

Efeito de promotores tumorais em pele de gerbil, *Meriones unguiculatus*¹

Maria Angélica Guzmán-Silva²

Resumo

Supondo que a resistência relativa da pele de gerbil adulto à carcinogênese química estaria relacionada a um fenômeno de adaptação ao processo de promoção tumoral, foi caracterizado o efeito de óleo de cróton (OC) e peróxido de benzoíla (PB) sobre a pele de gerbil, através do estudo das alterações morfológicas, correlatas à atividade promotora e induzidas em função da dose administrada, da frequência do tratamento e da associação ao iniciador metilcolantreno (MC) em modelos bifásicos e trifásicos de carcinogênese. Verificou-se que uma única aplicação tópica de OC (0,94 mg e 1,88 mg) ou PB (20 mg e 40 mg) induz, na epiderme interfolicular, grau similar de hiperkeratose e hiperplasia dose-dependente; outros efeitos, como espessamento da epiderme, hipertrofia celular e inflamação, eram mais acentuados pelo tratamento com OC. O efeito hiperplásico, também mais acentuado com OC, decorreria do estímulo proliferativo e do desequilíbrio entre proliferação e diferenciação epidérmica. O tratamento tópico repetido, com OC (1,41 mg) ou PB (30 mg), independente da frequência semanal, bi-semanal ou tri-semanal, determinou diminuição do estímulo proliferativo inicial, além de intensa hiperkeratose e regressão da hiperplasia, no caso do OC conseqüente ao desequilíbrio entre proliferação e diferenciação, favorecendo a perda celular. Entretanto, o PB, quando aplicado 2 ou 3 vezes/semana, determinou discreta progressão da hiperplasia inicial, decorrente de ligeiro desequilíbrio entre proliferação e diferenciação, prevalecendo discreto ganho celular. Ambas substâncias diferiram também no efeito inflamatório, ocorrendo regressão com OC e progressão com PB. A divergência nos efeitos hiperplásico e inflamatório estaria refletindo mecanismos de ação distintos destas duas substâncias. Ao ser aplicado OC ou PB após MC (0,2 mg), segundo protocolos de carcinogênese bifásica ou trifásica, comprovou-se que apenas o PB tem discreto efeito promotor – propagador – de papilomas na pele de gerbil adulto. Considerando a diminuição do estímulo proliferativo, que ocorre durante o tratamento repetido com OC e PB, associada ao efeito destas substâncias sobre a diferenciação celular – hiperkeratose – entende-se que a expansão clonal seletiva de células epidérmicas estaria prejudicada, principalmente com OC, sendo talvez esta a base biológica da resistência relativa da pele de gerbil adulto à indução química de tumores de linhagem epidérmica.

Unitermos: carcinogênese; iniciação; promoção; pele; gerbil.

Introdução

Os tumores cutâneos podem ser induzidos experimentalmente através de dois procedimentos clássicos. Um deles, denominado modelo cumulativo, consiste na aplicação repetida de pequenas doses de cancerígeno, por exemplo, de um hidrocarboneto aromático policíclico (HAP) como o metilcolantreno (MC); isto resulta na indução de pa-

pilomas e carcinomas. O outro, chamado modelo bifásico, que permitiu caracterizar as etapas de iniciação e promoção tumoral, consiste de uma única exposição a pequena dose de cancerígeno, seguida de tratamento repetido da pele iniciada com substâncias ou procedimentos – promotores – em si mesmo não cancerígenos, resultando, principalmente, na indução de papilomas⁽¹⁻⁵⁾. Ainda, a

¹Trabalho extraído da tese de Doutorado, Curso de Pós-graduação em Patologia Experimental da Universidade Federal Fluminense. Trabalho realizado no Departamento de Patologia da Universidade Federal Fluminense – Niterói – RJ, com financiamento do CNPq (150/302372-86.5) e da FAPERJ (E29/170.160/89).

²Prof. Adjunto do Departamento de Patologia da Universidade Federal Fluminense
Endereço para correspondência: Rua Marquês de Paraná, 303 – 24030-210 – Niterói – RJ.

promoção tumoral parece consistir de várias etapas, das quais duas já foram definidas operacionalmente, sendo denominadas conversão ou etapa I e a propagação ou etapa II^(1,6-9), de forma que o desenvolvimento neoplásico pode ser considerado como multifásico^(7,10-13). A cada uma dessas etapas correspondem mecanismos específicos. Quanto à iniciação, sabe-se que consiste em ligação covalente do carcinógeno ao DNA^(14,15), o que determina alteração no genoma celular, provavelmente nos genes que controlam o crescimento e a diferenciação no genoma celular, como o oncogene *ras*⁽¹⁶⁻²¹⁾. Já a promoção envolve a seleção e expansão clonal de células iniciadas, sendo que a etapa de conversão é relacionada a alteração na expressão gênica, e a propagação é vinculada apenas a proliferação celular^(1,9,12,22-24).

Diversas substâncias com capacidade promotora têm sido identificadas. O óleo de cróton (OC) é uma mistura complexa de substâncias lipídicas – ésteres de forbol – extraído das sementes da planta *Croton tiglium* L⁽²⁵⁻²⁷⁾, já o peróxido de benzoíla (PB) é um composto oxidante gerador de radicais livres, derivado de subprodutos do alcatrão de hulha^(28,29). Alguns promotores tumorais cutâneos, como os ésteres de forbol, agem através de um receptor de membrana específico⁽³⁰⁻³⁴⁾, ativando uma enzima identificada como proteína C quinase⁽³⁵⁻⁴⁰⁾ e desencadeando uma série de efeitos biológicos. Outros, como o PB, parecem atuar através de um mecanismo envolvendo radicais livres^(12,41-44), havendo controvérsias quanto a sua interação com a proteína C quinase^(12,45,46).

Tanto os ésteres de forbol – elementos ativos do OC – como o PB e muitos outros promotores, provocam, na pele, diversas alterações morfológicas e bioquímicas^(5,7,10,12,47). Sob aspecto morfológico, hiperplasia, distúrbios da diferenciação e inflamação ocorrem como resposta aos promotores^(10,48-51). O efeito hiperplásico e a capacidade promotora de tumores dependem da dose, como tem sido demonstrado em diversas linhagens de camundongos, utilizando-se ésteres de forbol^(48,50,52,53) ou PB^(49,54). Em outras espécies – rato, hamster – o grau de hiperplasia induzida também é dose-dependente, porém a dose requerida para obter hiperplasia máxima com ésteres de forbol nesses animais é bem maior, sendo 10 a 20 vezes a dose referida em camundongos^(48,55). O efeito hiperplásico dos ésteres de forbol, nas diversas espécies e linhagens de roedores, também difere após tratamento múltiplo; nas linhagens sensíveis ocorre potenciação da resposta hiperplásica e, nas linhagens e espécies resistentes, a hiperplasia ini-

cial desaparece^(48,55). Além da dose, o intervalo entre as aplicações sucessivas de promotor é um outro fator importante na indução de hiperplasia e promoção tumoral^(1,48,53,55).

A validade dos modelos cumulativo e bifásico de carcinogênese tem sido verificada em diversas espécies animais, como rato⁽⁵⁶⁾, coelho^(57,58) e hamster⁽⁵⁹⁾, além de camundongo^(48,57-60). Outrosim, têm sido observadas variações na susceptibilidade à carcinogênese química cumulativa e bifásica/multifásica, tanto entre as diversas espécies animais^(57,58), como entre linhagens de camundongos isogênicos^(8,50,52), sendo algumas refratárias à promoção^(48,60,61). As variações na susceptibilidade à carcinogênese química podem ser consequência de diferenças na ativação metabólica do cancerígeno ou na capacidade de reparo do DNA alterado; uma outra possibilidade é que as diferenças na susceptibilidade estejam relacionadas a alguns aspectos da promoção, quer seja a resposta ao agente promotor em si ou a influência de outros fatores endógenos no processo^(1,48,50,60,61). Tudo indica que a susceptibilidade reside na qualidade genética do indivíduo, visto que linhagens isogênicas de camundongos, altamente susceptíveis à carcinogênese química cutânea (STS*, SENCAR**, SSIN***), têm sido desenvolvidas através do cruzamento sucessivo de camundongos que apresentavam reação máxima à indução química de tumores cutâneos^(1,62,63).

O gerbil, *Meriones unguiculatus*, é um pequeno roedor originário de áreas desérticas da China e da Mongólia, adaptado como animal de laboratório, no ocidente, nas últimas décadas⁽⁶⁴⁾. Há poucas referências na literatura sobre a utilização do gerbil na pesquisa da carcinogênese química cutânea; as existentes⁽⁶⁵⁻⁶⁸⁾ relatam a indução de papilomas, carcinomas e alterações pigmentares da pele, com ambos modelos experimentais. Contudo, em estudo comparativo da carcinogênese química cutânea entre camundongo e gerbil, comprovou-se resistência relativa da pele de gerbil à indução de tumores com o modelo bifásico⁽⁶⁹⁾. A promoção com OC a 0,5%, duas vezes por semana, prolongada por 30 semanas, também não teve resultados positivos; já o modelo cumulativo é efetivo nesta espécie animal, ocorrendo a indução de papilomas em 14 semanas e carcinomas em 26 semanas^(70,71).

*STS "skin tumor susceptible" ©

**SENCAR "sensitive to carcinogenesis"

***SSIN "sensitive SENCAR inbred".

Consideramos que a resistência relativa da epiderme de gerbil à carcinogênese química residiria, em virtude de características genéticas próprias da espécie, em um fenômeno de adaptação ao processo de promoção tumoral, particularmente, com OC. Esse fenômeno consistiria em manutenção do estado de equilíbrio entre proliferação celular e maturação, permanecendo a renovação celular constante, de forma que a expansão clonal seletiva das células iniciadas estaria prejudicada ou seria insuficiente. Com a finalidade de comprovar essa hipótese, foi caracterizado o efeito de OC e PB sobre a pele de gerbil, através do estudo das alterações morfológicas correlatas à atividade promotora, induzidas em função da dose administrada, da frequência do tratamento e da associação ao iniciador MC em modelos bifásicos e trifásicos de carcinogênese.

Materiais e métodos

Animais

Na execução dos diversos protocolos experimentais foi utilizado um total de 200 gerbis, machos e adultos, provenientes da criação do Biotério do Departamento de Patologia da Universidade Federal Fluminense. Os animais foram alojados em gaiolas de fundo plástico, com leito de maravalha, e receberam, constantemente, água e ração Labina (Purina) *ad libitum*. No biotério, a iluminação era cíclica em intervalos de 12 horas, e a temperatura ambiente era mantida em 20°C.

Protocolos experimentais

Dois ou três dias antes do início do tratamento, os gerbis, anestesiados mediante inalação de éter, foram pesados e identificados, e a pele dorsal foi depilada com creme. Todos os animais, em relação ao ciclo de crescimento do pêlo, encontravam-se na fase telogênica ou de repouso. Toda a manipulação dos animais foi realizada em horário predeterminado e fixo, devido à variação cíclica circadiana das mitoses^(72,73).

Efeito de promotores em função da dose

Foram utilizados 25 gerbis, peso médio 47,4 ± 6,4 g (C.V. 13,6%). Os animais foram distribuídos em 5 grupos (n=5), e receberam, topicamente, 0,2 ml de solução de promotor dissolvido em acetona. Duas soluções de OC foram testadas, 0,5% (0,94 mg/dose) e 1% (1,88 mg/dose), assim como duas

de PB, 10% (20 mg/dose) e 20% (40 mg/dose). O grupo-controle foi tratado apenas com o solvente acetona. Os gerbis foram sacrificados 48 horas após a aplicação do promotor, mediante sobredose de éter.

Efeito de promotores em função da frequência de tratamento

Foram utilizados 105 gerbis, peso médio 58,0 ± 5,2 g (C.V. 8,9%). Os animais foram distribuídos em 7 grupos (n=15), e receberam, topicamente, 0,2 ml de solução de promotor dissolvido em acetona. Foi testada a aplicação de OC 0,75% (1,41 mg/dose) e de PB 15% (30 mg/dose) na frequência de 1, 2 e 3 vezes por semana. Os animais-controle receberam apenas o solvente acetona na frequência máxima. Os gerbis foram pesados novamente no momento da última aplicação de promotor. Cinco animais de cada grupo foram sacrificados 48 horas após completarem 1, 2 e 4 semanas de tratamento.

Modelos bifásicos de carcinogênese

Foram utilizados 25 gerbis, peso médio 56,8 ± 6,1 g (C.V. 10,8 g). Os animais foram distribuídos em 5 grupos (n=5) e tratados, topicamente, uma única vez com MC 0,1% (0,2 mg/dose), e a seguir de forma repetida com OC 0,75% (1,41 mg/dose; 3 x/semana) ou com PB 15% (30 mg/dose; 2 x/semana), durante 40 semanas. Os grupos-controle receberam, a cada vez, 0,2 ml de solução de promotor (sem iniciação) ou apenas o solvente acetona (sem iniciação e sem promoção).

Modelos trifásicos de carcinogênese

Foram utilizados 45 gerbis, peso médio 56,3% ± 5,5 g (C.V. 9,8 g). Os animais foram distribuídos em 9 grupos (n=5) e tratados, topicamente, uma única vez com MC, e a seguir de forma repetida com um tipo de promotor durante 20 semanas, e depois o outro promotor por mais 20 semanas, ou bem receberam um tipo de promotor uma única vez seguido do outro promotor durante 40 semanas. Os grupos-controle receberam, a cada vez, 0,2 ml de solução de promotor (sem iniciação) ou apenas o solvente acetona (sem iniciação, sem conversão e sem propagação).

Avaliação técnica

Nos protocolos referentes ao efeito dos promotores em função da dose administrada e da fre-

qüência de tratamento, foi coletada a pele dorsal em formol 10% Milloning para o estudo histopatológico, e foram determinados o índice mitótico (IM), o número de camadas celulares nucleadas (CCN) e a espessura da epiderme (EE), além do grau de inflamação cutânea e do grau de hiperqueratose. Com a finalidade de bloquear as mitoses e facilitar a sua contagem na determinação do IM⁽⁷⁴⁾, todos os animais receberam colchicina (0,1 mg/100 g de peso corporal) por via s.c., três horas antes do sacrifício.

Índice mitótico: em cada campo microscópico, visualizando-se exclusivamente a epiderme interfolicular (EIF), foi feita a contagem diferencial dos núcleos em interfase e mitose, estes últimos bloqueados em metáfase, até totalizar 1.000 núcleos em interfase. A contagem foi feita sob aumento total de 1.000 x. O IM foi calculado matematicamente, e o resultado, expresso como percentual. A mediana foi utilizada como medida de tendência central do grupo, e os valores mínimo e máximo, como medida de dispersão.

Número de camadas celulares nucleadas: simultaneamente, sob as mesmas condições descritas para a determinação do IM, foram feitas em cada caso 100 contagens, sendo 3 por cada campo microscópico, onde foram contados os núcleos visíveis sobre 3 linhas imaginárias perpendiculares à superfície. O número mais freqüente, moda, obtido em cada caso, foi considerado o CCN correspondente. A mediana foi utilizada como medida de tendência central do grupo, e os valores mínimo e máximo, como medida de dispersão.

Espessura da epiderme: a medição da EE, excluindo a camada córnea, foi feita utilizando-se analisador de imagem (Mini-Mop, Kontron). Os valores eram fornecidos por leitura, direta no aparelho, sendo 10 medidas por campo microscópico, num total de 200 medidas em cada caso. As medições foram realizadas sob aumento total de 400 x no referido aparelho, previamente calibrado com lâmina micrometrada. A média aritmética foi utilizada como medida de tendência central do grupo, e o desvio padrão, como medida de dispersão.

Grau de hiperqueratose: a espessura da camada córnea foi avaliada de forma semi-quantitativa.

Grau de inflamação: a avaliação semi-quantitativa do exsudato celular presente na derme superficial determinou o grau de inflamação cutânea em cada animal.

Nos protocolos de carcinogênese bifásica e trifásica, foi avaliada a variação do peso corporal dos animais, foram registradas as alterações ma-

croscópicas da pele dorsal e foi realizado estudo histopatológico da mesma.

Avaliação estatística

Aos resultados referentes a IM e CCN, em função da dose de promotor e da freqüência de tratamento promotor, foi aplicado o teste não-paramétrico da soma das ordens de Wilcoxon⁽⁷⁵⁾. Nos resultados referentes à EE aplicou-se o teste T de Student. Dos resultados referentes à variação ponderal foi realizada análise de variância, através da aplicação do teste não-paramétrico de Friedman e de Kruskal-Wallis⁽⁷⁵⁾.

Resultados

Efeito de promotores em função da dose

A EIF de gerbil adulto, após uma única aplicação tópica de acetona, era constituída de uma camada de células basais e um número variável de camadas celulares diferenciadas, muito achatadas, por sua vez cobertas pela camada córnea. Foram registradas, mais freqüentemente, 2 CCN, o IM variava entre 0,1% e 0,6%, e a EE, excluindo a camada córnea, foi em média de 12,79 μ m (Figuras 1 e 2).

Com ambos promotores aplicados uma única vez, o grau de hiperqueratose induzido, na epiderme de gerbil adulto, foi similar (Tabela 1). Verificou-se, em relação ao controle, aumento significativo do IM e das CCN da EIF, nos gerbis tratados com OC. Porém, apesar dos valores de IM e CCN

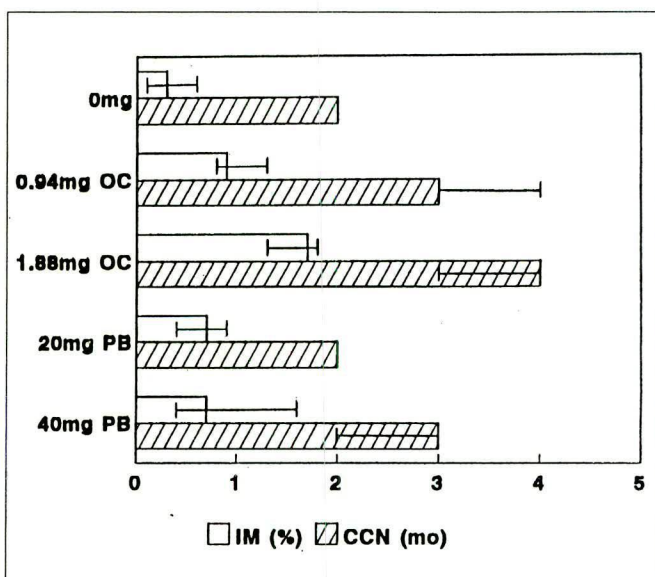


Figura 1 – Índice mitótico e camadas celulares nucleadas da epiderme interfolicular em função da dose de promotor.

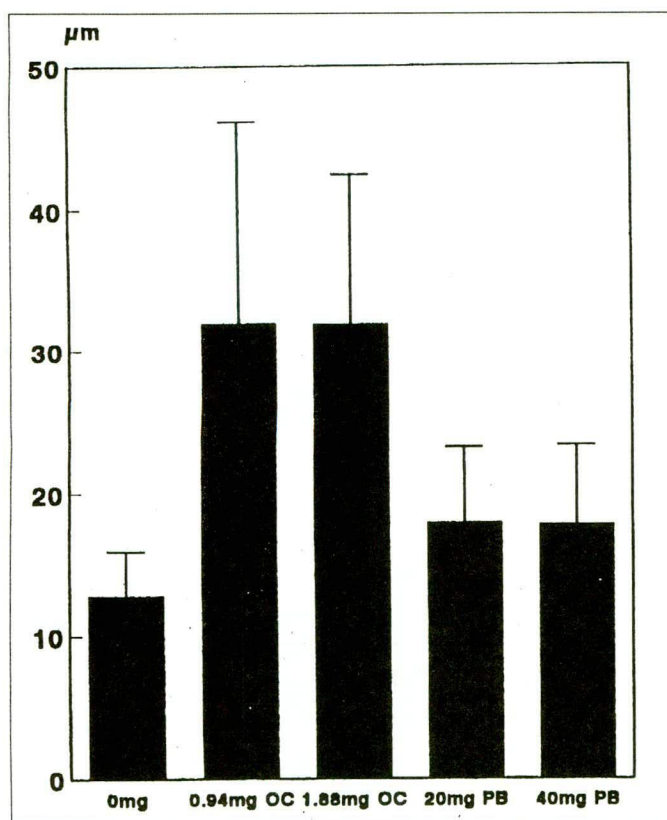


Figura 2 – Espessura da epiderme em função da dose de promotor.

Tabela 1 – Grau de hiperkeratose induzida em epiderme de gerbil em função da dose de promotor.

Grupo	Hiperkeratose
OC 0,94 mg	+
OC 1,88 mg	+
PB 20 mg	+
PB 40 mg	+
Acetona 0,2 ml	-

- ausente; + leve; ++ moderado; +++ acentuado

serem mais elevados com a maior dose de OC – 1,88 mg – apenas o IM foi significativamente diferente em função da dose de OC aplicada (Figura 1). A EE tratada com OC mostrou aumento significativo tanto em relação ao controle, quanto ao tratamento com PB, porém, foi similar com ambas as doses utilizadas (Figura 2).

Ainda, comparando o efeito de ambos promotores, o OC na dose de 1,88 mg determinou IM e CCM significativamente maiores que com qualquer dose de PB testada, e na dose de 0,94 mg, os valores de IM e CCM determinados pelo OC diferiam significativamente dos valores obtidos com

20 mg de PB (Figura 1). Portanto, uma única aplicação de OC mostrou ser mais potente que o PB na indução de hiperplasia, em epiderme de gerbil adulto, e determinou intenso estímulo proliferativo, dose-dependente, associado a hiperkeratose – aumento da maturação – resultando em hiperplasia também dose-dependente; já a hipertrofia celular ocorria de forma inversamente proporcional à dose, de forma que a EE era similar nas duas doses testadas.

Os valores de IM, embora elevados pelo tratamento com PB, só tendiam a aumentar em função da dose e não apresentaram diferença significativa entre si, mas sim em relação ao grupo-controle. Contudo, o tratamento com maior dose de PB – 40 mg – determinou aumento das CCN, significativamente diferente do controle e também em função da dose de PB aplicada (Figura 1). Apesar dos valores da EE serem elevados nos gerbis tratados com PB, não houve diferença significativa destes valores em relação aos do controle nem variação dose-dependente (Figura 2). Portanto, uma única aplicação de PB determinou estímulo proliferativo da epiderme, com tendência a ser dose-dependente, associado a hiperkeratose – aumento da maturação – resultando em hiperplasia dose-dependente; já a discreta hipertrofia celular ocorria de forma inversamente proporcional à dose, de forma que a EE era similar nas duas doses testadas.

Tabela 2 – Grau de inflamação induzida em pele de gerbil em função da dose de promotor.

Grupo	Exsudato celular
OC 0,94 mg	+++
OC 1,88 mg	+++
PB 20 mg	++
PB 40 mg	+
Acetona 0,2 ml	-

- ausente; +/- muito discreto; + leve; ++ leve a moderado; +++ moderado; ++++ moderado a acentuado; +++++ acentuado.

O OC, nas duas doses testadas, principalmente 1,88 mg, determinou degeneração vacuolar da camada basal, necrose focal de epiderme e reação inflamatória cutânea. O efeito flogístico do PB, 20 mg ou 40 mg, era menor que o registrado com OC e não havia grandes diferenças em função da dose (Tabela 2).

Figura 3 – Índice mitótico da epiderme interfolicular em função da freqüência de tratamento.

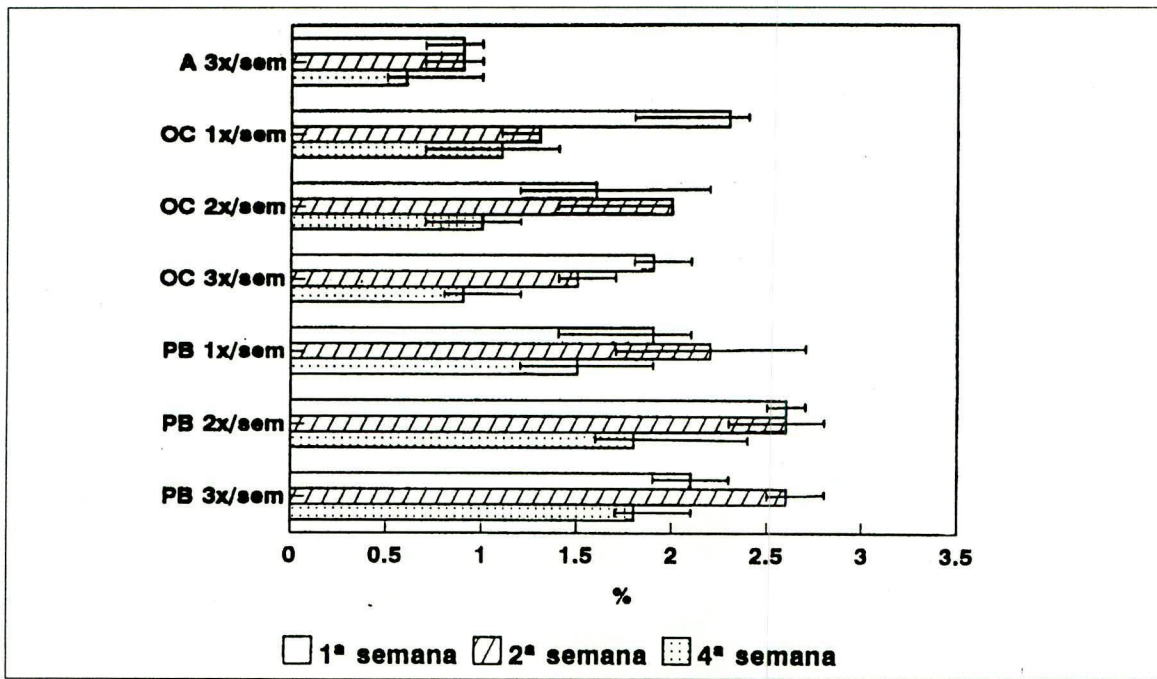
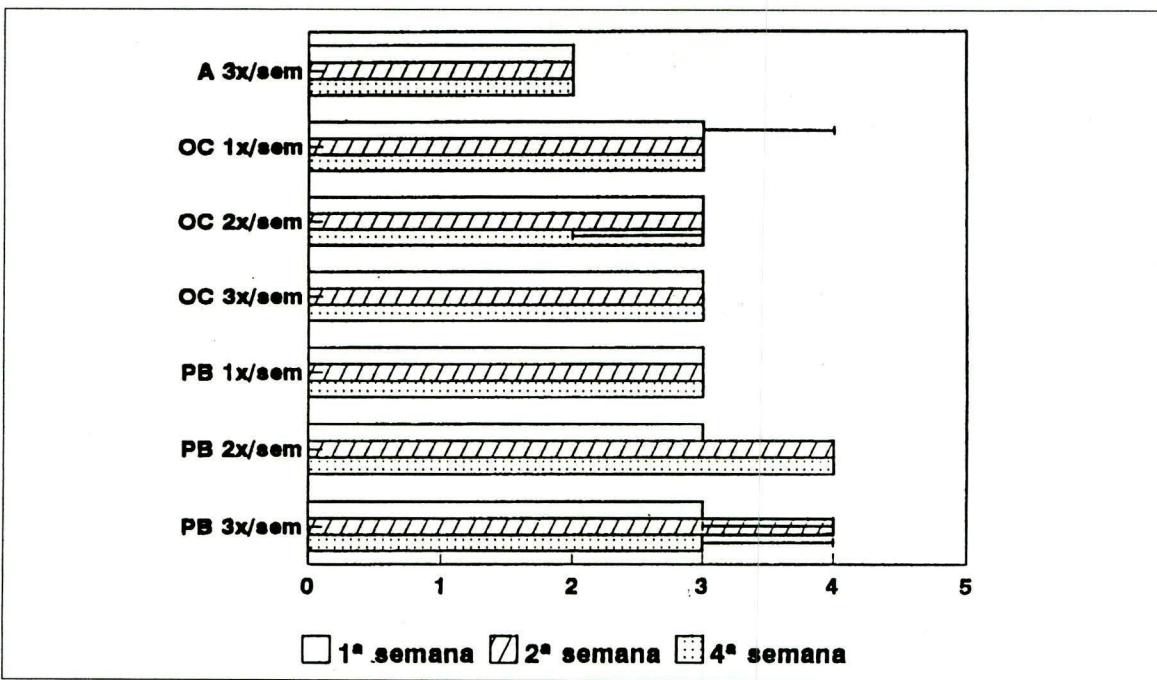


Figura 4 – Camadas celulares nucleadas da epiderme interfolicular em função da freqüência de tratamento promotor.



Efeito de promotores em função da freqüência de tratamento

O tratamento tópico tri-semanal com acetona não determinou qualquer alteração histológica na pele de gerbil adulto. O IM variava entre 0,5% e 1%, foram registradas, mais freqüentemente, 2 CCN, e a EE, excluindo a camada córnea, foi em média de 1,1 μ m (Figuras 3, 4 e 5).

Com ambos promotores aplicados repetidamente, o grau de hiperqueratose progredia; contudo, na 4ª semana a camada córnea era mais evidente na epiderme dos animais submetidos a OC, independente da freqüência de tratamento (Tabela 3).

Verificou-se que, com OC, o IM era significativamente maior que o controle, exceto na 4ª semana do tratamento tri-semanal, porém ocorria decréscimo significativo dos valores de IM, seja da 1ª e/ou 2ª semana para a 4ª semana, independente da freqüência de tratamento (Figura 3). Com relação às CCN, registrou-se aumento significativo, porém sem haver diferenças em função da freqüência de tratamento com OC ou do período de observação (Figura 4). Independente da freqüência de tratamento houve aumento significativo da EE a cada período de observação, em relação ao controle, contudo a redução na EE da 1ª para as 2ª e 4ª semanas, quando do tratamento com OC

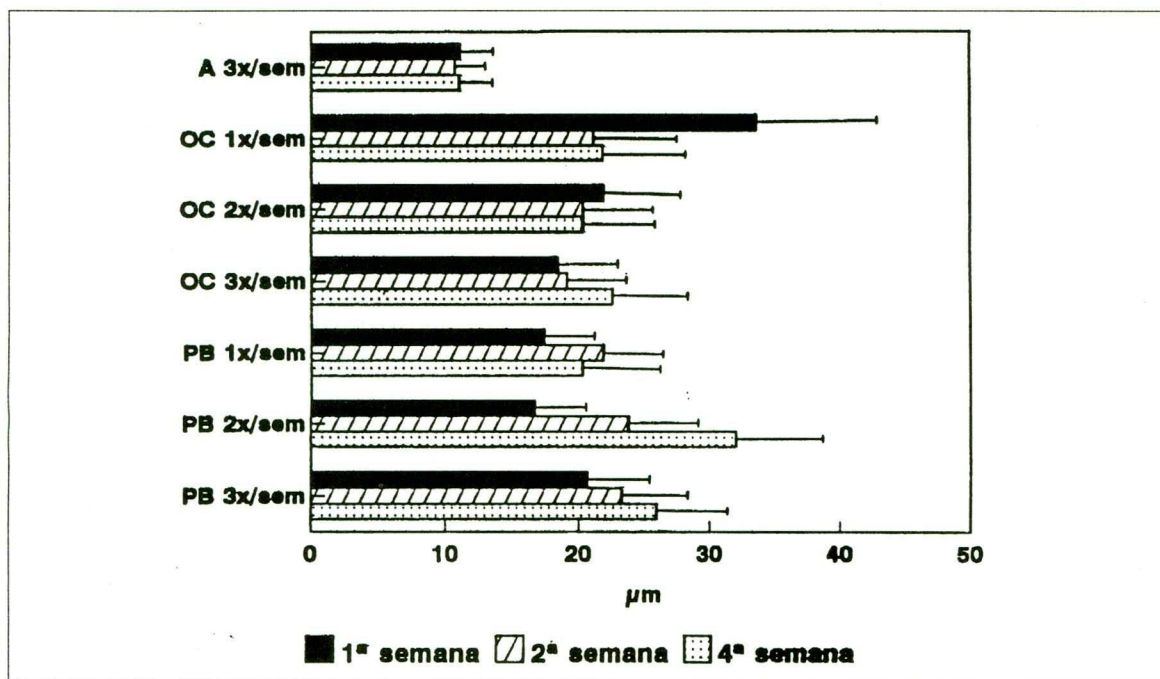


Figura 5 – Espessura da epiderme em função da frequência de tratamento promotor.

Tabela 3 – Grau de hiperqueratose induzida em epiderme de gerbil em função da frequência de tratamento promotor.

Grupo	1ª semana	2ª semana	4ª semana
OC 1x/sem	+	+	++
OC 2x/sem	++	+	++
OC 3x/sem	++	++	+++
PB 1x/sem	+	+	+
PB 2x/sem	+	++	+++
PB 3x/sem	+	++	++
Acetona 3x/sem	-	-	-

- ausente; + leve; ++ moderado; +++ acentuado.

na frequência semanal, foi significativa; na frequência bi-semanal a redução progressiva na EE foi mínima, e na frequência tri-semanal houve um discreto aumento progressivo da EE (Figura 5). Portanto, o tratamento repetido com OC determinou hiperqueratose progressiva – aumento da maturação – associada a estímulo proliferativo que diminuía ao prolongar-se o tratamento; entretanto, resultava em discreta hiperplasia, concomitante a hipertrofia, a qual se tornava mais evidente na frequência tri-semanal, de forma que apenas neste grupo havia discreto aumento progressivo da EE.

Os valores de IM, elevados quando do tratamento com PB, foram sempre significativamente diferentes do controle, porém também ocorria decréscimo significativo destes valores, seja da 1ª e/ou 2ª semana para a 4ª semana, independente da frequência de tratamento (Figura 3). Quanto às CCN, registrou-se aumento significativo em relação ao controle, e o PB apenas na frequência bi-semanal determinou, de forma significativa, aumento progressivo das CCN, que se manteve até a 4ª semana (Figura 4). Independente da frequência de tratamento houve aumento significativo da EE em relação ao controle, a cada período de observação (Figura 5). O PB nas 3 frequências testadas determinou aumento da EE, da 1ª para a 2ª semana, com progressão deste aumento na frequência bi e tri-semanal. Esta progressão na EE era muitíssimo mais acentuada quando do tratamento bi-semanal e teve significância estatística da 1ª para a 2ª e 4ª semana. Portanto, o tratamento repetido com PB determinou hiperqueratose progressiva – aumento da maturação – associada a estímulo proliferativo, que diminuía ao prolongar-se o tratamento, porém resultava em hiperplasia, que era acompanhada de hipertrofia celular, a qual era mais acentuada com o tratamento bi-semanal, de forma que neste grupo havia considerável aumento progressivo da EE.

Ainda, comparando o efeito de ambos promotores, os valores de IM determinados pelo OC foram sempre inferiores aos obtidos com PB, exceto na 1ª semana do tratamento semanal, e os valores de CCN obtidos com OC também eram inferiores aos registrados com PB, nas frequências bi e tri-

Tabela 4 – Grau de inflamação induzida em pele de gerbil em função da freqüência de tratamento promotor.

Grupo	1ª semana	2ª semana	4ª semana
OC 1x/sem	+++	+	++
OC 2x/sem	+++	++	++
OC 3x/sem	++	++	++
PB 1x/sem	+	++	+
PB 2x/sem	+	++	++
PB 3x/sem	+++	++	++
Acetona 3x/sem	-	-	-

- ausente; +/- muito discreto; + leve; ++ leve a moderado; +++ moderado; ++++ moderado a acentuado; +++++ acentuado.

semanal (Figuras 3 e 4). Assim sendo, o PB mostrou ser mais eficiente que o OC na indução de hiperplasia persistente, na epiderme de gerbil adulto, independente da freqüência de aplicação das substâncias promotoras. Após 4 semanas de tratamento, a hiperplasia era mais acentuada nos animais submetidos a PB bi-semanal.

Quanto ao efeito flogístico, o OC aplicado 1, 2 ou 3 vezes por semana determinou reação semelhante com aparente decréscimo progressivo da intensidade, exceto quando o tratamento era mais freqüente. Já com o PB, na freqüência bi-semanal,

houve alguma progressão do grau de inflamação, o qual ao fim da 4ª semana era similar aos graus registrados com OC (Tabela 4).

Por outro lado, não houve diferença significativa na variação ponderal dos animais dos diversos grupos, quer seja na 1ª, na 2ª ou na 4ª semana de observação (Figura 6). Contudo, verificou-se uma tendência de menor ganho ponderal quanto maior a freqüência de tratamento, e para a freqüência tri-semanal também foi registrada uma tendência de menor ganho ponderal em função do promotor, sendo OC < PB < A, inclusive com perda de peso final nos animais tratados topicamente com OC.

Modelos bifásicos e trifásicos de carcinogênese

Apenas o PB, independente de iniciação prévia, determinou ceratose, sugerindo um aumento da diferenciação epidérmica, que era mais intensa com o PB agindo na propagação, após tratamento com OC durante 20 semanas na conversão (Tabelas 5 e 6). Não ocorreu a indução de papiloma persistente com qualquer um dos protocolos testados, e só um gerbil, do grupo submetido a MC na iniciação, OC 1 x na conversão e PB durante 40 semanas na propagação, apresentou transitoriamente uma lesão cutânea semelhante a papiloma, medindo 1 mm de diâmetro, entre a 4ª e a 14ª semana (Tabela 6).

Por outro lado, não houve diferença significativa na variação ponderal dos animais entre os diversos grupos, nem destes em relação a grupo-testemunha de 16 gerbis não manipulados durante 40

Figura 6 – Variação ponderal em função da freqüência de tratamento promotor.

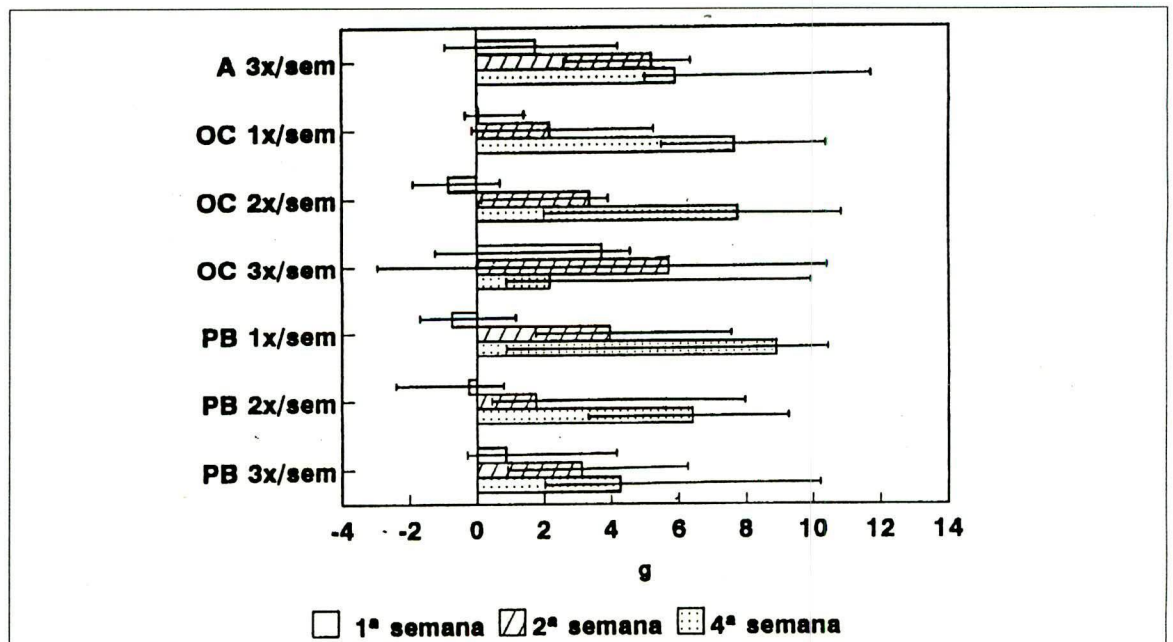


Tabela 5 – Macroscopia da pele dorsal após 40 semanas de tratamento com protocolos bifásicos de carcinogênese.

Grupo	Ceratose	Papilomas
MC/1x+OC/40sem	–	–
MC/1x+PB/40sem	+	–
OC/40sem	–	–
PB/40sem	+	–
Acetona/40sem	–	–

– ausente; +/- muito discreta; + leve. ++ moderada; +++ acentuada.

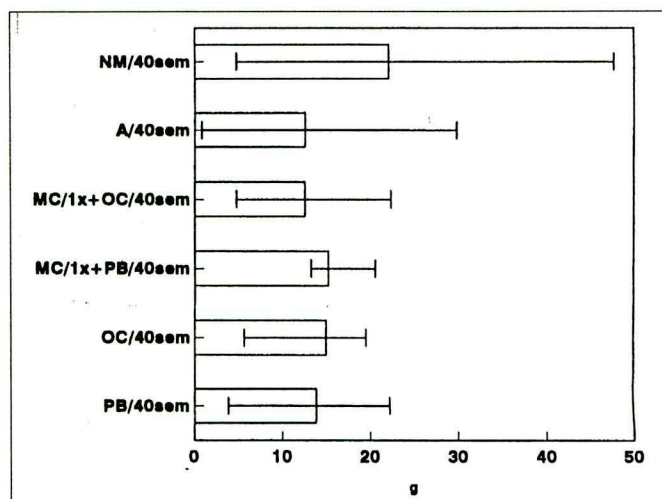
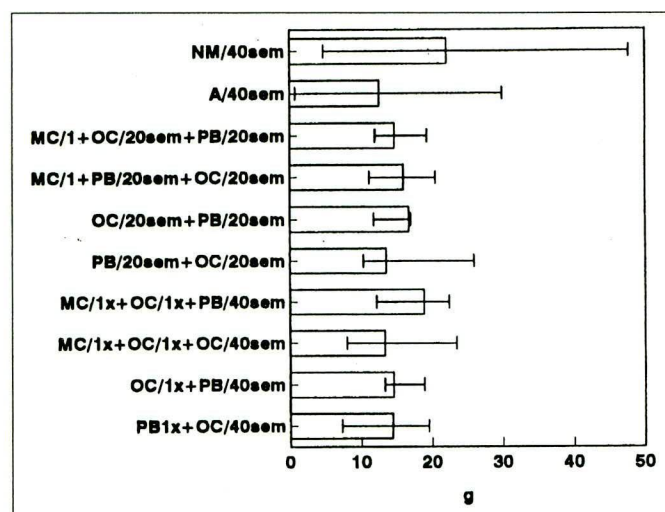
Tabela 6 – Macroscopia de pele dorsal após 40 semanas de tratamento com protocolos trifásicos de carcinogênese.

Grupo	Ceratose	Papilomas
MC/1x+OC/20sem+PB/20sem	++	–
MC/1x+PB/20sem+OC/20sem	–	–
OC/20sem+PB/20sem	++	–
PB/20sem+OC/20sem	–	–
MC/1x+OC/1x+PB/40sem	+	–*
MC/1x+PB/1x+OC/40sem	–	–
OC/1x+PB/40sem	+	–
PB/1x+OC/40sem	–	–
Acetona/40sem	–	–

*papiloma transitório; – ausente; +/- muito discreta; + leve; ++ moderada; +++ acentuada.

semanas (Figuras 4 e 8). Contudo, verificou-se uma tendência de menor ganho ponderal nos animais manipulados.

O tratamento tópico tri-semanal com acetona, prolongado por 40 semanas, não teve qualquer efeito sobre a estrutura histológica da pele de gerbil adulto. O maior grau de inflamação cutânea ocorreu nos gerbis tratados com OC durante 40 semanas independente de iniciação prévia, porém, nestes animais a hiperplasia epidérmica era mínima. Já o tratamento com PB, independente de iniciação prévia, determinou mais freqüentemente hiperplasia moderada, contudo, o grau de inflamação cutânea em todos estes animais era discreto (Tabelas 7 e 8).

**Figura 7** – Variação ponderal após 40 semanas de tratamento com protocolos bifásicos de carcinogênese.**Figura 8** – Variação ponderal após 40 semanas de tratamento com protocolos trifásicos de carcinogênese.

Discussão

Efeito de promotores em função da dose e da freqüência de tratamento

A pele de roedores tratada exclusivamente com acetona não apresenta alterações significativas quando comparada com a normal, isto é, a não tratada⁽⁷⁶⁻⁷⁸⁾. Da mesma forma, não verificamos qualquer alteração macroscópica na pele dos gerbis dos grupos-controle (dose e freqüência). A observação microscópica da EIF desses gerbis conferiu com a descrição correspondente à do camundongo^(76,79), sendo registradas com maior freqüência 2 CCN. Igual valor é referido em EIF de camundongo^(78,80-86), e em EIF de hamster^(55,87), ambos submetidos a aplicação tópica de acetona. A EE registrada nos gerbis dos grupos-controle (dose e

Tabela 7 – Histopatologia da pele dorsal após 40 semanas de tratamento com protocolos bifásicos de carcinogênese.

Grupo	Hiperplasia	Inflamação
MC/1x+OC/40sem	–	+
MC/1x+PB/40sem	++	+/-
OC/40sem	+	++
PB/40sem	+++	+
Acetona/40sem	–	–

– ausente; +/- muito discreta; + leve; ++ leve a moderada; +++ moderada; ++++ moderada a acentuada; +++++ acentuada.

Tabela 8 – Histopatologia da pele dorsal após 40 semanas de tratamento com protocolos trifásicos de carcinogênese.

Grupo	Hiperplasia	Inflamação
MC/1x+OC/20sem +PB/20sem	++	+
MC/1x+PB/20sem +OC/20sem	–	++
OC/20sem+PB/20sem	++	+/-
PB/20sem+OC/20sem	–	++
MC/1x+OC/1x+PB/40sem	++	++
MC/1x+PB/1x+OC/40sem	+	++++
OC/1x+PB/40sem	+++	++
PB/1x+OC/40sem	+/-	++++
Acetona/40sem	–	–

– ausente; +/- muito discreta; + leve; ++ leve a moderada; +++ moderada; ++++ moderada a acentuada; +++++ acentuada.

freqüência) também é similar aos valores descritos em camundongo^(78,80,82,83,88). Quanto ao IM, que variava nos animais-controle entre 0,1% e 1%, estes valores também são compatíveis com os registrados em EIF de camundongo^(78,79,82,89). Portanto, pode-se considerar que sob aspecto morfológico as peles de camundongo e de gerbil são semelhantes.

Nos trabalhos pioneiros em carcinogênese química cutânea, foram testados diversos solventes, parafina líquida^(57,90,91), óleo mineral⁽⁹²⁾, benzeno⁽¹⁾ e acetona^(80,93). Soluções de OC em concentração

elevada, de até 10%, eram pinceladas ou gotejadas na pele de roedores^(57,90-94). Uma vez que soluções menos concentradas de OC em acetona ainda permitiam detectar o efeito promotor desta substância em pele de camundongo^(80,93), foi, por assim dizer, padronizado o uso de OC 0,5% em acetona^(1,60,95). Estudos posteriores especificavam a alíquota de solução aplicada topicamente, que geralmente era de 0,2 ml^(60,95). As doses absolutas referidas na literatura, em diversos estudos sobre os efeitos do OC em pele de camundongo, variam entre 20 µg e 2,5 mg^(1,58,60,95-98). O limiar descrito para o efeito promotor do OC, em pele de camundongo, encontra-se entre 5 µg e 15 µg por aplicação⁽¹⁾. Em outras espécies animais, gerbil, coelho, porco e miniporco, é referida a utilização de doses mais elevadas, que variam entre 200 µg e 10 mg^(58,66,97). Com relação ao PB, as doses utilizadas em pele de camundongo variam entre 1 mg e 40 mg⁽⁵⁴⁾, porém, a dose mínima com efeito promotor é 20 mg^(49,51,54,61). As doses testadas neste trabalho, em pele de gerbil, 0,94 mg e 1,88 mg de OC, e 20 mg e 40 mg de PB, são efetivamente promotoras de tumores em pele de camundongo, e no caso do OC são bem superiores ao valor limiar dessa substância para aquela espécie.

As alterações induzidas na pele dos gerbis, mediante uma única aplicação de OC, ou seja, espessamento da epiderme, hipertrofia, atividade mitótica, hiperplasia, hiperkeratose e inflamação, foram similares às descritas na pele de camundongo, tratada com OC^(80,92) ou àquelas induzidas com seu elemento ativo tetradecanoilforbolacetato (TPA) em pele de camundongo^(78,81,84), rato Fischer 344⁽⁴⁸⁾, hamster sírio⁽⁵⁵⁾ e cobaio⁽⁹⁹⁾. Já uma única aplicação tópica de PB, na pele de gerbil, determinou aumento na EE, discreta hiperplasia, hiperkeratose e discreta inflamação, ao passo que no camundongo é descrito acentuado aumento na EE, hiperplasia, hiperkeratose e ausência de inflamação^(49,54).

Consta na literatura que a intensidade de diversos parâmetros avaliados em pele de camundongo, tais como EE, CCN e hiperkeratose⁽⁸¹⁾, e ainda, inflamação⁽¹⁰⁰⁾ e incidência tumoral^(1,26,53,100), varia dependendo da dose de promotor – OC ou TPA – utilizado. A dependência da dose também é referida para a hiperplasia induzida mediante TPA em epiderme de hamster sírio⁽⁵⁵⁾, e mediante PB em epiderme de camundongo⁽⁴⁹⁾. Em nosso material também verificamos que o grau de hiperplasia induzido em epiderme de gerbil era dose-dependente, com ambos promotores, porém no caso do OC foi o IM que apresentou diferença significativa

em função da dose, e no caso do PB foram as CCN. Já a EE e o grau de inflamação não apresentaram variação dose-dependente, quer seja com OC ou PB, e o grau de hiperkeratose foi similar com ambos promotores, sem apresentar variação dose-dependente. Isto sugere que uma única aplicação tópica, tanto de OC como de PB, induz maturação celular na epiderme de gerbil, e que o efeito hiperplásico, após uma única aplicação tópica de promotor, decorreria do estímulo proliferativo, mais acentuado no caso do OC, e do desequilíbrio entre o ganho (proliferação) e perda (maturação) celular.

As alterações induzidas mediante uma única aplicação de promotor regridem em 7 a 10 dias^(81,84), da mesma forma que os efeitos induzidos pela exposição crônica desaparecem 2 a 4 semanas após a suspensão do tratamento⁽⁸⁸⁾, inclusive a promoção tumoral^(8,101,102). Daí se entende que haveria um limiar baseado, não só na dose, mas principalmente na frequência de aplicação do promotor, uma vez que o efeito promotor não se manifesta a menos que o intervalo entre as aplicações seja suficientemente curto para permitir a adição dos efeitos induzidos a cada aplicação^(1,26,95,100,103). Chouroulinkov e colaboradores⁽⁵³⁾, ao estudarem o efeito de 24 combinações dose/frequência de TPA na promoção tumoral em pele de camundongo, concluíram que para cada dose testada, a incidência tumoral dependia da frequência de aplicação, e que para cada frequência de aplicação, a incidência de papilomas era dose-dependente. Observação similar já fora feita por Van Duuren e sua equipe⁽¹⁰⁰⁾. Em termos operacionais, consagrou-se a exposição ao promotor na frequência de duas^(48,55,56,59-61,63,88,98,104) ou três vezes por semana^(52,60,66,87,101,105). Neste trabalho foi testada a aplicação tópica semanal, bi-semanal e tri-semanal de 1,41 mg de OC e de 30 mg de PB.

Verificamos que, independente da frequência de tratamento, o PB era mais efetivo que o OC na indução de hiperplasia persistente, e embora com ambos promotores houvesse aumento inicial do IM, que se manteve acima dos valores do controle durante o tratamento, ao fim da 4ª semana esses valores eram inferiores aos da 1ª semana, para cada promotor e frequência de tratamento. A diminuição da atividade mitótica, durante a administração do promotor, era mais notória nos gerbis submetidos a OC, e considerando que a hiperkeratose também era mais evidente nestes animais, é provável que o menor ganho celular associado a maior perda celular tenham contribuído para a regressão da hiperplasia inicial. Ambos promotores

diferiam também no efeito sobre as CCN, sendo mais efetivo o PB bi-semanal, ao determinar aumento progressivo, que se manteve até a 4ª semana de tratamento, porém não chegando a ultrapassar 4 CCN (moda). Isto sugere que apesar da diminuição da atividade mitótica, o ganho celular era mantido ao exceder a perda celular pela maturação. Por outro lado, ambos promotores determinaram aumento da EE, havendo porém regressão acentuada com OC semanal. A discreta progressão na EE, registrada com OC tri-semanal, parece decorrer da manutenção da hipertrofia celular. No caso do PB bi-semanal, a progressão na EE era mais notória e decorria, provavelmente, não só da hipertrofia mas também do efeito hiperplásico (aumento das CCN). Efeito similar é descrito no hamster sírio, pelo tratamento tópico tri-semanal com PB⁽¹⁰⁶⁾. A adaptação da EIF do gerbil ao tratamento contínuo com OC foi similar à descrita em hamster sírio⁽⁵⁵⁾, e em rato Fischer 344 e hamster sírio⁽⁴⁸⁾; ambas espécies, do mesmo modo que o gerbil, são relativamente insensíveis à promoção com ésteres de forbol.

A afirmação que se refere à correlação entre indução de hiperplasia persistente e susceptibilidade à promoção⁽⁴⁸⁾ parece ser correta, porquanto espécies de linhagens de roedores sensíveis à promoção mantêm ou experimentam progressão da hiperplasia inicial^(56,81,88,104), e nas espécies de linhagens menos susceptíveis, como rato Fischer 344 e hamster sírio, ocorre regressão da hiperplasia inicial^(48,55), sendo essa regressão mais rápida quanto maior a frequência do tratamento. Entretanto, para outros promotores, como o PB, essa correlação entre hiperplasia persistente e promoção tumoral não é sempre evidenciada, visto que camundongos sensíveis à promoção com ésteres de forbol – SENCAR, DBA/2 – exibem EE similar à de camundongos menos susceptíveis – C57BL/6 – após aplicação de PB bi-semanal por duas semanas^(51,104), mantendo-se a hiperplasia em níveis baixos, com EE entre 20 μm e 25 μm . A maior diferença entre linhagens de camundongos com diversa sensibilidade à promoção com ésteres de forbol, quando tratados com PB, está relacionada à resposta inflamatória, avaliada pela formação de edema, sendo que esse efeito é mais acentuado nas linhagens sensíveis à promoção⁽¹⁰⁴⁾.

No presente estudo, observou-se que o efeito flogístico, inicialmente, era mais acentuado na pele dos gerbis tratados com OC, principalmente na frequência bi-semanal, e esse efeito regredia ligeiramente durante o tratamento, sem haver variação dependente da frequência ao fim da 4ª semana

de tratamento. Já o PB determinou progressão do grau de inflamação quando aplicado bi-semanalmente, chegando a ser similar, na 4ª semana, ao grau registrado com OC. Verificou-se, portanto, que a indução de inflamação diferia na intensidade inicial e na forma de evolução durante o tratamento, refletindo talvez mecanismos diferentes na ativação do processo, segundo cada promotor.

Carcinogênese bifásica e trifásica

Diferentemente de outros autores^(26,66,67), no presente trabalho não foi verificada indução tumoral com os modelos bifásicos de carcinogênese, quer seja utilizando OC ou PB como promotores. Não pode deixar de ser considerado que nesses estudos utilizaram-se doses elevadas no tratamento com OC, de forma que efeitos citotóxicos, necrose e regeneração epidérmica podem ter participado no processo de promoção tumoral. Conforme diversos autores^(1,53,100), a efetividade da promoção é determinada, operacionalmente, tanto pela dose como pela frequência do tratamento promotor. Porém, considerando a patogenia do processo de promoção tumoral que consiste essencialmente, de acordo com os conhecimentos atuais, na expansão clonal seletiva de células previamente iniciadas^(8,9,107-110), apenas o PB determinou, simultaneamente, as alterações morfológicas que parecem necessárias para a expansão seletiva, ou seja, hiperplasia persistente, distúrbio da diferenciação epidérmica, e inflamação. Entretanto, foi o protocolo trifásico – iniciação/MC, conversão/OC, propagação/PB – que determinou transitoriamente uma lesão cutânea semelhante a papiloma em um animal, e não ocorreu a indução definitiva de papilomas com qualquer um dos protocolos testados.

Em pele de camundongo, o surgimento de papilomas é considerado o fim da etapa de promoção, sendo que dos múltiplos papilomas induzidos mediante o protocolo clássico iniciação-promoção, muitos regredem após a suspensão do tratamento promotor^(8,101,102). Uma possível explicação para esse fenômeno de regressão tumoral seria que, na ausência do estímulo proliferativo determinado pelo promotor, a taxa de ganho celular torna-se insuficiente e não consegue compensar a taxa de perda celular, de forma que o papiloma desaparece⁽¹⁰¹⁾. Entretanto, no gerbil a regressão aconteceu durante o tratamento com PB. A presença de papiloma transitório, em pele de gerbil, também já fora descrita durante o tratamento bi-semanal com OC 0,5%⁽⁷¹⁾. Ambos promotores parecem ser ineficientes na indução da expansão clonal seletiva das células iniciadas em epiderme de gerbil.

Os ésteres de forbol, elementos ativos do OC, embora sejam potentes promotores tumorais na epiderme de camundongo, mostram-se ineficientes em outras espécies de roedores^(48,57,69,71) e em determinadas linhagens de camundongos⁽⁶⁰⁾, entre elas a C57BL/6^(52,61). A ineficiência do TPA como promotor nessa linhagem parece estar relacionada a incapacidade de manter a hiperplasia epidérmica^(12,50). De forma similar, o gerbil não responde à promoção com OC, como confirmado no presente trabalho, verificando-se ausência de hiperplasia persistente⁽⁶⁹⁻⁷¹⁾. Já outros promotores, como o PB, são efetivos promotores em pele de camundongo^(49,54), inclusive nas linhagens resistentes aos ésteres de forbol^(61,104,10). Entretanto, os percentuais de papilomas/camundongo e de camundongos com papilomas, induzidos mediante promoção com PB, são sempre mais elevados nas linhagens sensíveis^(61,104), e neste trabalho verificou-se, no gerbil, apenas a indução transitória de papiloma.

Ambas espécies, gerbil e camundongo C57BL/6, têm uma característica em comum, a de apresentar, em relação ao peso corporal respectivo, glândulas adrenais grandes^(7,65,69). No gerbil, a relação peso adrenais/peso corporal é aproximadamente de 1:1000, ao passo que no camundongo suíço essa relação é de 1:1500⁽⁶⁹⁾. É provável que tanto no gerbil como no camundongo C57BL/6 ocorra modulação da promoção por glucocorticóides endógenos. De fato, o efeito promotor tumoral dos ésteres de forbol é inibido por esteróides antiinflamatórios^(1,111-114). Os glucocorticóides, agindo via receptor citoplasmático^(115,116), são potentes inibidores, na epiderme de camundongo, da síntese de DNA e da divisão celular^(111-113,117,118) e consequentemente frustram a indução da hiperplasia pelos ésteres de forbol⁽¹¹³⁾.

O processo de formação de tumores é sujeito a modificações por diversos fatores, como situações de estresse, entre outros⁽¹⁾. O estresse, por seus potentes efeitos neuro-hormonais, pode alterar a susceptibilidade dos animais a uma ampla variedade de doenças, incluindo neoplasias⁽¹¹⁹⁾. Por outro lado, corticoesteróides antiinflamatórios como a dexametasona provocam perda de peso, além de inibir a promoção tumoral⁽¹²⁰⁾. Considerando essas informações, avaliamos a variação ponderal dos gerbis, durante os diversos protocolos testados, como indicativo indireto do grau de estresse induzido nos animais. Não houve diferença significativa na variação ponderal dos animais entre os diversos grupos, contudo, havia uma tendência de menor ganho ponderal nos gerbis manipulados. É provável que o estado de estresse, induzido pela manipu-

lação, tenha sido ligeiramente superior nos animais submetidos aos procedimentos experimentais. Além disso, o OC, por seu efeito irritativo, poderia estar acentuando o estado de estresse, uma vez que até a 4ª semana de tratamento verificamos uma tendência de menor ganho ponderal nos gerbis submetidos a essa substância. No gerbil, o estresse agudo aumenta de forma significativa a concentração de glucocorticóides, quase quadruplicando os níveis plasmáticos normais⁽¹²¹⁾. Os esteróides antiinflamatórios, como já mencionado acima, são potentes inibidores, na epiderme de camundongo, de vários efeitos dos ésteres de forbol, havendo conseqüentemente inibição da promoção tumoral^(10,68,122). Isto poderia explicar a ausência de papilomas com os diversos protocolos testados. Contudo, com base nos resultados exclusivamente morfológicos, não foi possível estabelecer-se categoricamente essa correlação, mas as diferenças na susceptibilidade à carcinogênese química cutânea, entre diversas espécies animais e linhagens de camundongos, já têm sido relacionadas à modulação da promoção por hormônios esteróides⁽⁶⁰⁾.

Por outro lado, a inflamação induzida tanto com OC tri-semanal como com PB bi-semanal, ao fim de 4 semanas foi similar. Após 40 semanas de tratamento, a inflamação cutânea era mais acentuada nos gerbis submetidos aos protocolos de carcinogênese bifásica e trifásica, nos quais utilizava-se OC como promotor e propagador. Radicais livres liberados pelos leucócitos infiltrados no local poderiam influir na atividade promotora do PB e, principalmente, do OC. Entretanto, a liberação de radicais livres pelos leucócitos infiltrados na pele parece ser um efeito secundário, e sua participação resulta insuficiente na indução tumoral em pele de gerbil. Além disso, a pele dorsal de gerbil adulto, embora morfológicamente seja similar à pele dorsal de camundongo, apresenta inferior estado antioxidante e pró-oxidante⁽¹²³⁻¹²⁵⁾. O baixo potencial gerador de radicais livres, por via enzimática, também poderia ser um dos fatores responsáveis pela resistência relativa da pele de gerbil à carcinogênese química. Contudo, o PB determina na pele de gerbil efeito similar ao do OC na pele de camundongo, no que se refere a indução de atividade xantina oxidase (XO)⁽¹²⁵⁾ e, coincidentemente, foi com um dos protocolos em que se utilizava PB como promotor – propagador – que ocorreu transitoriamente uma lesão cutânea semelhante a papiloma.

Concluimos que a base biológica da resistência relativa da pele de gerbil adulto à indução química de tumores de linhagem epidérmica está relacionada a ausência de hiperplasia persistente, devido

à manutenção do estado de equilíbrio entre proliferação celular e maturação, permanecendo a renovação celular constante e prejudicando a expansão clonal seletiva de células epidérmicas, principalmente com OC. Entre as perspectivas para futuras pesquisas, já delineadas pelos participantes do “American Cancer Society Workshop on Tumor Promotion”⁽¹¹⁰⁾, encontra-se o estudo da estrutura e da função dos genes que determinam a susceptibilidade à promoção tumoral em diversos sistemas de modelos animais e humanos. Portanto, a caracterização do gerbil como espécie relativamente resistente à carcinogênese química cutânea fornece subsídio à pesquisa dos determinantes genéticos da carcinogênese multifásica.

Summary

In order to explain the biological basis of the adult gerbil skin relative resistance to chemical carcinogenesis it was characterized the effect of croton oil and benzoyl peroxide tumor promoters by studying the morphological changes related to promotion and induced in adult gerbil skin according to different doses, treatment frequencies, and associated pretreatment with the tumor initiator methylcholanthrene, through biphasic and triphasic carcinogenesis protocols. Similar degree of hyperkeratosis and dose-dependent hyperplasia were induced in the interfollicular epidermis after one topical application of croton oil (0.94 mg and 1.88 mg) or benzoyl peroxide (20 mg and 40 mg). Epidermal enlargement, cellular hypertrophy and inflammation were more pronounced with croton oil treatment. Proliferative stimulus and imbalance between epidermal proliferation and differentiation could be responsible for the hyperplasia, which was more intense with croton oil treatment. The initial proliferative stimulus was reduced after repeated topical treatment with croton oil (1.41 mg) or benzoyl peroxide (30 mg). Croton oil also induced intense hyperkeratosis and regression of initial hyperplasia, which could be related to imbalance between proliferation and differentiation in favour of cellular loss. Twice or thrice a week treatment with benzoyl peroxide induced discrete progression of initial hyperplasia, which could be related to slight imbalance between proliferation and differentiation predominating a discrete cellular gain. Both substances determined different inflammatory effect, since there was regression with croton oil and progression with benzoyl peroxide. Divergent hyperplastic and inflammatory responses could be reflecting different mechanisms of action of these two compounds. When croton oil and benzoyl

peroxide were administered after methylcholanthrene (0.2 mg) through biphasic or triphasic carcinogenesis protocols, only benzoyl peroxide showed discrete and transitory promotion – propagation – of papillomas in adult gerbil skin. Taking into account the regression of the proliferative stimulus registered during repeated treatment with both promoters and the response associated to cellular differentiation – hyperkeratosis – it was concluded that those effects interfered in the selective clonal expansion of epidermal cells, mainly with croton oil treatment, and could be related to the biological basis of adult gerbil skin relative resistance to chemical epidermal carcinogenesis.

Key words: carcinogenesis; initiation; promotion; skin; gerbil.

Referências Bibliográficas

- BOUTWELL, R.K. – Some biological aspects of skin carcinogenesis. *Prog Exp Tumor Res*, 4:207-250, 1964.
- 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.
- YUSPA, S.H. – Molecular and cellular basis for tumor promotion in mouse skin. *Int Symp Princess Takamatsu Cancer Res Fund*, 14:315-326, 1983.
- GUZMÁN-SILVA, M.A.; GUIMARÃES, J.S.P. – Carcinogênese química cutânea. *Rev Bras Cancerol*, 31:285-291, 1985.
- 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.
- 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.
- 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.
- HENNINGS, H.; YUSPA, S.H. – Two-stage tumor promotion in mouse skin: an alternative interpretation. *JNCI*, 74:735-740, 1985.
- MARKS, F.; FÜRSTENBERGER, G. – Experimental evidence that skin carcinogenesis is a multistep phenomenon. *Br J Dermatol*, 115:1-8, 1986.
- MARKS, F.; FÜRSTENBERGER, G. – Multistage tumor promotion in skin. *Int Symp Princess Takamatsu Cancer Res Fund*, 14:273-287, 1983.
- 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.
- 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.
- CHU, K.C.; BROWN, C.C.; TARONE, R.E.; TAN, W.Y. – Differentiating among proposed mechanisms for tumor promotion in mouse skin with the use of the multievent model for cancer. *JNCI*, 79:789-796, 1987.
- HENNINGS, H.; BOWDEN, G.T.; BOUTWELL, R.K. – The effect of croton oil pretreatment on skin tumor initiation in mice. *Cancer Res*, 29:1773-1780, 1969.
- YUSPA, S.H.; HENNINGS, H.; SAFFIOTTI, U. – Cutaneous chemical carcinogenesis: past, present and future. *J Invest Dermatol*, 67:199-208, 1976.
- 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.
- 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.
- HARPER, J.R.; REYNOLDS, S.H.; GREENHALGH, D.A.; STRICKLAND, J.E.; LACAL, J.C.; YUSPA, S.H. – Analysis of the *ras*^H oncogene and its p21 product in chemically induced skin tumors and tumor-derived cell lines. *Carcinogenesis*, 8:1821-1825, 1987.
- 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.
- 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.
- 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*^H oncogene in mouse skin carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 12:1119-1124, 1991.
- FÜRSTENBERGER, G.; MARKS, F. – Growth stimulation and tumor promotion in skin. *J Invest Dermatol*, 81:157s-162s, 1983.
- 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.
- 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.
- SAFFIOTTI, U.; SCHUBICK, P. – Studies on promoting action in skin carcinogenesis. *Natl Cancer Inst Monogr*, 10:489-507, 1963.
- VAN DUUREN, B.L. – Tumor promoting agents in two-stage carcinogenesis. *Prog Exp Tumor Res*, 11:51-68, 1969.
- SCHMIDT, R.J.; EVANS, F.J. – Skin irritant effects of esters of phorbol and related polyols. *Arch Toxicol*, 44:279-289, 1980.
- COTTERILL, J.A. – Benzoyl peroxide. *Acta Derm Venereol (Stock)*, Suppl. 89:57-63, 1980.
- IARC – Benzoyl peroxide. *IARC Monogr Eval Carcinog Risk Chem Hum*, 36:267-283, 1985.

30. DELCLOS, K.B.; NAGLE, D.S.; BLUMBERG, P.M. – Specific binding of phorbol ester tumor promoters to mouse skin. *Cell*, 19:1025-1032, 1980.
31. DRIEDGER, P.E.; BLUMBERG, P.M. – Specific binding of phorbol ester tumor promoters. *Proc Natl Acad Sci USA*, 77:567-571, 1980.
32. 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.
33. WHELDRAKE, J.F.; MARSHALL, J.; RAMLI, J.; MURRAY, A.W. – Skin carcinogenesis and promoter binding characteristics in different mouse strains. *Carcinogenesis*, 3:805-807, 1982.
34. ITAI, A.; KATO, Y.; TOMIOKA, N. et al – A receptor model for tumor promoters: rational superposition of teleocidins and phorbol esters. *Proc Natl Acad Sci USA*, 85:3688-3692, 1988.
35. 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.
36. BLUMBERG, P.M.; SHARKEY, N.A.; KÖNIG, G.; JAKEN, S.; LEACH, K.L.; JENG, A.Y. – Phorbol ester receptors-insights into the initial events in the mechanism of action of the phorbol esters. *Int Symp Princess Takamatsu Cancer Res Fund*, 14:75-87, 1983.
37. BLUMBERG, P.M.; JAKEN, S.; KÖNIG, B et al – Mechanism of action of the phorbol ester tumor promoters: specific receptors for lipophilic ligands. *Biochem Pharmacol*, 33:933-940, 1984.
38. HECKER E. – Cell membrane associated protein kinase C as receptor of diterpene ester co-carcinogens of the tumor promoter type and the phenotypic expression of tumors. *Arzneim-Forsch/Drug Res*, 35:1890-1903, 1985.
39. 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.
40. BURNS, D.J.; BELL, R.M. – Protein kinase C contains two phorbol ester binding domains. *J Biol Chem*, 266:18330-18338, 1991.
41. NAKAMURA, Y.; COLBURN, N.H.; GINDHART, T.D. – Role of oxygen in tumor promotion: implication of superoxide anion in promotion of neoplastic transformation in JB-6 cells by TPA. *Carcinogenesis*, 6:229-235, 1985.
42. MARNETT, L.J. – Peroxyl free radicals: potential mediators of tumor initiation and promotion. *Carcinogenesis*, 8:1365-1373, 1987.
43. 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.
44. 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.
45. DONNELLY JR., T.E.; PELLING, J.C.; ANDERSON, C.L.; DALBEY, D. – Benzoyl peroxide activation of protein kinase C activity in epidermal cell membranes. *Carcinogenesis*, 8:1871-1874, 1987.
46. KUMAR, R.; HOLIAN, O. – Inhibition of mouse skin protein kinase C by benzoyl peroxide. *J Invest Dermatol*, 96:490-494, 1991.
47. 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.
48. SISKIN, E.E.; GRAY, T.; BARRETT, J.C. – Correlation between sensitivity to tumor promotion and sustained epidermal hyperplasia of mice and rats treated with 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Carcinogenesis*, 3:403-407, 1982.
49. 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.
50. 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.
51. NAITO, M.; NAITO, Y.; DI GIOVANNI, J. – Comparison of the histological changes in the skin of DBA/2 and C57BL/6 mice following exposure to various promoting agents. *Carcinogenesis*, 8:1807-1815, 1987.
52. CHOUROULINKOV, I.; LASNE, C.; PHILLIPS, D.; GROVER, P. – Sensitivity of the skin of different mouse strains to the promoting effect of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Bull Cancer (Paris)*, 75:557-565, 1988.
53. CHOUROULINKOV, I.; LASNE, C.; LOWY, R. et al – Dose and frequency effect in mouse skin tumor promotion. *Cancer Res*, 49:1964-1969, 1989.
54. 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.
55. SISKIN, E.E.; BARRETT, J.C. – Hyperplasia of Syrian hamster epidermis induced by single but not multiple treatments with 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Cancer Res*, 41:346-350, 1981.
56. GOERTTLER, K.; LOEHRKE, H.; SCHWEIZER, J.; HESSE, B. – Positive 2-stage carcinogenesis in female Sprague-Dawley rats using 7,12-dimethylbenz[a]anthracene as initiator and 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate as promoter: results of a pilot study. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol*, 385:181-186, 1980.
57. SHUBICK, P. – Studies on the promoting phase in the stages of carcinogenesis in mice, rats, rabbits, and guinea pigs. *Cancer Res*, 10:13-17, 1950.
58. STENBACK, F. – Skin carcinogenesis as a model system: observations on species, strain, and tissue sensitivity to 7,12-dimethylbenz[a]anthracene with or without promotion from croton oil. *Acta Pharmacol Toxicol*, 46:89-97, 1980.
59. GOERTTLER, K.; LOEHRKE, H.; HESSE, B.; SCHWEIZER, J. – Skin tumor formation in the European hamster (*Cricetus cricetus* L) after topical initiation with 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) and promotion with 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA). *Carcinogenesis*, 5:521-524, 1984.
60. ASHMAN, L.K.; MURRAY, A.W.; COOK, M.G.; KOTLARSKI, I. – Two-stage skin carcinogenesis in sensitive and resistant mouse strains. *Carcinogenesis*, 3:99-102, 1982.
61. 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.

62. HENNINGS, H.; DEVOR, D.; WENK, M.L. et al – Comparison of two-stage epidermal carcinogenesis initiated by 7,12-dimethylbenz[a]anthracene or N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in newborn and adult SENCAR and Balb/c mice. *Cancer Res*, 41:773-779, 1981.
63. FISCHER, S.M.; O'CONNELL, J.F.; CONTI, C.J. et al – Characterization of an inbred strain of the SENCAR mouse that is highly sensitive to phorbol esters. *Carcinogenesis*, 8:421-424, 1987.
64. SCHWENTKER, V. – The gerbil. A new laboratory animal. *Illinois Vet*, 6:5-9, 1963.
65. HANDLER, A.H.; MAGALINI, S.I.; PAV, D. – Oncogenic studies on the Mongolian gerbil. *Cancer Res*, 26:844-847, 1966.
66. QUEVEDO JR., W.C.; BIENIEKI, T.C.; FAUSTO, N.; MAGALINI, S.I. – Induction of pigmentary changes in the skin of the Mongolian gerbil by chemical carcinogens. *Experientia*, 24:585-586, 1968.
67. MC DONALD, C.J.; QUEVEDO JR., W.C.; BIENIEKI, T.C.; FAUSTO, N. – Role of melanocytes in responses of the skin of Mongolian gerbils to chemical carcinogens. *J Invest Dermatol*, 54:92, 1970.
68. WEINSTEIN, I.B.; TROLL, W. – National Cancer Institute workshop on tumor promotion and cofactors in carcinogenesis. *Cancer Res*, 37:3461-3463, 1977.
69. GUZMÁN-SILVA, M.A.; GUIMARÃES, J.S.P. – Análise morfológica comparativa da carcinogênese química cutânea entre camundongo (*Mus musculus*) e gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Rev Bras Cancerol*, 32:31-42, 1986.
70. GUZMÁN-SILVA, M.A.; ROSSI, M.I.D.; GUIMARÃES, J.S.P. – Estudo do gerbil (*Meriones unguiculatus*) como modelo em oncologia experimental. I. Indução de neoplasias cutâneas. *Rev Bras Cancerol*, 32:155, 1986.
71. GUZMÁN-SILVA, M.A.; ROSSI, M.I.D.; GUIMARÃES, J.S.P. – Carcinogênese química cutânea e subcutânea em gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Acta Oncol Bras*, 9/10:66-72, 1989/1990.
72. LEBLOND, C.P.; WALKER, B.E. – Renewal of cell populations. *Physiol Rev*, 36:255-275, 1956.
73. IVERSEN, O.H.; IVERSEN, U.M. – Is there a diurnal variation in the susceptibility of mouse skin to the tumorigenic action of methylcholanthrene? A study of tumour yield with special reference to the variation between cages. *Acta Path Microbiol Scand (A)*, 84:406-414, 1976.
74. WRIGHT, N.A.; APPLETON, D.R. – The metaphase arrest technique. A critical review. *Cell Tissue Kinet*, 13:643-663, 1980.
75. CAMPOS, H. – Estatística experimental não-paramétrica. 4ª ed. Piracicaba: USP, 113-134; 202-211; 234-243, 1983.
76. SETÄLÄ, K.; MERENMIES, L.; STJERNVALL, L.; AHO, Y.; KAJANNE, P. – Mechanism of experimental tumorigenesis. I. Epidermal hyperplasia in mouse caused by locally applied tumor initiator and dipole-type tumor promoter. *JNCI*, 23:925-951, 1959.
77. TARIN, D. – Sequential electron microscopical study of experimental mouse skin carcinogenesis. *Int J Cancer*, 2:195-211, 1967.
78. RAICK, A.N. – Ultrastructural, histological and biochemical alterations, produced by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate on mouse epidermis and their relevance to skin tumor promotion. *Cancer Res*, 33:269-286, 1973.
79. SETÄLÄ, K.; MERENMIES, L.; STJERNVALL, L.; NYHOLM, M. – Mechanism of experimental tumorigenesis. IV. Ultrastructure of interfollicular epidermis of normal adult mouse. *JNCI*, 24:329-353, 1960.
80. POUND, A.W. – Carcinogenesis and cell proliferation. *N Z Med J*, 67:88-99, 1968.
81. RAICK, A.N.; THUMM, K.; CHIVERS, B.R. – Early effects of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate on the incorporation of tritiated precursors into DNA, and the thickness of the interfollicular epidermis, and their relation to tumor promotion in mouse skin. *Cancer Res*, 32:1562-1568, 1972.
82. RAICK, A.N.; BURDZY, K. – Ultrastructural and biochemical changes induced in mouse epidermis by a hyperplastic agent, ethylphenylpropiolate. *Cancer Res*, 33:2221-2230, 1973.
83. RAICK, A.N. – Cell proliferation and promoting action in skin carcinogenesis. *Cancer Res*, 34:920-926, 1974.
84. ARGYRIS, T.S. – Epidermal growth following a single application of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in mice. *Am J Pathol*, 98:639-648, 1980.
85. ARGYRIS, T.S. – The nature of the epidermal growth produced by the first application of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate on the skin of mice initiated with dimethylbenzanthracene. *J Invest Dermatol*, 77:230-234, 1981.
86. ARGYRIS, T.S. – Nature of the epidermal hyperplasia produced by mezerein, a weak tumor promoter, in initiated skin of mice. *Cancer Res*, 43:1768-1773, 1983.
87. HASPER, F.; MÜLLER, G.; SCHWEIZER, J. – Histological, proliferative, and biochemical alterations in dorsal epidermis of the Syrian golden hamster induced by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate and the calcium ionophore A23187. *Cancer Res*, 42:2034-2039, 1982.
88. ALDAZ, C.M.; CONTI, C.J.; GIMÉNEZ, I.B.; SLAGA, T.J.; KLEIN-SZANTO, A.J.P. – Cutaneous changes during prolonged application of TPA on mouse skin and residual effects after cessation of treatment. *Cancer Res*, 45:2753-2759, 1985.
89. POTTEN, C.S. – Cell replacement in epidermis (keratopoiesis) via discrete units of proliferation. *Int Rev Cytol*, 69:271-318, 1981.
90. 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.
91. 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.
92. FREI, J.V.; STEPHENS, P. – The correlation of promotion of tumour growth and of induction of hiperplasia in epidermal two-stage carcinogenesis. *Br J Cancer*, 22:83-89, 1968.
93. BERENBLUM, I. – The cocarcinogenic action of croton resin. *Cancer Res*, 1:44-48, 1941.
94. SALAMAN, M.H.; GWYNN, R.H. – The histology of co-carcinogenesis in mouse skin. *Br J Cancer*, 5:252-263, 1951.
95. HENNINGS, H.; BOUTWELL, R.K. – Studies on the mechanism of skin tumor promotion. *Cancer Res*, 30:312-320, 1970.
96. WALTERS, M.A.; ROE, F.J.C. – The induction of tumors in mice by neonatal injection of 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene (DMBA) followed by applications of croton oil to the skin. *Br J Cancer*, 21:358-366, 1967.

97. KRUEGER, G.G.; CHAMBERS, D.A.; SHELBY, J. – Epidermal proliferation of nude mouse skin, pig skin and pig skin grafts. Failure of nude mouse skin to respond to the tumor promoter 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *J Exp Med*, 152:1329-1333, 1980.
98. BERKELHAMMER, J.; OXENHANDLER, R.W. – Evaluation of premalignant and malignant lesions during the induction of mouse melanomas. *Cancer Res*, 47:1251-1254, 1987.
99. BOURIN, M.C.; DELESCLUSE, C.; FÜRSTENBERGER, G. et al – Effect of phorbol esters on guinea pig skin *in vivo*. *Carcinogenesis*, 3:671-676, 1982.
100. VAN DUUREN, B.L.; SIVAK, A.; SEGAL, A.; SEIDMAN, I.; KATZ, C. – Dose-response studies with a pure tumor-promoting agent, phorbol myristate acetate. *Cancer Res*, 33:2166-2172, 1973.
101. BURNS, F.J.; VANDERLAAN, M.; SIVAK, A.; ALBERT, R.E. – Regression kinetics of mouse skin papillomas. *Cancer Res*, 36:1422-1427.
102. REDDY, A.L.; CALDWELL, M.; FIALKOW, P.J. – Sequential studies of skin tumorigenesis in phosphoglyceratekinase mosaic mice: effect of resumption of promotion on regressed papillomas. *Cancer Res*, 47:1947-1951.
103. VAN DUUREN, B.L.; SIVAK, A. – Tumor-promoting agents from *Croton tiglium* L. and their mode of action. *Cancer Res*, 28:2349-2356, 1968.
104. 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.
105. GOERTTLER, K.; LOEHRKE, H.; SCHWEIZER, J.; HESSE, B. – Two-stage tumorigenesis of dermal melanocytes in the back skin of the Syrian golden hamster using systemic initiation with 7,12-dimethylbenz[a]anthracene and topical promotion with 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Cancer Res*, 40:155-161, 1980.
106. SCHWEIZER, J.; LOEHRKE, H.; EDLER, L.; GOERTTLER, K. – Benzoyl peroxide promoters the formation of melanotic tumors in the skin of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-initiated Syrian golden hamsters. *Carcinogenesis*, 8:479-482, 1987.
107. 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.
108. YUSPA, S.H.; KULESZ-MARTIN, M.; BEN, T.; HENNINGS, H. – Transformation of epidermal cells in culture. *J Invest Dermatol*, 81:162s-168s, 1983.
109. YUSPA, S.H. – Mechanisms of initiation and promotion in mouse epidermis. *IARC Sci Publ*, 56:191-204, 1984.
110. 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.
111. TRAININ, N. – Adrenal imbalance in mouse skin carcinogenesis. *Cancer Res*, 23:415-419, 1963.
112. 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.
113. SLAGA, T.J. – Anti-inflammatory steroids: potent inhibitors of tumor promotion. In: SLAGA, T.J., ed. Modifiers of chemical carcinogenesis: an approach to the biochemical mechanism and cancer prevention. New York: Raven Press, 1980, 111-126.
114. 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.
115. 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.
116. 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.
117. 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.
118. 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.
119. SHAVIT, Y.; TERMAN, G.W.; MARTIN, F.C.; LEWIS, J.W.; LIEBESKIND, J.C.; GALE, R.P. – Stress, opioid peptides, the immune system, and cancer. *J Immunol*, 135:834s-837s, 1985.
120. SCRIBNER, J.D.; SÜSS, R. – Tumor initiation and promotion. *Int Rev Exp Pathol*, 18:137-198, 1978.
121. FENSKE, M. – Production of steroids by *in vitro* superfusion from adrenals of the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*): effect of acute stress. *Comp Biochem Physiol [A]*, 74:971-976, 1983.
122. BOUTWELL, R.K. – On the role of tumour promotion in chemical carcinogenesis. *IARC Sci Publ*, 56:3-11, 1984.
123. MITIDIERI, F.M.A.; SANTOS, R.O.J.; POPOLO, A.C. et al – Superoxide dismutase and xanthine oxidase in gerbil skin. In: *Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular*, XXI:234, 1992.
124. SANTOS, R.O.J.; POPOLO, A.C.; GUZMÁN-SILVA, M.A.; AFFONSO, O.R.; MITIDIERI, F.M.A. – Efeito de iniciador e promotor tumoral na atividade xantina desidrogenase e xantina oxidase em pele de camundongo e de gerbil. In: *Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental*, VIII:330, 1993.
125. POPOLO, A.C.; SANTOS, R.O.J.; GUZMÁN-SILVA, M.A.; AFFONSO, O.R.; MITIDIERI, F.M.A. – Estudo comparativo de dois tipos de promotor tumoral na atividade xantina oxidase de pele de gerbil. In: *Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental*, VIII:330, 1993.