiro" e oncogenes, segundo Berridge⁽⁶¹⁾.

DMBA, exibem uma única mutação pontual no codon 61 do gene *Ha-ras*; já tumores iniciados com MNNG não apresentam esta mesma mutação^(23,63).

Outras evidências da relação entre iniciação e ativação de oncogenes específicos correspondem aos resultados da transfecção do oncogene *Ha-ras* em células epidérmicas murinas, a qual determina alterações no programa de diferenciação epidérmica, similares às exibidas por células tumorais⁽⁶⁹⁾, bem como crescimento tumoral quando as células transfectadas são inoculadas em camundongo atímico⁽⁷⁰⁾.

Ainda na década de 1980, diversas experiências *in vitro*, realizadas por Yuspa e colaboradores, esclareceram a possível alteração biológica das células iniciadas, que expressam uma capacidade de proliferar em condições nas quais as células normais não proliferam e são determinadas a se diferenciar. Esta alteração parece ser um evento precoce no processo de transformação, correspondendo tal vez à essência da iniciação⁽⁷¹⁻⁷³⁾.

Se as células basais, mantidas em cultura, respondem ao aumento do cálcio extracelular de forma semelhante aos eventos associados ao recrutamento para a diferenciação epidérmica e afastamento da membrana basal *in vivo*⁽⁷¹⁻⁷³⁾, as células epidérmicas murinas tratadas com DMBA ou outro iniciador, após a elevação da [Ca²⁺] no meio, res-

pondem formando colônias celulares resistentes à diferenciação induzida pelo cálcio⁽⁷²⁻⁷⁵⁾.

Outros estudos confirmam que esta alteração na proliferação/diferenciação está relacionada à etapa de iniciação na carcinogênese cutânea^(71,75-78). Quando camundongos adultos são tratados topicamente com dose iniciadora de carcinógeno e, posteriormente, as células epidérmicas são cultivadas *in vitro*, também surgem colônias celulares resistentes à diferenciação terminal induzida pelo cálcio, após a elevação da [Ca²⁺] no meio; isto não acontece em culturas de células epidérmicas provenientes de pele tratada apenas com o solvente.

A indução de colônias resistentes à diferenciação terminal induzida pelo cálcio também ocorre em culturas de células epidérmicas obtidas de camundongos neonatos, submetidos a iniciação por via transplacentária⁽⁷⁹⁾.

As células assim selecionadas diferem das células normais por não experimentar o bloqueio da proliferação que acompanha a diferenciação terminal induzida pelo cálcio, e por continuar a proliferar em condições nas quais as células normais são obrigadas a seguir a diferenciação terminal. Esta alteração é similar àquela descrita para as células basais em papilomas de camundongo, e pode ser fundamental ao desenvolvimento de neoplasia em tecidos lábeis, cujas células experimen-

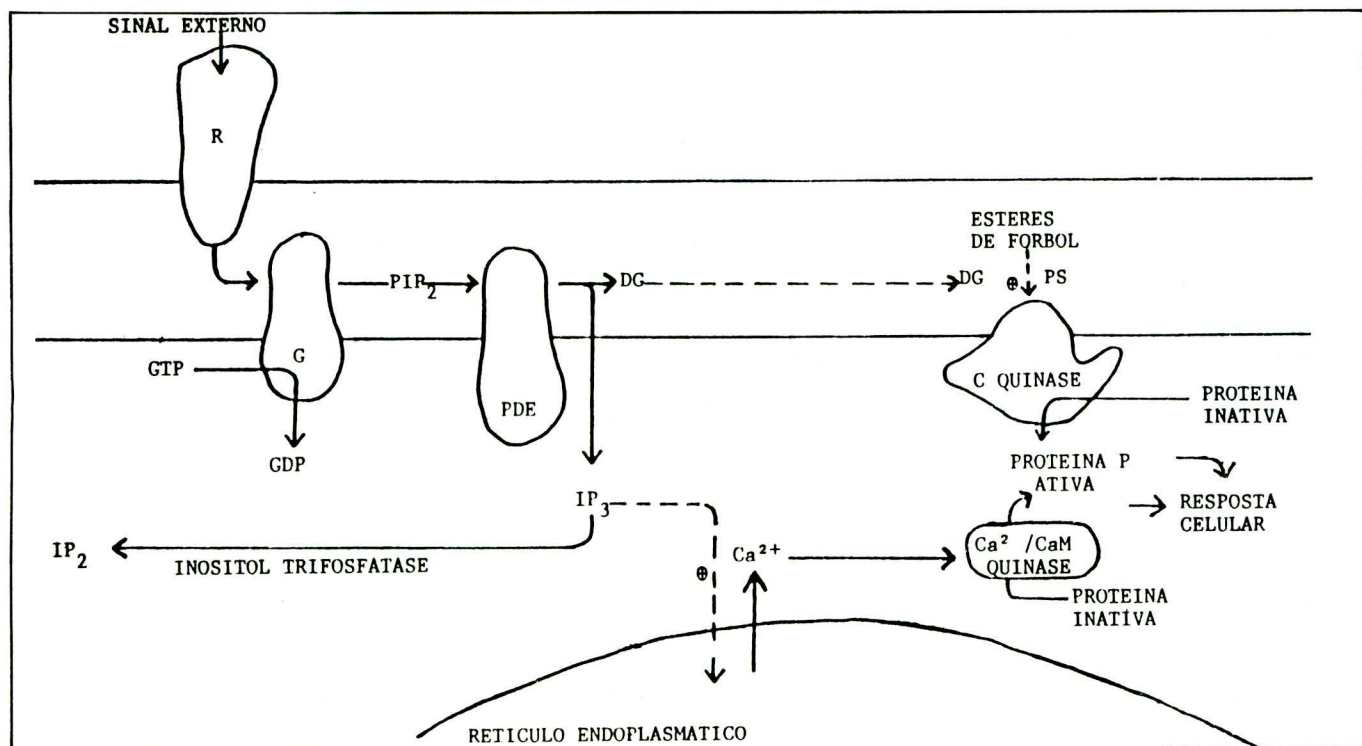


Figura 5 – Diagrama da via do inositol, segundo Berridge⁽⁶¹⁾.

tam renovação constante através da diferenciação terminal^(71-73,80).

Conforme o conhecimento atual, a iniciação é um fenômeno genético, cujo caráter irreversível se deveria à atividade mutagênica do cancerígeno terminal, gerado por ativação metabólica. Este teria efeito mutagênico ao ligar-se de forma covalente ao DNA, mais especificamente ao grupo amino exocíclico da adenina ou da guanina, em genes que participam do controle do crescimento e da diferenciação celular – oncogenes – modificando-se assim o comportamento biológico das células afetadas. A eficácia da iniciação parece depender da relação existente entre a ativação e a detoxificação do HAP e, ainda, do reparo da ligação do dioléopóxido ao DNA; ao estar inibido o reparo por escisão ou aumentado o reparo propenso a erro, prevaleceria a interação crítica entre o cancerígeno terminal e o DNA. Entretanto, duas ou três divisões celulares seriam necessárias para fixar o evento ao genoma^(25,52).

Promoção

Após terem sido isolados os agentes promotores do OC, foi estudado o papel desses agentes na carcinogênese química, particularmente seu efeito sobre as membranas biológicas. Considerando que a membrana plasmática, através da permeabilidade seletiva de diversas substâncias, desempenha um

papel importante no controle da divisão celular, a interação dos ésteres de forbol com a membrana plasmática pode resultar em alteração dos mecanismos de controle do ciclo celular. Mediante experiências *in vitro*, verificou-se que as membranas celulares expostas a ésteres de forbol têm perda da permeabilidade específica⁽¹²⁾. Van Duuren⁽⁹⁾ relatou também a perda da inibição por contato em células cultivadas *in vitro*, devida à ação do agente promotor sobre a membrana plasmática, e sugeriu efeito similar *in vivo*. Portanto, o papel primário do promotor tumoral seria a alteração das propriedades das membranas celulares.

Já Hennings e Boutwell⁽⁴⁸⁾ verificaram que após uma única aplicação de OC na pele de camundongo STS – “Skin Tumor Susceptible” – ocorre um estímulo inicial, duplicando e até triplicando a síntese de RNA em 6 horas, e a de proteínas, em 12 horas. Além disso, há uma inibição inicial da síntese de DNA, seguida de um estímulo, triplicando-a 18 horas depois da aplicação; sete dias depois, os níveis de síntese macromolecular retornam aos valores normais. Os autores postularam a participação do estímulo de síntese de RNA específico na promoção tumoral, mais especificamente na etapa de conversão, ao interferir na expressão genética, permitindo a transcrição do DNA alterado das células iniciadas. Raick e Ritchie⁽⁶¹⁾ descreveram resultados similares referentes à síntese de DNA e

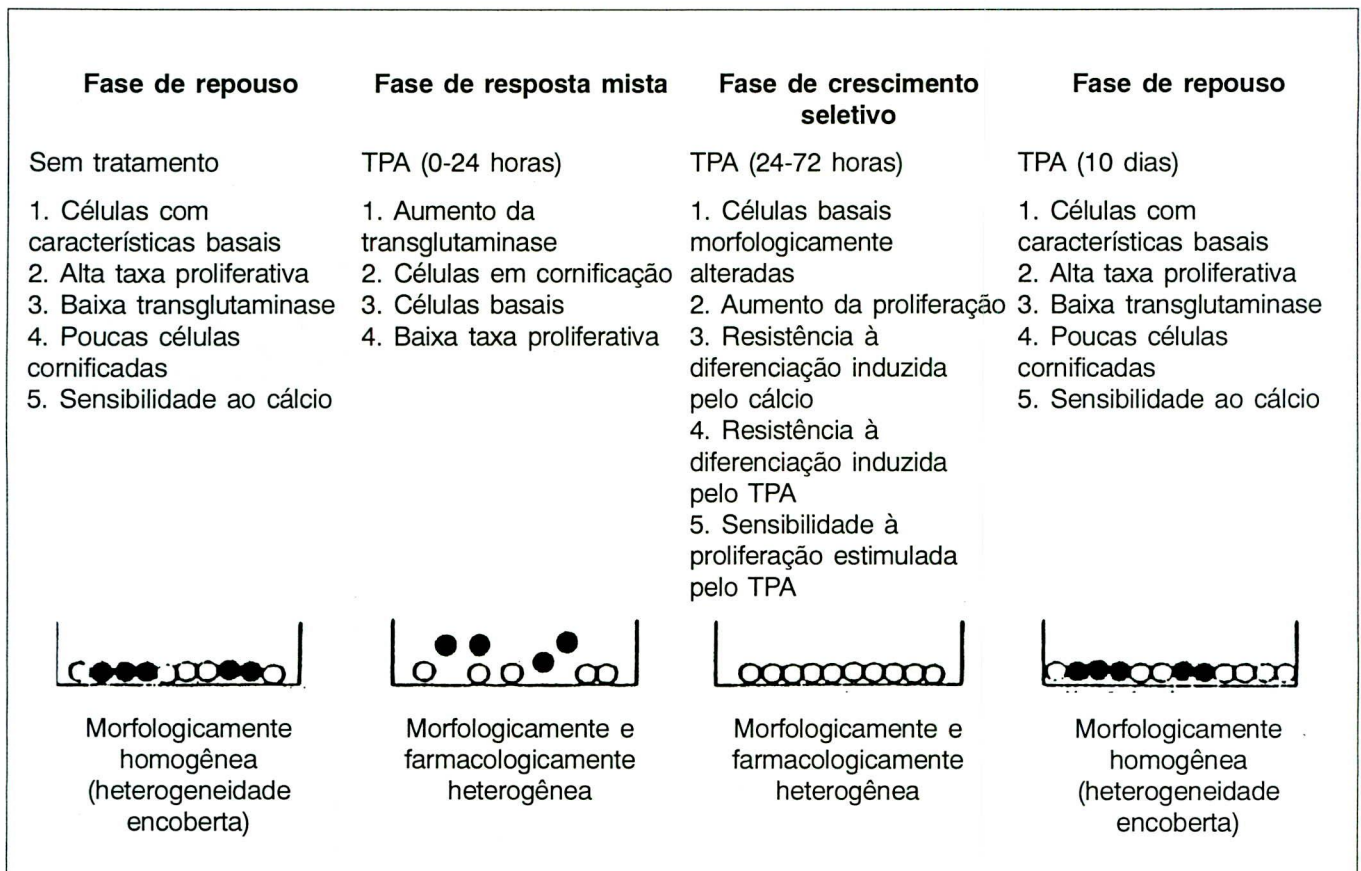


Figura 6 – Diagrama da resposta heterogênea das células epidérmicas basais expostas a TPA *in vitro*, segundo Yuspa⁽¹³²⁾.

RNA, obtidos com a fração A₁ de OC na pele de camundongo.

Os resultados de diversas pesquisas, realizadas no início da década de 1980, sobre a interação de ésteres de forbol com receptores de membrana, indicaram, inicialmente, que os promotores atuam ligando-se a receptores⁽⁸²⁻⁸⁵⁾ de forma específica, saturável e reversível⁽⁸⁶⁾.

Estudos posteriores permitiram a purificação de um receptor da fração protéica de cérebro de camundongo, que requer cálcio divalente e fosfatidilserina como cofatores para manter a ligação ao TPA, verificando-se, mais tarde, que o receptor do TPA é uma proteína de membrana – proteína C quinase – através da qual o TPA ativa a fosforilação de proteínas intracelulares⁽⁸⁷⁻⁹⁰⁾.

Diversos laboratórios já isolaram a seqüência de DNA que codifica a proteína C quinase; trata-se de uma família multigenes com expressão diferencial de genes individuais em tecidos específicos, o que explica serem também tecido-específicos os efeitos dos ésteres de forbol⁽²³⁾.

Esse receptor com atividade proteína quinase é ativado por fosfolípeos e cálcio, bem como por TPA e outros ésteres de forbol, por diacilglicerídeos insaturados e por proteólise, sendo o mesmo re-

ceptor envolvido na cascata de eventos – via do inositol – que ocorrem em resposta a muitos estímulos celulares⁽⁹¹⁾.

Na chamada via do inositol, o sinal externo liga-se ao receptor (R) de membrana, o qual transmite a informação através da proteína G (G) ativando a fosfodiesterase (PDE), que por sua vez cliva o inositol difosfato (PIP₂) em duas moléculas que agem como “segundo mensageiro”, o inositol trifosfato (IP₃) e o diacilglicerol (DG). O IP₃ é hidrossolúvel, difunde-se no citoplasma e libera cálcio a partir do retículo endoplasmático, o qual, por sua vez, estimula uma proteína quinase – calmodulina – citoplasmática. O DG permanece na membrana, onde ativa a proteína C quinase; o fosfolípeo de membrana fosfatidilserina (PS) é um cofator para essa ativação. Os dois braços desta via levam a fosforilação de proteínas distintas, e podem ser ativados independentemente, como é o caso do TPA interagindo diretamente com a proteína C quinase e desencadeando uma série de efeitos biológicos⁽⁶¹⁾ (Figura 5).

Tanto o TPA aplicado uma ou repetidas vezes, como um DG sintético – *s,n*-1,2-didecanoilglicerol – apenas quando aplicado em alta freqüência com efeito promotor completo, diminuem a atividade

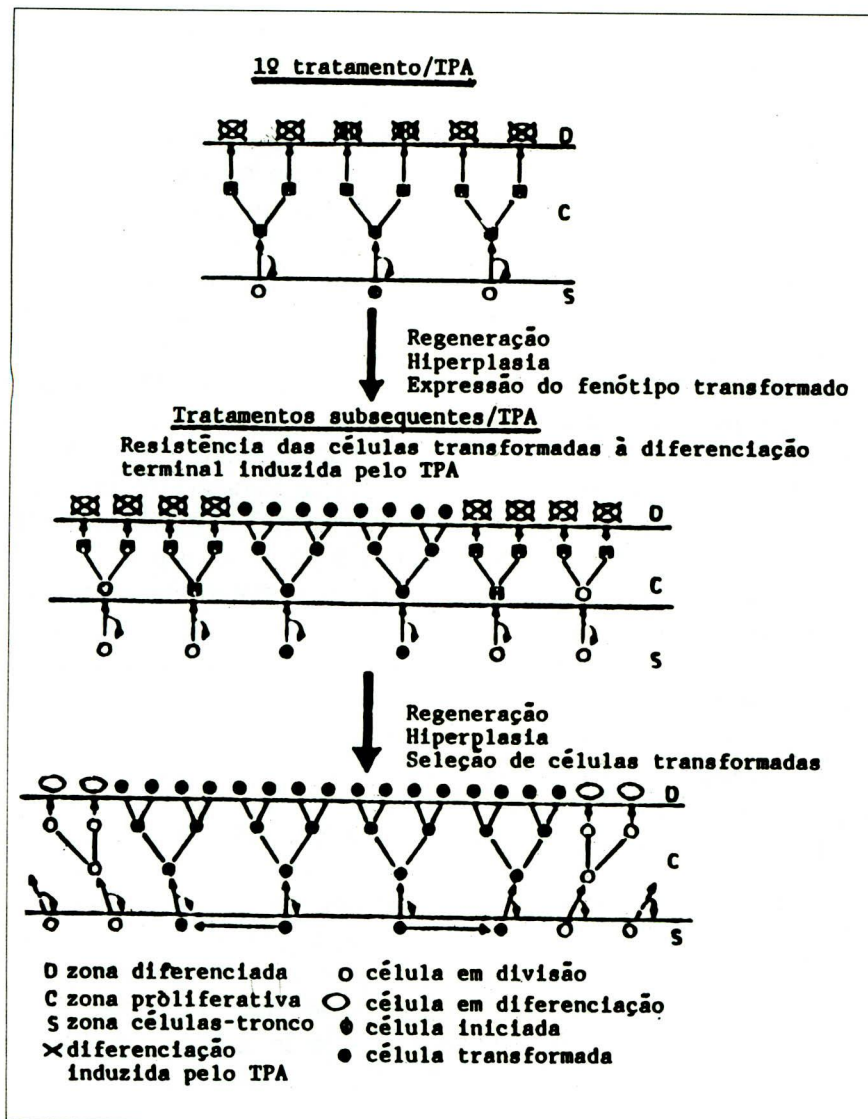


Figura 7 – Diagrama da expansão clonal de células iniciadas e sua progênie, segundo Parkinson⁽¹³⁴⁾.

total da proteína C quinase pelo fenômeno de “down regulation”⁽⁹²⁾. Após a ligação, a perda aparente do número de receptores para ésteres de forbol – “down modulation” – parece ser o resultado de alterações na configuração dos receptores⁽⁹³⁾, cujo significado biológico pode ser a permissividade para os processos de hiperplasia e promoção tumoral⁽⁹²⁾.

Junto com a ativação da proteína C quinase, logo após o tratamento da pele com TPA, ocorre uma série de respostas morfológicas e bioquímicas, sumarizadas por Slaga e Klein-Szanto⁽³²⁾ e listadas a seguir:

- indução de inflamação e hiperplasia
- aumento na síntese de DNA, RNA e proteína
- aumento inicial na queratinização seguido de diminuição
- aumento na síntese de fosfolipídeos
- aumento na síntese de prostaglandinas
- aumento na síntese e fosforilação de histonas

- aumento na atividade ornitina descarboxilase (ODC) seguido de aumento de poliaminas
- aumento na atividade histidina e DOPA descarboxilase
- diminuição na estimulação do AMP_c pelo isoproterenol
- diminuição no número de receptores para dexametasona
- diminuição de superóxido dismutase (SOD) e catalase
- indução de estado embrionário na pele de camundongos adultos.

Portanto, os promotores – ésteres de forbol – interagem com membranas, estimulam e alteram a expressão genética e, eventualmente, aumentam a taxa de proliferação celular; uma ou várias dessas interações seriam responsáveis pelo mecanismo de ação⁽⁴⁾. Entretanto, devido à ampla gama de efeitos determinados pelos ésteres de forbol, tem sido difícil estabelecer quais das respostas são

componentes essenciais ao processo de promoção tumoral. Outros autores referem a produção de “células escuras”, a inibição da maturação e a eliminação da cooperação metabólica como essenciais à promoção⁽¹³⁾. Já Slaga e Butler⁽²⁸⁾ consideram a indução de proliferação epidérmica, ODC, poliaminas, prostaglandinas e “células escuras” como os efeitos que melhor se correlacionam com a atividade promotora.

A produção de prostaglandinas, após o tratamento da pele com TPA, inicia-se pela ativação Ca-dependente da fosfolipase A₂, e talvez da fosfolipase C, ocorrendo acúmulo imediato de prostaglandina E₂ e acúmulo retardado de F_{2α}⁽⁹⁴⁻⁹⁶⁾. As prostaglandinas parecem ter papel importante na promoção, uma vez que as prostaglandinas F_{2α} e E₂ comprovadamente aumentam a promoção tumoral por TPA⁽⁹⁷⁾ e revertem a inibição da atividade ODC pela indometacina^(25,98). Mais ainda, a inibição da promoção tumoral pela indometacina é revertida seletivamente mediante a prostaglandina F_{2α}⁽⁹⁴⁻⁹⁶⁾.

Há uma série de evidências experimentais sobre o efeito do TPA e de outras substâncias promotoras – mezereína, PB, quinonas – estimulando a atividade epidérmica da enzima ODC⁽⁹⁹⁻¹⁰⁹⁾. Ainda, o tratamento repetido com TPA⁽¹⁰³⁾ ou com PB⁽¹⁰⁸⁾, em intervalos de mais de 48 horas, induz ao aumento da atividade ODC bem mais acentuado do que uma única aplicação, porém, o tratamento repetido com mezereína – propagador – e etilfenilpropiolato (EPP) – hiperplásico não promotor – não chega a induzir atividade ODC proporcional ao grau de hiperplasia⁽¹⁰⁹⁾.

O pico máximo de atividade ODC verifica-se 4,5 a 5 horas após o tratamento com TPA^(99,100,106), sendo precedido por elevação dos níveis de GMPc e AMPc⁽¹⁰⁰⁾; a indução da atividade ODC resulta de aumento transitório nos níveis de RNAm-ODC e na taxa de síntese de proteína-ODC⁽¹⁰⁶⁾, e culmina com acúmulo de poliaminas – putrescina, espermidina, espermina – e síntese de DNA⁽¹⁰¹⁻¹⁰²⁾.

A expressão do gene ODC, induzida pelo TPA, acontece através da ativação da proteína C quinase⁽¹⁰⁴⁾, uma vez que:

- o TPA não induz atividade ODC em células epidérmicas cultivadas na ausência de cálcio;
- a adição de cálcio ao meio de cultura reverte essa situação;
- o DG 1-oleil-2-acetilglicerol, similar ao ativador biológico da proteína C quinase, induz à atividade ODC e eleva os níveis de RNAm-ODC;
- a fosfolipase C, que libera diacilglicerol dos fosfolípidos de membrana, induz a atividade ODC;

– a atividade ODC induzida pela fosfolipase C se correlaciona com níveis elevados de RNAm-ODC;

– um inibidor específico da proteína C quinase inibe o efeito do TPA sobre a atividade ODC e a elevação dos níveis de RNAm-ODC, bem como inibe a promoção tumoral pelo TPA.

Os resultados da utilização experimental de diversos modificadores da promoção tumoral indicaram que o estímulo da atividade ODC e a elevação conseqüente de poliaminas são importantes no processo de promoção, visto que a inibição dessa atividade pelo ácido retinóico reduz a indução de tumores^(25,110,111), e ainda, a inibição da atividade ODC mediante inibidor específico – difluorometilornitina – inibe a promoção tumoral pelo TPA⁽⁹¹⁾.

Boutwell e colaboradores relataram que a maioria dos tumores espontâneos, assim como os de origem viral, os resultantes de radiações e os quimicamente induzidos mostram atividade ODC elevada e, ainda, que todos os promotores tumorais induzem atividade ODC em tecido normal⁽¹³⁾. Conforme esses autores, as poliaminas, cuja síntese é determinada pela enzima ODC, participam no controle da síntese de DNA, RNA e proteínas, e parecem desempenhar um papel decisivo na divisão celular e provavelmente na maturação celular. Paulsen e Astrup⁽¹⁰²⁾ consideram a indução de atividade ODC e poliaminas como sendo um evento associado à cinética do ciclo celular durante o estímulo da proliferação celular, sem ser específico da promoção.

Outrossim, os efeitos hiperplásico e promotor dos ésteres do forbol têm sido associados à redução induzida nos níveis de receptor para glucocorticóides no citosol das células epidérmicas^(112,113). Uma vez que os glucocorticóides são potentes inibidores, na pele de camundongo, da síntese de DNA e da divisão celular⁽¹¹⁴⁻¹¹⁸⁾, e que o nível de receptor para glucocorticóides em papilomas é muito baixo⁽¹¹³⁾, pode-se considerar que o número destes receptores desempenha um papel importante no controle da proliferação celular epidérmica⁽¹¹²⁾.

Vários pesquisadores, ainda na década de 1980, determinaram que o TPA altera os perfis de proteínas epidérmicas, especialmente o das queratinas, que são o principal produto da diferenciação epidérmica. As modificações na epiderme de camundongos SENCAR – “Sensitive to Carcinogenesis” – após o tratamento único ou repetido com TPA, resultam em padrões de queratina semelhantes aos da epiderme de camundongo neonato, refletindo uma reversão na expressão da síntese

de queratinas. As células de papilomas e carcinomas quimicamente induzidos também apresentam padrões de queratina alterados, similares aos da epiderme de neonatos⁽¹¹⁹⁻¹²¹⁾.

Há evidências também da interferência dos ésteres de forbol com capacidade promotora na expressão de diversos oncogenes⁽¹²²⁾ induzindo, particularmente, de forma transitória e seqüencial, *c-fos*, *c-myc* e o gene ODC, na pele de camundongo *in vivo*, via ativação de proteína C quinase. Ésteres de forbol apenas mitogênicos, mas não promotores, não aumentam da mesma forma a expressão desses genes⁽¹²³⁾.

Por outro lado, o TPA inibe a comunicação intercelular – cooperação metabólica – em cultura primária de células epidérmicas de camundongo⁽¹²⁴⁾, bem como em co-culturas de células epidérmicas HEL/37 e fibroblastos PG-19 murinos, ao passo que outros ésteres de forbol sem atividade promotora não determinam esse mesmo efeito⁽¹²⁵⁾. Outros promotores, como o PB, administrados em dose não tóxica, também inibem a cooperação metabólica em células epidérmicas humanas cultivadas *in vitro*⁽¹²⁶⁾. Considerando que a comunicação celular mediada por “gap junctions” participa do controle da proliferação e diferenciação celular⁽¹²⁷⁾, poderia ser este o mecanismo biológico pelo qual os promotores interferem na diferenciação e favorecem a expansão clonal seletiva das células previamente iniciadas⁽¹²⁸⁻¹³¹⁾.

O conjunto de respostas bioquímicas/biológicas da pele ao TPA pode ser dividido em dois grandes grupos, relacionados quer seja a proliferação ou a diferenciação terminal epidérmica. Uma vez que ambos processos se excluem mutuamente em uma mesma célula, parece haver grande heterogeneidade na população epidérmica alvo dos efeitos do TPA^(73,132).

Diversos estudos *in vitro* confirmaram que há subpopulações de células basais epidérmicas com sensibilidade distinta ao TPA^(71,73,132,133). A exposição ao TPA induz a diferenciação terminal de uma subpopulação basal, efeito esse que pode ser detectado tanto pelo aumento na atividade transglutaminase, enzima epidérmica associada à diferenciação, como pela formação de corneócitos ou envoltórios cornificados; a outra subpopulação é estimulada a proliferar e torna-se resistente aos sinais que determinam a diferenciação, quer seja elevação da $[Ca^{2+}]$ ou nova exposição ao TPA^(71,132,133) (Figura 6).

Portanto, os ésteres de forbol desencadeiam nas células epidérmicas basais uma resposta heterogênea, porém balanceada e programada, com

relação à proliferação e diferenciação. O efeito desta resposta é selecionar e expandir a população proliferativa a cada nova exposição ao promotor⁽¹³⁴⁾. Uma vez que as células iniciadas são resistentes ao sinal biológico – cálcio – que determina a diferenciação terminal, espera-se um aumento do número destas células durante a redistribuição na população epidérmica. A expansão clonal seletiva das células iniciadas resultaria, finalmente, em papiloma^(34,71,73,132,133) (Figura 7).

O promotor tanto pode levar a seleção induzindo as células iniciadas a crescerem mais rapidamente, como pode acelerar seletivamente a maturação das células não iniciadas, aumentando assim de forma indireta o número relativo de células iniciadas. De fato, linhagens de células epidérmicas iniciadas são resistentes à diferenciação terminal induzida pelo TPA, entretanto a resposta proliferativa destas células ao TPA é variável⁽³⁴⁾.

A atividade promotora dos ésteres de forbol vem sendo atribuída, em parte, a sua capacidade de gerar estado pró-oxidante na pele, através do estímulo na produção celular de lipídeos oxidados e radicais de oxigênio^(28,135), bem como de alterações nas diversas enzimas que participam do metabolismo de formas reativas de oxigênio⁽¹³⁶⁻¹³⁸⁾.

Em pele de camundongo, comprovadamente, o TPA reduz os níveis de atividade SOD e catalase, enzimas detoxificadoras de radicais livres, ânion superóxido e peróxido de hidrogênio, respectivamente⁽¹³⁸⁾, e aumenta a atividade de xantina oxidase (XO), enzima geradora de ânion superóxido e peróxido de hidrogênio^(136,137).

Por outro lado, o TPA, como conseqüência da ativação da proteína C quinase, estimula a fosfolipase A₂, e talvez a fosfolipase C, resultando em estímulo do metabolismo do ácido aracdônico e aumento na formação de intermediários do ácido hidroperóxido aracdônico. Formas reativas de oxigênio são produzidas quando esses produtos intermediários, instáveis, reagem formando os respectivos derivados hidroxila⁽¹³⁹⁾.

A promoção tumoral certamente envolve a modulação da expressão de genes relacionados ao crescimento e à diferenciação de células iniciadas, resultando na formação de tumores pela seleção e expansão clonal dessas células. As formas reativas de oxigênio, tanto os hidroperóxidos lipídicos, como seus produtos de degradação, poderiam ser responsáveis por essa modulação ao agir como fatores clastogênicos, ou seja, componentes de baixo peso molecular que provocam quebras cromossômicas no próprio tecido e em outros distantes. As formas reativas de oxigênio podem mo-

dular a expressão de genes relacionados à promoção e progressão tumoral tanto ao induzir alterações estruturais – rearranjo de genes – em oncogenes previamente mutados pelo iniciador, como ao participar de mecanismos epigenéticos que resultam em expressão gênica alterada, por exemplo, através da modificação de proteínas cromossômicas pela ADP-ribosilação⁽¹³⁹⁾.

Outras evidências que sustentam a hipótese de participação de radicais livres na promoção tumoral consistem na atividade promotora dos peróxidos, compostos oxidantes geradores de radicais livres⁽³⁵⁻⁴⁰⁾, e na atividade inibitória da promoção por parte de várias substâncias antioxidantes^(28,31,35,94,140,141).

Diversos pesquisadores confirmaram a existência de duas ou mais etapas na fase de promoção. Conforme Slaga e sua equipe⁽²⁵⁾, a promoção é um fenômeno epigenético. Na primeira etapa, isto é, na conversão de Boutwell, haveria a desdiferenciação a estados embrionários através de mecanismos ainda não esclarecidos, mas que têm expressão morfológica sob a forma de “células escuras”, descritas inicialmente por Raick e Ritchie⁽¹⁴²⁾. A produção de prostaglandina $F_{2\alpha}$ também tem sido vinculada à etapa de conversão, devido a que promotores incompletos – apenas propagadores –, como RPA, não determinam esse efeito⁽⁹⁶⁾. A síntese de DNA nesta etapa parece ser um evento essencial, visto que a administração de hidroxiurea – inibidor da síntese de DNA – 18 horas após o TPA, ou seja, no pico de síntese de DNA, determina inibição completa da formação tumoral mediante o modelo trifásico⁽¹⁴³⁾. Ainda mais, a indução de aberrações cromossômicas pode ter papel importante na etapa de conversão, uma vez que, ao ser utilizado metilmetanossulfonato (MMS), agente alquilante e clastogênico que provoca danos cromossômicos, este demonstrou ser um potente agente convertogênico no protocolo trifásico⁽¹⁴⁴⁾. Na segunda etapa, que corresponde à propagação de Boutwell, seriam críticas e necessárias a elevação de poliaminas e prostaglandinas⁽²⁵⁾, particularmente E_2 ^(94,96), e também a proliferação celular. Este último evento poderia constituir, conforme hipótese de Slaga e sua equipe⁽²⁵⁾, uma terceira etapa na promoção tumoral.

Em suma, pode-se considerar que a promoção tumoral envolve a indução de novo fenótipo celular, bem como a seleção de subpopulações de células iniciadas⁽²³⁾.

Summary

The results of experimental mouse skin tumorigenesis studies, first started in the 1940's,

have led to many significant concepts dealing with the multistage theory of cancer. Recent years have witnessed meaningful advances in the understanding of molecular and cellular events involved in the stages of initiation, promotion and progression. This article describes the multistage skin carcinogenesis concepts and the mechanisms related to tumor initiation and promotion.

Uniterms: carcinogenesis; initiation; promotion; skin.

Referências Bibliográficas

1. BOUTWELL, R.K. – Some biological aspects of skin carcinogenesis. *Prog Exp Tumor Res*, 4:207-250, 1964.
2. VAN LANCKER, J.L. – Molecular and cellular mechanisms in disease. New York: Springer-Verlag, pp 970-988, 1976.
3. SELKIRK, J.K. – Chemical carcinogenesis: a brief overview of the mechanism of action of polycyclic hydrocarbons, aromatic amines, nitrosamines, and aflatoxins. *In*: Slaga TJ, ed. *Modifiers of chemical carcinogenesis: an approach to the biochemical mechanism and cancer prevention*. New York, Raven Press, pp 1-31, 1980.
4. YUSPA, S.H.; HENNINGS, H.; SAFFIOTTI, U. – Cutaneous chemical carcinogenesis: past, present and future. *J Invest Dermatol*, 67:199-208, 1976.
5. ROUS, P.; KIDD, J.G. – Conditional neoplasms and subthreshold neoplastic states. A study of tar tumors in rabbits. *J Exp Med*, 73:365-389, 1941.
6. FRIEDWALD, W.F.; ROUS, P. – The initiating and promoting elements in tumor production. *J Exp Med*, 80:101-125, 1944.
7. BERENBLUM, I. – The cocarcinogenic action of croton resin. *Cancer Res*, 1:44-48, 1941.
8. SAFFIOTTI, U.; SCHUBICK, P. – Studies on promoting action in skin carcinogenesis. *Natl Cancer Inst Monogr*, 10:489-507, 1963.
9. VAN DUUREN, B.L. – Tumor promoting agents in two-stage carcinogenesis. *Prog Exp Tumor Res*, 11:51-68, 1969.
10. SCHMIDT, R.J.; EVANS, F.J. – Skin irritant effects of esters of phorbol and related polyols. *Arch Toxicol*, 44:279-289, 1980.
11. SALAMAN, M.H.; ROE, F.J.C. – Cocarcinogenesis. *Br Med Bull*, 20:139-144, 1964.
12. VAN DUUREN, B.L.; SIVAK, A. – Tumor-promoting agents from *Croton tiglium* L. and their mode of action. *Cancer Res*, 28:2349-2356, 1968.
13. BOUTWELL, R.K.; VERMA, A.K.; ASHENDEL, C.L.; ASTRUP, E. – Mouse skin: a useful model system for studying the mechanism of chemical carcinogenesis. *Carcinog Compr Surv*, 7:1-12, 1982.
14. BERENBLUM, I.; SHUBICK, P. – The role of croton oil applications, associated with a single painting of carcinogen, in tumor induction of the mouse's skin. *Br J Cancer*, 1:379-382, 1947.
15. BERENBLUM, I.; SHUBICK, P. – A new, quantitative approach to the study of the stages of chemical carcinogenesis in mouse's skin. *Br J Cancer*, 1:383-391, 1947.
16. BERENBLUM, I.; HARAN, N. – The significance of the sequence of initiating and promoting actions in the process of skin carcinogenesis in the mouse. *Br J Cancer*, 9:268-271, 1955.

17. BERENBLUM, I.; SHUBICK, P. – The persistence of latent tumor cells induced in the mouse's skin by a single application of 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene. *Br J Cancer*, 3:384-386, 1949.
18. POUND, A.W.; WITHERS, H.R. – The influence of some irritant chemicals and scarification on tumour initiation by urethane in mice. *Br J Cancer*, 17:460-470, 1963.
19. POUND, A.W. – Carcinogenesis and cell proliferation. *N Z Med J*, 67:88-99, 1968.
20. HECKER, E. – Cocarcinogenic principles from the seed of *Croton tiglium* and from other *Euphorbiaceae*. *Cancer Res*, 28:2338-2348, 1968.
21. SCRIBNER, J.D.; SÜSS, R. – Tumor initiation and promotion. *Int Rev Exp Pathol*, 18:137-198, 1978.
22. WEINSTEIN, I.B.; TROLL, W. – National Cancer Institute workshop on tumor promotion and cofactors in carcinogenesis. *Cancer Res*, 37:3461-3463, 1977.
23. COLBURN, N.H.; FARBER, E.; WEINSTEIN, I.B.; DIAMOND, L.; SLAGA, T.J. – American Cancer Society workshop on tumor promotion and antipromotion. *Cancer Res*, 47:5509-5513, 1987.
24. SLAGA, T.J.; FISCHER, S.M.; NELSON, K.; GLEASON, G.L. – Studies on the mechanism of skin tumor promotion: evidence for several stages in promotion. *Proc Natl Acad Sci USA*, 77:3659-3663, 1980.
25. SLAGA, T.J.; FISCHER, S.M.; WEEKS, C.E.; KLEIN-SZANTO, A.J.P. – Multistage chemical carcinogenesis in mouse skin. *Curr Probl Dermatol*, 10:193-218, 1980.
26. FÜRSTENBERGER, G.; BERRY, D.L.; SORG, B.; MARKS, F. – Skin tumor promotion by phorbol esters is a two-stage process. *Proc Natl Acad Sci USA*, 78:7722-7726, 1981.
27. FÜRSTENBERGER, G.; SORG, B.; MARKS, F. – Tumor promotion by phorbol esters in skin: evidence for a memory effect. *Science*, 220:89-91, 1983.
28. SLAGA, T.J.; BUTLER, A.P. – Cellular and biochemical changes during multistage skin tumor promotion. *Int Symp Princess Takamatsu Cancer Res Fund*, 14:291-301, 1983.
29. MARKS, F.; FÜRSTENBERGER, G. – Experimental evidence that skin carcinogenesis is a multistep phenomenon. *Br J Dermatol*, 115:1-8, 1986.
30. SLAGA, T.J.; FISCHER, S.M.; WEEKS, C.E.; KLEIN-SZANTO, A.J.P.; REINERS, J. – Studies on the mechanisms involved in multistage carcinogenesis in mouse skin. *J Cell Biochem*, 18:99-119, 1982.
31. SLAGA, T.J.; FISCHER, S.M.; WEEKS, C.E.; NELSON, K.; MAMRACK, M.; KLEIN-SZANTO, A.J.P. – Specificity and mechanism(s) of promoter inhibitors in multistage promotion. *Carcinog Compr Surv*, 7:19-34, 1982.
32. SLAGA, T.J.; KLEIN-SZANTO, A.J.P. – Initiation-promotion versus complete skin carcinogenesis in mice: importance of dark basal keratinocytes (stem cells). *Cancer Invest*, 1:425-436, 1983.
33. BOUTWELL, R.K. – On the role of tumour promotion in chemical carcinogenesis. *IARC Sci Publ*, 56:3-11, 1984.
34. HENNINGS, H.; YUSPA, S.H. – Two-stage tumor promotion in mouse skin: an alternative interpretation. *JNCI*, 74:735-740, 1985.
35. SLAGA, T.J.; KLEIN-SZANTO, A.J.P.; TRIPLETT, L.L.; YOTTI, L.P.; TROSKO, J.E. – Skin tumor-promoting activity of benzoyl peroxide, a widely used free radical-generating compound. *Science*, 213:1023-1025, 1981.
36. KLEIN-SZANTO, A.J.P.; SLAGA, T.J. – Effects of peroxides on rodent skin: epidermal hyperplasia and tumor promotion. *J Invest Dermatol*, 79:30-34, 1982.
37. REINERS JR. J.J.; NESNOW, S.; SLAGA, T.J. – Murine susceptibility to two-stage skin carcinogenesis is influenced by the agent used for promotion. *Carcinogenesis*, 5:301-307, 1984.
38. IVERSEN, O.H. – Carcinogenesis studies with benzoyl peroxide (Panoxyl gel 5%). *J Invest Dermatol*, 86:442-448, 1986.
39. IVERSEN, O.H. – Skin tumorigenesis and carcinogenesis studies with 7,12-dimethylbenz[a]anthracene, ultraviolet light, benzoyl peroxide (Panoxyl gel 5%) and ointment gel. *Carcinogenesis*, 9:803-809, 1988.
40. DI GIOVANNI, J.; WALKER, S.C.; BELTRAN, L.; NAITO, M.; EASTIN JR., W.C. – Evidence for a common genetic pathway controlling susceptibility to mouse skin tumor promotion by diverse classes of promoting agents. *Cancer Res*, 51:1398-1405, 1991.
41. O'CONNELL, J.F.; KLEIN-SZANTO, A.J.; DI GIOVANNI, D.M.; FRIES, J.W.; SLAGA, T.J. – Enhanced malignant progression of mouse skin tumors by the free-radical generator benzoyl peroxide. *Cancer Res*, 46:2863-2865, 1986.
42. IARC – Benzoyl peroxide. IARC Monogr Eval Carcinog Risk. *Chem Hum*, 36:267-283, 1985.
43. JONES, G.R. – Skin cancer: risk to individuals using the tumour promoter benzoyl peroxide for acne treatment. *Hum Toxicol*, 4:75-78, 1985.
44. WATTS, P. – Peroxides, genes and cancer. *Food Chem Toxicol*, 23:957-960, 1985.
45. ZBINDEN, G. – Scientific opinion on the carcinogenic risk due to topical administration of benzoyl peroxide for the treatment of acne vulgaris. *Pharmacol Toxicol*, 63:307-309, 1988.
46. COTTERILL, J.A. – Benzoyl peroxide. *Acta Derm Venereol (Stock)*, Suppl 89:57-63, 1980.
47. SHARRATT, M.; FRAZER, A.C.; FORBES, O.C. – Study of the biological effects of benzoyl peroxide. *Fed Cosmet Toxicol*, 2:527-538, 1964.
48. HENNINGS, H.; BOUTWELL, R.K. – Studies on the mechanism of skin tumor promotion. *Cancer Res*, 30:312-320, 1970.
49. MILLER, E.C. – Studies on the formation of protein-bound derivatives of 3,4-benzopyrene in the epidermal fraction of mouse skin. *Cancer Res*, 11:100-108, 1951.
50. BROOKES, P.; LAWLEY, P.D. – Evidence for the binding of polynuclear aromatic hydrocarbons to the nucleic acids of mouse skin: relation between carcinogenic hydrocarbons and their binding to deoxyribonucleic acid. *Nature*, 202:781-784, 1964.
51. GOSHMAN, L.M.; HEILDERBERG, C. – Binding of tritium-labeled polycyclic hydrocarbons to DNA of mouse skin. *Cancer Res*, 27:1678-1688, 1967.
52. FARBER, E. – Possible etiologic mechanisms in chemical carcinogenesis. *Environ Health Perspect*, 75:64-70, 1987.
53. EASTMAN, A.; BRESNICK, E. – Metabolism and DNA binding of 3-methylcholanthrene. *Cancer Res*, 39:4316-4321, 1979.
54. LEVIN, W.; BUENING, M.K.; WOOD, A.W. et al. – Tumorigenic activity of 3-methylcholanthrene metabolites on mouse skin and in newborn mice. *Cancer Res*, 39:3549-3553, 1979.

55. CHOUROULINKOV, I.; GENTIL, A.; TIERNEY, B.; GROVER, P.L.; SIMS, P. – The initiation of tumours on mouse skin by dihydrodiols derived from 7,12-dimethylbenz(a)anthracene and 3-methylcholantrene. *Int J Cancer*, 24:455-460, 1979.
56. SAWYER, T.W.; BAER-DUBOWSKA, W.; CHANG, K.; CRYSP, S.B.; HARVEY, R.G.; DI GIOVANNI, J. – Tumor-initiating activity of the bay-region dihydrodiols and diol-epoxides of dibenz[a,i]anthracene and cholanthrene on mouse skin. *Carcinogenesis*, 9:2203-2207, 1988.
57. HECHT, S.S.; AMIN, S.; HUIE, K.; MELIKIAN, A.A.; HARVEY, R.G. – Enhancing effect of a bay region methyl group on tumorigenicity in newborn mice and mouse skin of enantiomeric bay region diol epoxides formed stereoselectively from methylchrysenes in mouse epidermis. *Cancer Res*, 47:5310-5315, 1987.
58. SAWYER, T.W.; CHANG, K.; HARVEY, R.G.; DI GIOVANNI, J. – Further investigations into the effect of non-benzo ring bay-region methyl substituents on tumor-initiating activity of polycyclic hydrocarbons. *Cancer Lett*, 36:317-324, 1987.
59. RYSER, H.J.P. – Chemical carcinogenesis. *New Engl J Med*, 285:721-734, 1971.
60. FARBER, E. – Chemical carcinogenesis: a biologic perspective. *Am J Pathol*, 106:271-296, 1982.
61. BERRIDGE, M.J. – The molecular basis of communication within the cell. *Sci Am*, 253:124-134, 1985.
62. MARKS, F. – What's new in oncogenes and growth factors? *Path Res Pract*, 182:831-848, 1987.
63. BALMAIN, A.; BROWN, K.; AKHURST, R.J.; FEE, F.M. – Molecular analysis of chemical carcinogenesis in the skin. *Br J Cancer*, 58(Suppl IX):72-75, 1988.
64. PELLING, J.C.; ERNST, S.M.; STRAWHECKER, J.M.; JOHNSON, J.A.; NAIRN, R.S.; SLAGA, T.J. – Elevated expression of Ha-ras is an early event in two-stage skin carcinogenesis in SENCAR mice. *Carcinogenesis*, 7:1599-1602, 1986.
65. PELLING, J.C.; FISCHER, S.M.; NEADES, R.; STRAWHECKER, J.; SCHWEICKERT, L. – Elevated expression and point mutation of the Ha-ras proto-oncogene in mouse skin tumors promoted by benzoyl peroxide and other promoting agents. *Carcinogenesis*, 8:1481-1484, 1987.
66. HARPER, J.R.; REYNOLDS, S.H.; GREENHALGH, D.A.; STRICKLAND, J.E.; LACAL, J.C.; YUSPA, S.H. – Analysis of the Ha-ras oncogene and its p21 product in chemically induced skin tumors and tumor-derived cell lines. *Carcinogenesis*, 8:1821-1825, 1987.
67. YAMASAKI, H.; HOLLSTEIN, M.; MARTEL, N.; CABRAL, J.R.P.; GALENDO, D.; TOMATIS, L. – Transplacental induction of a specific mutation in fetal Ha-ras and its critical role in post-natal carcinogenesis. *Int J Cancer*, 40:818-822, 1987.
68. WONG, D.T.W.; GERTZ, R.; CHOW, P. et al. – Detection of Ki-ras messenger RNA in normal and chemically transformed hamster oral keratinocytes. *Cancer Res*, 49:4562-4567, 1989.
69. DIAZ-GUERRA, M.; HADDOW, S.; BAULUZ, C. et al. – Expression of simple epithelial cytokeratins in mouse epidermal keratinocytes harboring Harvey ras gene alteration. *Cancer Res*, 52:680-687, 1992.
70. WEINBERG, W.C.; MORGAN, D.L.; GEORGE, C.; YUSPA, S.H. – A comparison of interfollicular and hair derived cells as targets for the v-ras{Ha} oncogene in mouse skin carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 12:1119-1124, 1991.
71. YUSPA, S.H.; HENNINGS, H.; LICHTTI, U. – Initiator and promoter induced specific changes in epidermal function and biological potential. *J Supramol Struct Cell Biochem*, 17:245-257, 1981.
72. YUSPA, S.H.; KULESZ-MARTIN, M.; BEN, T.; HENNINGS, H. – Transformation of epidermal cells in culture. *J Invest Dermatol*, 81:162s-168s, 1983.
73. YUSPA, S.H. – Mechanisms of initiation and promotion in mouse epidermis. *IARC Sci Publ*, 56:191-204, 1984.
74. KILKENNY, A.E.; MORGAN, D.; SPANGLER, E.F.; YUSPA, S.H. – Correlation of initiating potency to induce resistance to terminal differentiation in cultured mouse keratinocytes. *Cancer Res*, 45:2219-2225, 1985.
75. KAWAMURA, H.; STRICKLAND, J.E.; YUSPA, S.H. – Association of resistance to terminal differentiation with initiation of carcinogenesis in adult mouse epidermal cells. *Cancer Res*, 45:2748-2752, 1985.
76. YUSPA, S.H.; MORGAN, D.L. – Mouse skin cells resistant to terminal differentiation associated with initiation of carcinogenesis. *Nature*, 293:72-74, 1981.
77. MILLER, D.R.; VIAJE, A.; ALDAZ, C.M.; CONTI, C.J.; SLAGA, T.J. – Terminal differentiation-resistant epidermal cells in mice undergoing two-stage carcinogenesis. *Cancer Res*, 47:1935-1940, 1987.
78. MILLER, D.R.; VIAJE, A.; ROTSTEIN, J.; ALDAZ, C.M.; CONTI, C.J.; SLAGA, T.J. – Induction of terminal differentiation-resistant epidermal cells in mouse skin and in papillomas by different initiators during two-stage carcinogenesis. *Cancer Res*, 49:410-414, 1989.
79. WANG, J.C.; YAMAMOTO, S.; KATO, R. – Differential sensitivities of transplacentally initiated newborn mouse epidermal cells to different tumor promoters. *Carcinogenesis*, 13:251-257, 1992.
80. YUSPA, S.H.; MORGAN, D.; LICHTTI, U. et al. – Cultivation and characterization of cells derived from mouse skin papillomas induced by an initiation-promotion protocol. *Carcinogenesis*, 7:949-958, 1986.
81. RAICK, A.N.; RITCHIE, A.C. – Early ultrastructural and biochemical changes induced by croton oil fraction A1 in mouse skin. *Proc Am Assoc Cancer Res*, 11:65, 1970.
82. DELCLOS, K.B.; NAGLE, D.S.; BLUMBERG, P.M. – Specific binding of phorbol ester tumor promoters to mouse skin. *Cell*, 19:1025-1032, 1980.
83. DRIEDGER, P.E.; BLUMBERG, P.M. – Specific binding of phorbol ester tumor promoters. *Proc Natl Acad Sci USA*, 77:567-571, 1980.
84. SOLANSKI, V.; SLAGA, T.J. – Specific binding of phorbol ester tumor promoters to intact primary epidermal cells from Sencar mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 78:2549-2553, 1981.
85. HOROWITZ, A.D.; GREENEBAUM, E.; WEINSTEIN, I.B. – Identification of receptors for phorbol ester tumor promoters in intact mammalian cells and of an inhibitor of receptor binding in biologic fluids. *Proc Natl Acad Sci USA*, 78:2315-2319, 1981.
86. BLUMBERG, P.M.; DELCLOS, K.B.; DUNPHY, W.G.; JAKEN, S. – Specific binding of phorbol ester tumor promoters to mouse tissues and cultured cells. *Carcinog Compr Surv*, 7:519-535, 1982.
87. NIEDEL, J.E.; KUHN, L.J.; VANDENBARK, G.R. – Phorbol diester receptor copurifies with protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci USA*, 80:36-40, 1983.

88. LEACH, K.L.; JAMES, M.L.; BLUMBERG, P.M. – Characterization of a specific phorbol ester aporeceptor in mouse brain cytosol. *Proc Natl Acad Sci USA*, 80:4208-4212, 1983.
89. ASHENDEL, C.L.; STALLER, J.M.; BOUTWELL, R.K. – Solubilization, purification, and reconstitution of a phorbol ester receptor from the particulate protein fraction of mouse brain. *Cancer Res*, 43:4327-4332, 1983.
90. ASHENDEL, C.L.; STALLER, J.M.; BOUTWELL, R.K. – Protein kinase activity associated with a phorbol ester receptor purified from mouse brain. *Cancer Res*, 43:4333-4337, 1983.
91. BOUTWELL, R.K.; TAKIGAWA, M.; VERMA, A.K.; ASHENDEL, C.L. – Observations on the mechanism of skin tumor promotion by phorbol esters. *Int Symp Princess Takamatsu Cancer Res Fund*, 14:177-193, 1983.
92. HANSEN, L.A.; MONTEIRO-RIVIERE, N.A.; SMART, R.C. – Differential down-regulation of epidermal protein kinase C by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate and diacylglycerol: association with epidermal hyperplasia and tumor promotion. *Cancer Res*, 50:5740-5745, 1990.
93. SOLANSKI, V.; SLAGA, T.J. – The down-modulation of receptors for phorbol ester tumor promoter in primary epidermal cells. *Carcinogenesis*, 3:993-998, 1982.
94. MARKS, F.; FÜRSTENBERGER, G. – Multistage tumor promotion in skin. *Int Symp Princess Takamatsu Cancer Res Fund*, 14:273-287, 1983.
95. FÜRSTENBERGER, G.; MARKS, F. – Growth stimulation and tumor promotion in skin. *J Invest Dermatol*, 81:157S-162S, 1983.
96. FÜRSTENBERGER, G.; GROSS, M.; MARKS, F. – Eicosanoids and multistage carcinogenesis in NMRI mouse skin: role of prostaglandins E and F in conversion (first stage of tumor promotion) and promotion (second stage of tumor promotion). *Carcinogenesis*, 10:91-96, 1989.
97. FISCHER, S.M.; GLEASON, G.L.; BOHRMAN, J.S.; SLAGA, T.J. – Prostaglandin enhancement of skin tumor initiation and promotion. *Adv Prostaglandin Thromboxane Res*, 6:517-522, 1980.
98. VERMA, A.K.; ASHENDEL, C.L.; BOUTWELL, R.K. – Inhibition by prostaglandin synthesis inhibitors of the induction of epidermal ornithine decarboxylase activity, the accumulation of prostaglandins, and tumor promotion caused by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Cancer Res*, 40:308-315, 1980.
99. MARKS, F.; BERTSCH, S.; FÜRSTENBERGER, G. – Ornithine decarboxylase activity, cell proliferation, and tumor promotion in mouse epidermis *in vivo*. *Cancer Res*, 39:4183-4188, 1979.
100. PERCHELLET, J.P.; BOUTWELL, R.K. – Enhancement by 3-isobutyl-1-methylxanthine and cholera toxin of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-stimulated cyclic nucleotide levels and ornithine decarboxylase activity in isolated epidermal cells. *Cancer Res*, 40:2653-2660, 1980.
101. ASTRUP, E.G.; PAULSEN, J.E. – Changes in epidermal polyamine biosynthesis and specific activity of DNA following a single application of TPA to hairless mouse skin. *Carcinogenesis*, 2:545-551, 1981.
102. PAULSEN, J.E.; ASTRUP, E.G. – Effects of single applications of TPA, mezerein, or EPP on DNA synthesis and polyamine levels in hairless mouse epidermis. *Cancer Res*, 43:4126-4131, 1983.
103. TAKIGAWA, M.; SIMSIMAN, R.C.; BOUTWELL, R.K. – Tumor promoter-induced refractory state against ornithine decarboxylase induction by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in mouse skin. *Cancer Res*, 46:106-112, 1986.
104. VERMA, A.K.; PONG, R.; ERICKSON, D. – Involvement of protein kinase C activation in ornithine decarboxylase gene expression in primary culture of newborn mouse epidermal cells and in skin tumor promotion by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Cancer Res*, 46:6149-6155, 1986.
105. PERCHELLET, J.; ABNEY, N.L.; THOMAS, R.M.; GUISLAIN, Y.L.; PERCHELLET, E.M. – Effects of combined treatments with selenium, glutathione, and vitamin E on glutathion peroxidase activity, ornithine decarboxylase induction, and complete and multistage carcinogenesis in mouse skin. *Cancer Res*, 47:477-485, 1987.
106. GILMOUR, S.K.; VERMA, A.J.; MADARA, T.; O'BRIEN, T.G. – Regulation of ornithine decarboxylase gene expression in mouse epidermis and epidermal tumors during two-stage tumorigenesis. *Cancer Res*, 47:1221-1225, 1987.
107. MONKS, T.J.; WALKER, S.E.; FLYNN, L.M. CONTI, C.J.; DI GIOVANNI, J. – Epidermal ornithine decarboxylase induction and mouse skin tumor promotion by quinones. *Carcinogenesis*, 11:1795-1801, 1990.
108. GIMÉNEZ-CONTI, I.; VIAJE, A.; CHESNER, J.; CONTI, C.; SLAGA, T.J. – Induction of short-term markers of tumor promotion by organic peroxides. *Carcinogenesis*, 12:563-569, 1991.
109. GILMOUR, S.K.; ROBERTSON, F.M.; MEGOSH, L.; O'CONNELL, S.M.; MITCHELL, J.; O'BRIEN, T.G. – Induction of ornithine decarboxylase in specific subpopulations of murine epidermal cells following multiple exposures to 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate, mezerein and ethyl phenylpropiolate. *Carcinogenesis*, 13:51-56, 1992.
110. VERMA, A.K.; BOUTWELL, R.K. – Vitamin A acid (retinoic acid) a potent inhibitor of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate induced ornithine decarboxylase activity in mouse epidermis. *Cancer Res*, 37:2196-2201, 1977.
111. VERMA, A.K.; SHAPAS, B.G.; RICE, H.M.; BOUTWELL, R.K. – Correlation of the inhibition by retinoids of tumor promoter-induced mouse epidermal ornithine decarboxylase activity and skin tumor promotion. *Cancer Res*, 39:419-425, 1979.
112. DAVIDSON, K.A.; SLAGA, T.J. – Effects of phorbol ester tumor promoters and hyperplasiogenic agents on cytoplasmic glucocorticoid receptors in epidermis. *J Invest Dermatol*, 79:378-382, 1982.
113. DAVIDSON, K.A.; SLAGA, T.J. – Glucocorticoid receptor levels in mouse skin after repetitive applications of TPA and mezerein. *Cancer Res*, 43:3847-3851, 1983.
114. TRAININ, N. – Adrenal imbalance in mouse skin carcinogenesis. *Cancer Res*, 23:415-419, 1963.
115. VIAJE, A.; SLAGA, T.J.; WIGLER, M.; WEINSTEIN, I.B. – Effects of anti-inflammatory agents on mouse skin tumor promotion, epidermal DNA synthesis, phorbol ester-induced cellular proliferation, and production of plasminogen activator. *Cancer Res*, 37:1530-1536, 1977.
116. SLAGA, T.J.; BOWDEN, G.T.; BOUTWELL, R.K. – Acetic acid, a potent stimulator of mouse epidermal

- macromolecular synthesis and hyperplasia but with weak tumor-promoting ability. *JNCI*, 55:983-987, 1975.
117. SLAGA, T.J.; LICHTI, U.; HENNINGS, H.; ELGJO, K.; YUSPA, S.H. – Effect of tumor promoters and steroidal anti-inflammatory agents on skin of newborn mice *in vivo* and *in vitro*. *JNCI*, 60:425-431, 1978.
 118. SLAGA, T.J. – Anti-inflammatory steroids: potent inhibitors of tumor promotion. In: Sлага TJ, ed. *Modifiers of biochemical carcinogenesis: an approach to the biochemical mechanism and cancer prevention*. New York: Raven Press, 1980, pp 111-126.
 119. NELSON, K.G.; SLAGA, T.J. – Keratin modifications in epidermis, papillomas and carcinomas during two-stage carcinogenesis in the SENCAR mouse. *Cancer Res*, 42:4176-4181, 1982.
 120. NELSON, K.G.; STEPHENSON, K.B.; SLAGA, T.J. – Protein modifications induced in mouse epidermis by potent and weak tumor-promoting hyperplasiogenic agents. *Cancer Res*, 42:4164-4175, 1982.
 121. SCHWEIZER, J.; WINTER, H. – Changes in regional keratin polypeptide patterns during phorbol ester-mediated reversible and permanently sustained hyperplasia of mouse epidermis. *Cancer Res*, 42:1517-1529, 1982.
 122. GIACOMONI, P.U. – Onc-gene expression in hyperplasia induced by tape stripping or by topical application of TPA. *Br J Dermatol*, 115(Suppl 31):128-32, 1986.
 123. ROSE-JOHN, S.; FÜRSTENBERGER, G.; KRIEG, P.; BESEMFELDER, E.; RINCKLE, G.; MARKS, F. – Differential effects of phorbol esters on *c-fos* and *c-myc* and ornithine decarboxylase gene expression in mouse skin *in vivo*. *Carcinogenesis*, 9:831-835, 1988.
 124. YAMASAKI, H. – Cell-cell interaction and carcinogenesis. *Toxicol Pathol*, 14:363-369, 1986.
 125. FITZGERALD, D.J.; MURRAY, A.W. – Inhibition of intercellular communication by tumor-promoting phorbol esters. *Cancer Res*, 40(Pt 1):2935-2937, 1980.
 126. LAWRENCE, N.J.; PARKINSON, E.K.; EMMERSON, A. – Benzoyl peroxide interferes with metabolic cooperation between cultured human epidermal keratinocytes. *Carcinogenesis*, 5:419-421, 1984.
 127. PITTS, J.D.; FINBOW, M.E.; KAM, E. – Junctional communication and cellular differentiation. *Br J Cancer*, 58(Suppl IX):52-57, 1988.
 128. TROSKO, J.E.; CHANG, C.C.; MEDCALF, A. – Mechanisms of tumor promotion: potential role of intercellular communication. *Cancer Invest*, 1:511-526, 1983.
 129. TROSKO, J.E.; CHANG, C.C. – Role of intercellular communication in tumor promotion. In: Sлага TJ, ed. *Mechanisms of tumor promotion. Cellular responses to tumor promoters*. Boca Raton: CRC Press, pp 119-145, 1984.
 130. YAMASAKI, H.; ENOMOTO, T.; MARTEL, N. – Intercellular communication, cell differentiation and tumor promotion. *IARC Sci Publ*, 56:217-238, 1984.
 131. TROSKO, J.E. – Mechanisms of tumor promotion: possible role of inhibited intercellular communication. *Eur J Cancer Clin Oncol*, 23:599-601, 1987.
 132. YUSPA, S.H. – Molecular and cellular basis for tumor promotion in mouse skin. *Int Symp Princess Takamatsu Cancer Res Fund*, 14:315-326, 1983.
 133. YUSPA, S.H.; BEN, T.; HENNINGS, H.; LICHTI, U. – Divergent responses in epidermal basal cells exposed to the tumor promoter TPA. *Cancer Res*, 42:2344-2349, 1982.
 134. PARKINSON, E.K. – Defective responses of transformed keratinocytes to terminal differentiation stimuli. Their role in epidermal tumor promotion by phorbol esters and by deep skin wounding. *Br J Cancer*, 52:479-493, 1985.
 135. DURÁN, H.A.; DE REY, B.M. – Differential oxidative stress induced by two different types of skin tumor promoters, benzoyl peroxide and 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Carcinogenesis*, 12:2047-2052, 1991.
 136. PENCE, B.C.; REINERS JR, J.J. – Murine epidermal xanthine oxidase activity: correlation with degree of hyperplasia induced by tumor promoters. *Cancer Res*, 47:6388-6392, 1987.
 137. REINERS JR, J.J.; PENCE, B.C.; BARCUS, M.C.S.; CANTU, A.R. – 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-dependent induction of xanthine dehydrogenase and conversion to xanthine oxidase in murine epidermis. *Cancer Res*, 47:1775-1779, 1987.
 138. REINERS JR, J.J.; THAI, G.; RUPP, T.; CANTU, A.R. – Assessment of the antioxidant/prooxidant status of murine skin following topical treatment with 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate and throughout the ontogeny of skin cancer. Part I: quantitation of superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and xanthine oxidase. *Carcinogenesis*, 12:2337-2343, 1991.
 139. CERUTTI, P.A. – Prooxidant states and tumor promotion. *Science*, 227:375-381, 1985.
 140. SLAGA, T.J.; KLEIN-SZANTO, A.J.P.; FISCHER, S.M.; WEEKS, C.E.; NELSON, K.; MAJOR, S. – Studies on mechanism of action of anti-tumor-promoting agents: their specificity in two-stage promotion. *Proc Natl Acad Sci USA*, 77:2251-2254, 1980.
 141. FISCHER, S.M.; BADWIN, J.K. ADAMS, L.M. – Effects of anti-promoters and strain of mouse on tumor promoter-induced oxidants in murine epidermal cells. *Carcinogenesis*, 7:915-918, 1986.
 142. RAICK, A.N.; RITCHIE, A.C. – The fine structural changes induced in the epidermis by croton oil fraction A 1 and two stage carcinogenesis in mouse skin. *Proc Am Assoc Cancer Res*, 12:66, 1971.
 143. KINZEL, V.; LOEHRKE, H.; BOERTTLER, K.; FÜRSTENBERGER, G.; MARKS, F. – Suppression of the first stage of phorbol 12-tetradecanoate 13-acetate-effected tumor promotion in mouse skin by nontoxic inhibition of DNA synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 81:5858-5862, 1984.
 144. FÜRSTENBERGER, G.; SCHURICH, B.; KAINA, B.; PETRUVSKA, R.T.; FUSENIG, N.E.; MARKS, F. – Tumor induction in initiated mouse skin by phorbol esters and methyl methanesulfonate: correlation between chromosomal damage and conversion ('stage I of tumor promotion') *in vivo*. *Carcinogenesis*, 10:749-752, 1989.