

## ANÁLISE MORFOLÓGICA COMPARATIVA DA CARCINOGENESE QUÍMICA CUTÂNEA ENTRE CAMUNDONGO (*Mus musculus*) E GERBILHO (*Meriones unguiculatus*)

MARIA ANGÉLICA GUZMÁN SILVA<sup>1</sup>, JORGE S. P. GUIMARÃES<sup>2</sup>

Hospital Universitário Antônio Pedro – Niterói, RJ

### RESUMO

*Foi estudada a resposta da pele de gerbilho à indução química de tumores, comparando-se as alterações morfológicas iniciais com aquelas que ocorrem na pele do camundongo. Dois modelos de carcinogênese foram aplicados: o cumulativo, utilizando metilcolantreno e o bifásico, com metilcolantreno como iniciador e óleo de cróton como promotor. As alterações macroscópicas, tais como espessamento da pele e hiperemia, induzidas com os dois tratamentos mencionados, foram menos evidentes no gerbilho. A reação inflamatória e a hiperplasia, observadas microscopicamente, também foram de menor intensidade na pele de gerbilho, notando-se, durante os dois tratamentos, o paradoxo do estímulo permanente da proliferação celular, evidenciado pela elevação do índice mitótico, sem hiperplasia progressiva da epiderme. A nível ultra-estrutural, com o modelo cumulativo, na epiderme interfolicular do gerbilho, ocorreu dilatação do espaço intercelular menos evidente do que a registrada na do camundongo, e a indução de "células escuras" não foi observada até a 10ª semana de tratamento. Com o modelo bifásico, na epiderme interfolicular do gerbilho, não houve indução de "células escuras" e a dilatação do espaço intercelular foi, inicialmente, mínima, deixando de existir posteriormente, apesar da continuidade do tratamento. A pele do gerbilho, quando comparada com a de camundongo, mostrou-se relativamente resistente à carcinogênese química. Se no camundongo, com o modelo bifásico, após um período de latência de sete semanas, houve a formação de vários papilomas, no gerbilho não houve desenvolvimento de tumor até à 30ª semana. Com o modelo cumulativo, tanto no camundongo como no gerbilho, houve desenvolvimento de um papiloma; o período de latência no camundongo foi de dez semanas, enquanto que no gerbilho foi de quinze semanas. Os resultados obtidos sugerem que a relativa resistência da pele de gerbilho à carcinogênese química parece residir em um fenômeno de adaptação ao processo de promoção tumoral, particularmente com óleo de cróton.*

**Unitermos:** carcinogênese química cutânea, modelo cumulativo, modelo bifásico, gerbilho.

### INTRODUÇÃO

O modelo que utiliza a pele de camundongo tem sido um dos métodos de carcinogênese química mais estudados, identificando-se várias etapas no processo. 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. O outro, chamado modelo bifásico, consiste de uma única aplicação de cancerígeno (etapa de iniciação), seguida de tratamentos repetidos com um promotor tumoral não cancerígeno (etapa de promoção). A iniciação, que requer uma única aplicação de cancerígeno, seja de ação direta

Trabalho extraído da tese de Mestrado, Curso de Pós-Graduação em Patologia Experimental. Trabalho realizado com auxílio de bolsa concedido pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

<sup>1</sup> Professora Assistente do Departamento de Patologia e Apoio Clínico da Universidade Federal Fluminense. <sup>2</sup> Professor Titular da Universidade Federal Fluminense; Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Patologia e Apoio Clínico, Universidade Federal Fluminense. Endereço para correspondência: <sup>1</sup> Universidade Federal Fluminense. Departamento de Patologia e Apoio Clínico. Hospital Universitário Antônio Pedro. Rua Marquês do Paraná, 303. Niterói, RJ – CEP: 24030.



ou indireta, em dose subcancerígena, é uma etapa essencialmente irreversível. A promoção se desenvolve pelo tratamento repetido, após a iniciação, com substâncias ou procedimentos não cancerígenos, sendo que as alterações induzidas inicialmente são reversíveis e, mais tarde, tornam-se irreversíveis. Amplas revisões podem ser consultadas sobre a indução química de tumores cutâneos<sup>1-11</sup>.

A validade dos modelos referidos tem sido verificada em diversas espécies animais, como rato, coelho, hamster, além do camundongo<sup>10, 12-18</sup>. Outrossim, observam-se variações na susceptibilidade à carcinogênese química cutânea, tanto entre as diversas espécies animais, como entre linhagens de camundongos "inbred", e tudo indica que a susceptibilidade parece residir na qualidade genética do indivíduo<sup>2, 14</sup>.

Quanto à histogênese dos tumores quimicamente induzidos, os trabalhos anteriores a 1951<sup>19</sup> relacionavam a hiperplasia ao processo de carcinogênese, mas Shubick<sup>16</sup> demonstrou que nem todas as substâncias que são agentes hiperplásicos na pele de camundongo têm atividade promotora de tumores. Números autores também referiram que tanto os promotores como os agentes puramente hiperplásicos provocam reação inflamatória na pele<sup>2, 6-8, 20-26</sup>.

Em 1954, Berenblum<sup>27</sup> propôs que a promoção tumoral envolve um estímulo da proliferação celular e uma inibição da maturação celular, o que foi posteriormente comprovado por vários autores.

Ultra-estruturalmente, as principais alterações descritas, na epiderme de camundongo, durante a carcinogênese cumulativa e bifásica, se referem a anormalidades da superfície de contato entre as células, devidas a distúrbios nas junções celulares, e ao desenvolvimento de novos padrões no citoplasma das células nucleadas<sup>28</sup>. Raick e Ritchie<sup>29</sup>, em 1971, denominaram "células escuras" aquelas que apresentavam características ultra-estruturais diferentes das de outras células epidérmicas durante a carcinogênese bifásica ou mesmo após uma única dose de promotor. As "células escuras" parecem ser células-tronco primitivas, isto é, indiferenciadas, que normalmente são numerosas na pele embrionária e do neonato, porém são raras na pele adulta<sup>8, 9, 30</sup>.

Raick<sup>31, 32</sup> sugeriu que os promotores atuam alterando a via de diferenciação normal, permitindo, dessa maneira, a expressão do fenótipo neoplásico; de fato, com a continuidade do

tratamento promotor, na pele previamente iniciada, grupos de "células escuras" crescem progressivamente, formando pequenos papilomas.

O gerbilho (*Meriones unguiculatus*) é um pequeno roedor originário da China e da Mongólia, adaptado como animal de laboratório nas últimas décadas<sup>33</sup>. Há poucas referências na literatura sobre a utilização do gerbilho na pesquisa da carcinogênese cutânea; as existentes<sup>10, 34-37</sup> relatam a indução de papilomas, carcinomas e alterações pigmentares na pele, com ambos os modelos experimentais.

O objetivo do presente trabalho foi estudar a resposta do gerbilho à indução química de tumores cutâneos, considerando-se especialmente os aspectos morfológicos, que por sua vez foram comparados com a resposta do camundongo, modelo clássico de carcinogênese cutânea. O exame compreendeu as alterações macroscópicas e histopatológicas iniciais envolvidas no processo, assim como as alterações ultra-estruturais relevantes.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Foi utilizado um total de 66 animais, "outbred", cuja distribuição por espécie e sexo encontra-se especificada na Tabela 1. Os camundongos, assim como os gerbilhos, provieram da criação do Biotério do Departamento de Patologia e Apoio Clínico da Universidade Federal Fluminense. Os animais foram distribuídos em seis grupos experimentais, três de camundongos e três de gerbilhos. Cada grupo era constituído de onze animais.

TABELA 1 — Espécie e sexo dos animais em estudo

ESPÉCIE ANIMAL	MACHO	FÊMEA	TOTAL
Camundongo	20	13	33
Gerbilho	21	12	33
<b>TOTAL</b>	<b>41</b>	<b>25</b>	<b>66</b>

Considerando-se que o desenvolvimento pós-natal do gerbilho é mais demorado que o do camundongo<sup>38</sup>, o tratamento dos animais foi iniciado nos camundongos com oito semanas e nos gerbilhos com dez semanas, procurando-se assim manter fases de desenvolvimento comparáveis nos dois tipos de roedores estudados.

Após a depilação do dorso dos animais, aplicou-se na área interescapular o tratamento descrito na Tabela 2, durante dez semanas. As substâncias químicas utilizadas foram o cancerígeno completo metilcolantreno (MC) e como promo-



**TABELA 2 — Tratamento e sexo dos camundongos (A) e gerbilhos (B) em cada grupo em estudo**

Grupo	Sexo		Tratamento	
	Macho	Fêmea	Substância	Freqüência
I A	7	4	acetona	2 x semana
I B	6	5	acetona	2 x semana
II A	7	4	metilcolantreno	2 x semana
II B	9	2	metilcolantreno	2 x semana
III A	6	5	metilcolantreno	1 dose única
			óleo de cróton	2 x semana
III B	6	5	metilcolantreno	1 dose única
			óleo de cróton	2 x semana

I controle

II modelo cumulativo

III modelo bifásico

tor, o óleo de cróton (OC), ambos da Sigma Chemical Company. Cada reagente foi dissolvido em acetona na seguinte concentração: MC a 0,1% e OC a 0,5%. As doses aplicadas durante o experimento, nos diversos animais, foram sempre de 200 $\mu$ l de solução por cada vez, mediante pipeta automática. A quantidade total de substâncias, aplicadas em cada animal, encontra-se especificada na Tabela 3.

Durante o tratamento foram registradas as alterações ocorridas na pele, ou seja, espessamento e hiperemia, presença de neoplasia e suas características macroscópicas. A cada semana foi sacrificado um animal de cada grupo. Após a 10ª semana o tratamento foi suspenso e o último animal de cada grupo foi sacrificado na 14ª semana.

Como não ocorreu a formação de tumores nos gerbilhos durante as dez semanas de experimentação, dois desses animais, machos, com dez semanas de idade, foram tratados por período mais prolongado de tempo. O gerbilho, tratado com o modelo cumulativo, foi sacrificado

na 21ª semana, tendo recebido no total 8.400 $\mu$ g de MC. O gerbilho, tratado com o modelo bifásico, foi sacrificado na 30ª semana, tendo recebido 200 $\mu$ g de MC e no total 55.460 $\mu$ g de OC.

Para o estudo pela microscopia óptica, a pele do dorso dos animais foi fixada em formol a 10% tamponado e processada da forma rotineira. Realizaram-se as seguintes técnicas de coloração: hematoxilina-eosina, tricrômico de Masson—Goldner<sup>39</sup>, azul de toluidina a 0,5% para identificar mastócitos e Masson-Fontana para melanina<sup>40</sup>, além da técnica de branqueamento da melanina<sup>41</sup>. Procurou-se estabelecer parâmetros que permitissem comparar a evolução da resposta de ambos os tipos de roedores aos diversos tratamentos aplicados. Assim, as observações referentes à vasodilatação e ao exsudato celular presentes na derme superficial foram registradas, considerando-se o grau de intensidade. Além disso, com a finalidade de avaliar o estímulo de proliferação celular e o grau de hiperplasia atingido pela epiderme interfolicular (EIF), em cada caso foi determinado o índice mitótico (IM), expresso como taxa, e o número de camadas celulares nucleadas (CCN), expresso como moda.

Para o estudo pela microscopia eletrônica, uma faixa estreita de pele foi retirada da linha média do dorso. O material foi fixado em glutaraldeído a 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,4 a 4°C, pós-fixado em tetróxido de ósmio a 1% em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,4 a 4°C, e processado com a técnica de rotina da Microscopia Eletrônica do Departamento de Patologia e Apoio Clínico.

Foram realizados cortes semifinos, 1 $\mu$ m, no ultramicrotomo LKB 8800 II e corados pela técnica modificada de Humphrey—Pittman<sup>42</sup>, com a finalidade de verificar a orientação dos fragmentos e selecioná-los para o corte ultrafino, assim como para conferir, ainda, as altera-

**TABELA 3 — Total de substâncias químicas aplicadas em cada animal, sacrificado nas diversas semanas do período em estudo**

GRUPOS	SUBSTÂNCIAS	PERÍODO EM ESTUDO (SEMANAS)										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	14
IA e IB	A ( $\mu$ l)	400	800	1.200	1.600	2.000	2.400	2.800	3.200	3.600	4.000	4.200
IIA e IIB	MC ( $\mu$ g)	400	800	1.200	1.600	2.000	2.400	2.800	3.200	3.600	4.000	4.200
IIIA e IIIB	MC ( $\mu$ g)	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200
	OC ( $\mu$ g)	940	2.820	4.700	6.580	8.460	10.430	12.220	14.100	15.980	17.860	18.800

A acetona

MC metilcolantreno

OC óleo de cróton



ções observadas na microscopia óptica comum. Os cortes ultrafinos foram obtidos no ultrami-crótomo referido e "corados" pela técnica de acetato de uranila e Reynolds<sup>4,3</sup>. A observação do material foi feita no microscópio eletrônico de transmissão ZEISS EM 109.

## RESULTADOS

### Macroscopia

As alterações macroscópicas, hiperemia e espessamento da pele, induzidas com os diversos tratamentos, sempre foram menos intensas na pele de gerbilho.

Quanto à indução de tumores, verificou-se a formação de papiloma na pele de camundongo com ambos os modelos de carcinogênese. Com o modelo cumulativo, um camundongo desenvolveu um papiloma cônico, observando-se um período de latência de dez semanas. Com o modelo bifásico, dois camundongos desenvolveram tumores, atingindo o máximo de oito papilomas por animal; uns eram de forma cônica, outros em couve-flor; o período de latência foi de sete semanas. No gerbilho, só foi observada a indução de um papiloma em couve-flor, com o modelo cumulativo, após um período de latência de quinze semanas; com o modelo bifásico não houve desenvolvimento de tumor até a 30ª semana de tratamento (Tabela 4).

**TABELA 4 — Período de latência e incidência de papilomas quimicamente induzidos em camundongos (A) e gerbilhos (B)**

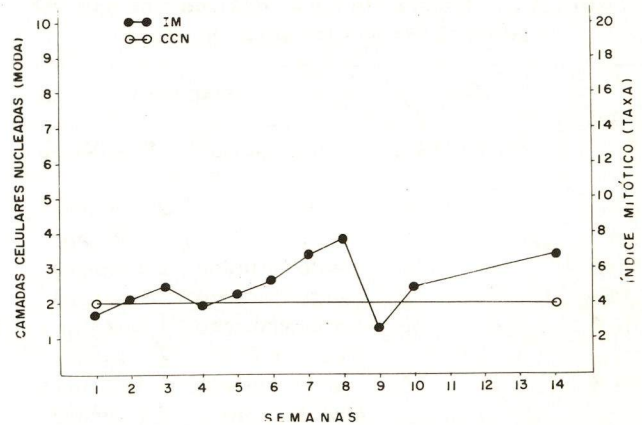
GRUPO	Período de latência (semanas)	Nº máximo de animais com papiloma	Nº máximo de papilomas por animal
IIA	10	1	1
IIB	15	1	1
IIIA	7	2*	8**
IIIB***	—	—	—

\* observado na 10ª semana  
 \*\* observado na 11ª semana  
 \*\*\* até a 30ª semana de observação

II modelo cumulativo  
 III modelo bifásico

### Microscopia óptica

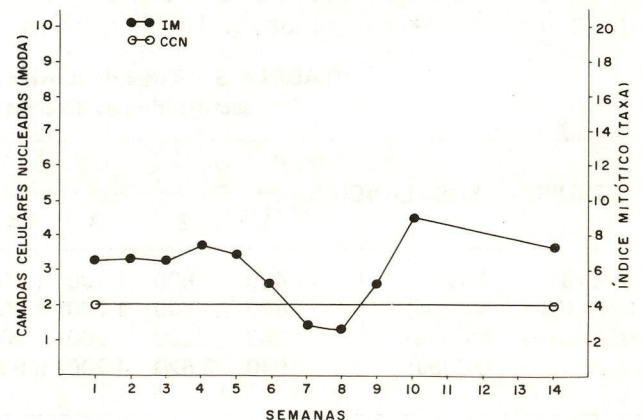
Na epiderme normal de camundongo, em todos os casos, registraram-se mais freqüentemente duas CCN e o IM variou entre 2,5 e 7,7 ( $\bar{x}=5,5$ ) (Figura 1). A epiderme normal de gerbilho também exibiu mais freqüentemente duas CCN, e os valores de IM, determinados em cada



**FIGURA 1 — Índice mitótico e camadas celulares nucleadas da EIF do grupo I A.**

caso, foram em geral mais elevados que os do camundongo, variando entre 2,7 e 9,1 ( $\bar{x}=6,6$ ) (Figura 2).

A epiderme de camundongo, tratada com o modelo cumulativo, mostrou um aumento gradativo do número de CCN, atingindo o máximo de seis na 8ª semana de tratamento, e verificou-se elevação do IM que variou entre 3,5 e 11,5 ( $\bar{x}=9,3$ ). Após a suspensão do tratamento houve diminuição do IM, registrando 1,9 na 14ª semana, e o número de CCN foi semelhante aos valores do controle (Figura 3). Já a epiderme de gerbilho, submetida ao mesmo tratamento, mostrou também elevação do IM, variando entre 9,3 e 18,5 ( $\bar{x}=13,3$ ), sem contudo apresentar aumento progressivo do número de CCN; houve até uma regressão das três camadas observadas na 1ª semana, para duas nas semanas subsequentes. Após a suspensão do tratamento, o IM diminuiu, mas na 14ª semana, o valor registrado, 9,9, ainda era semelhante aos obtidos durante o tratamento (Figura 4).



**FIGURA 2 — Índice mitótico e camadas celulares nucleadas da EIF do grupo I B.**



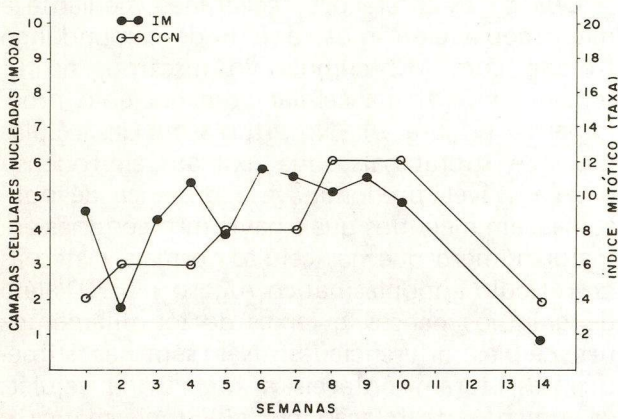


FIGURA 3 – Índice mitótico e camadas celulares nucleadas da EIF do grupo II A.

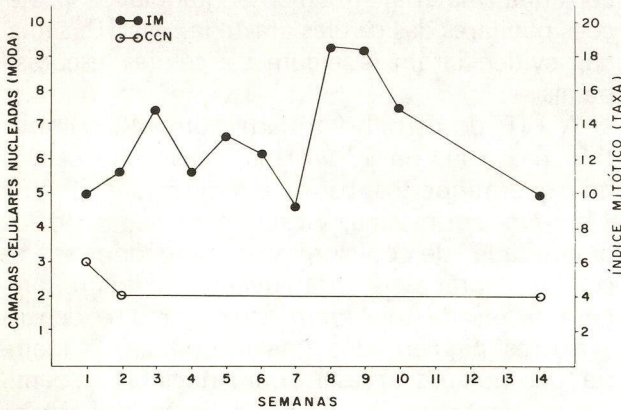


FIGURA 4 – Índice mitótico e camadas celulares nucleadas da EIF do grupo II B.

A epiderme de camundongo, tratada com o modelo bifásico, mostrou um aumento gradativo do número de CCN, atingindo o máximo de seis na 9ª semana de tratamento, e verificou-se elevação do IM que variava entre 7,8 e 20,5 ( $\bar{x}=11,7$ ); os valores mais elevados, registrados na 9ª e 10ª semana, se devem à presença de micropapilomas; onde as mitoses eram frequentes. Após a suspensão do tratamento, houve diminuição do IM e na 14ª semana registraram-se, ainda, três CCN (Figura 5). A epiderme de gerbilho, submetida ao mesmo tratamento, mostrou elevação do IM, variando entre 7,3 e 14,3 ( $\bar{x}=11,1$ ), mas o aumento do número de CCN que foi para três nas primeiras semanas e quatro nas últimas, não mostrou concordância com essa elevação do IM. Após a suspensão do tratamento, verificou-se diminuição do IM e do número de CCN que na 14ª semana eram semelhantes aos valores registrados no controle (Figura 6).

Em relação à indução de reação inflamatória com os diversos tratamentos, observou-se que o grau de exsudato celular presente na derme superficial dos gerbilhos de cada grupo experimental, nas diversas semanas de observação, foi a maioria das vezes menor que o registrado na derme dos camundongos. O grau de vasodilatação presente na derme superficial em todos os casos foi menos intenso na pele de gerbilho.

Alterações pigmentares na pele dos gerbilhos ocorreram com ambos os modelos de carcinogênese; caracterizaram-se por aumento inicial da frequência de células epidérmicas pigmentadas, ou seja, dos melanócitos e queratinócitos associados ou "unidades epidérmicas de melanina"<sup>14 4</sup> e, mais tarde, por aumento dos melanóforos na derme. O animal tratado com MC cumulativo mostrou, na 21ª semana, vários focos de hiperplasia melanocítica atípica na junção dermo-epidérmica, além de intensa hiperpigmentação dérmica.

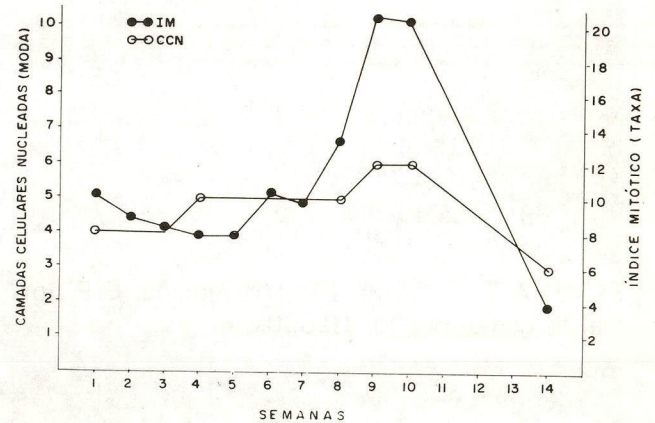


FIGURA 5 – Índice mitótico e camadas celulares nucleadas da EIF do grupo III A.

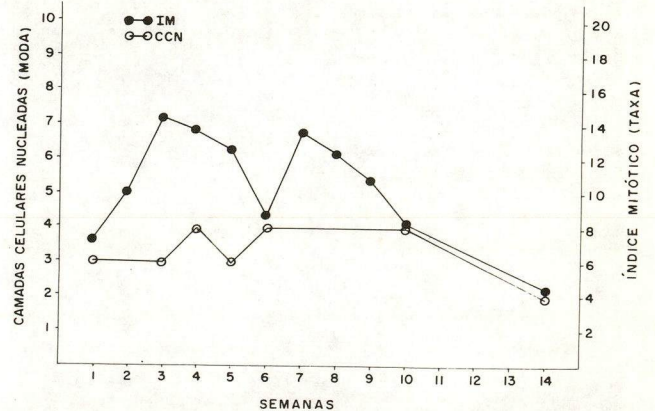


FIGURA 6 – Índice mitótico e camadas celulares nucleadas da EIF do grupo III B.



### Microscopia eletrônica

As características ultra-estruturais da EIF do dorso dos gerbilhos foram semelhantes às do camundongo, exceto pela presença de células claras dentríticas (Figuras 7 e 8).



FIGURA 7 — Grupo IA. 10<sup>a</sup> semana. EIF normal de camundongo. 10.500x.

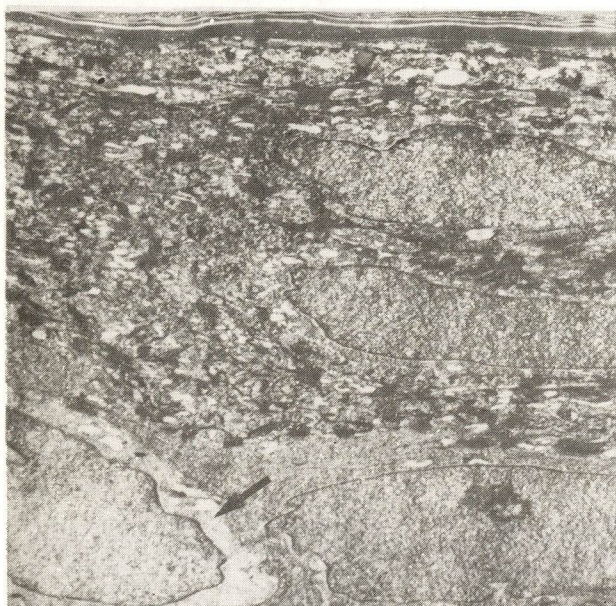


FIGURA 8 — Grupo IB. 6<sup>a</sup> semana. EIF normal de gerbilho. Célula clara (seta). 10.500x.

Quanto às alterações registradas mediante a microscopia eletrônica, a EIF de camundongo tratada com MC cumulativo mostrou, na 1<sup>a</sup> semana, hipertrofia celular com nucléolo proeminente (Figura 9). No citoplasma das células basais e suprabasais, que exibiam eletrodensidade variável, predominava a presença de polissomas, em meio dos quais havia mitocôndrias em maior número que nas células normais, cisternas de retículo endoplasmático rugoso (RER), além de grânulos densos e feixes de tonofilamentos nas células diferenciadas. Nas semanas subsequentes, foram notáveis a hipertrofia celular, o aumento da relação núcleo-citoplasmática e a maior eletrodensidade das células basais e suprabasais (Figura 10). Observou-se também dilatação acentuada do espaço intercelular, que continha material finamente granular e projeções papilares das células afastadas. Na 10<sup>a</sup> semana, evidenciaram-se algumas "células escuras" basais.

A EIF de gerbilho tratada com MC cumulativo mostrou, na 1<sup>a</sup> semana, hipertrofia celular dos queratinócitos basais e suprabasais (Figura 11). No citoplasma, observou-se aumento da quantidade de polissomas e mitocôndrias; as células suprabasais diferenciadas exibiam também feixes de tonofilamentos, grânulos densos e outros pigmentados (melanosomas). A maioria dos núcleos apresentavam nucléolo proeminente. Notou-se dilatação discreta do espaço intercelular entre as células basais e suprabasais, onde havia projeções papilares das células

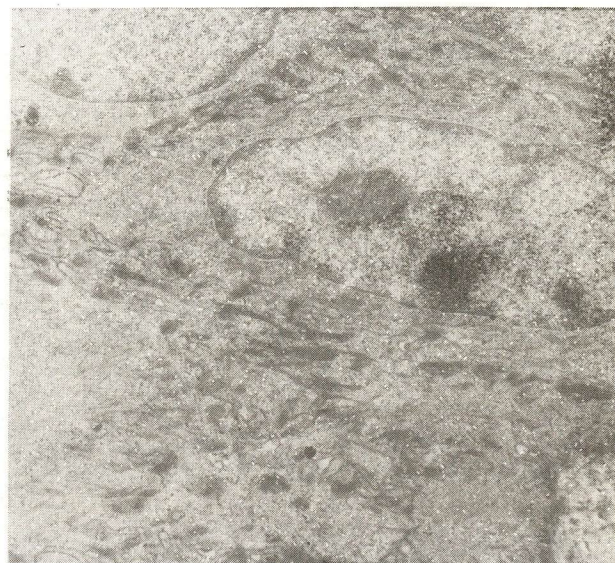


FIGURA 9 — Grupo IIA. 1<sup>a</sup> semana. EIF hiperplásica de camundongo. Queratinócito basal hipertrofiado, eletrodensidade moderada, nucléolo central. 10.500x.





FIGURA 10 — Grupo IIA. 3ª semana. EIF hiperplásica de camundongo. Queratinócitos hipertrofiados, eletrodensidade moderada, relação núcleo-citoplasmática aumentada, heterocromatina evidente. Espaço intercelular dilatado contendo material finamente granular. 10.500x.



FIGURA 11 — Grupo IIB. 1ª semana. EIF de gerbilho. Queratinócito basal hipertrofiado, eletrodensidade moderada, heterocromatina evidente. Espaço intercelular levemente dilatado, contendo material finamente granular. 10.500x.

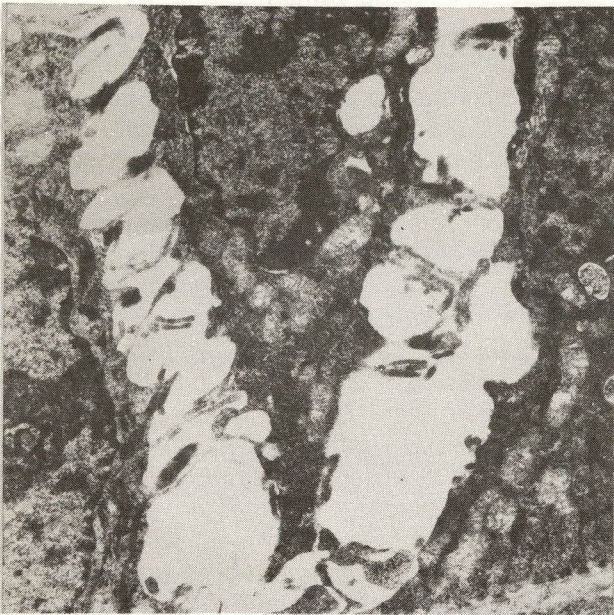
afastadas e material finamente granular. Nas semanas seguintes, a EIF manteve a hipertrofia celular; a dilatação do espaço intercelular, embora discreta, ocorria entre as células basais (Figura 12). As "células escuras" caracterizadas pela presença de núcleos irregulares, heterocromatina bem evidente e macronúcleolos, além da eletrodensidade acentuada só foram observadas neste grupo no papiloma (Figura 13). O citoplasma dessas células era rico em polissomas e mitocôndrias.

Na EIF de camundongo, tratada com o modelo bifásico, observou-se, na 1ª semana, hipertrofia celular. O citoplasma das células basais era rico em polissomas e com numerosas mitocôndrias e cisternas de RER. Os núcleos exibiam nucléolo proeminente. As células suprabasais, também hipertrofiadas e eletrodensas, exibiam as características ultra-estruturais descritas acima, além de feixes de tonofilamentos e grânulos densos. Tanto na camada basal quanto nas suprabasais, observou-se dilatação do espaço intercelular; as células afastadas exibiam projeções papilares e se mantinham unidas por um ou outro desmosoma.



FIGURA 12 — Grupo IIB. 6ª semana. EIF de gerbilho. Queratinócitos hipertrofiados, eletrodensidade moderada. Espaço intercelular dilatado. 10.500x.

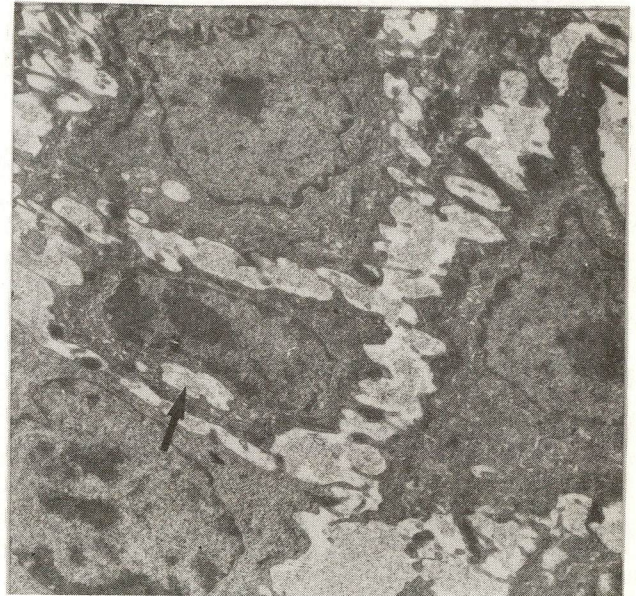




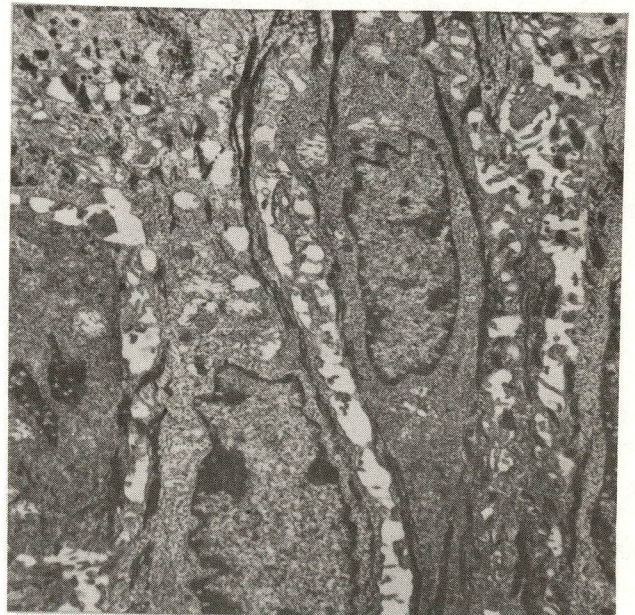
**FIGURA 13** — Grupo IIB. 21<sup>a</sup> semana. Papiloma de gerbilho. Queratinócitos basais "escuros". Espaço intercelular largamente dilatado e projeções papilares. 10.500x.

Dentro do espaço intercelular dilatado havia material finamente granular, de eletrodensidade variável. Já na 2<sup>a</sup> semana, as células basais e suprabasais exibiram as características típicas de "células escuras", intensamente eletrodensas, com núcleos irregulares, heterocromatina bem evidente e nucléolo proeminente (Figura 14). O espaço intercelular entre elas apresentou-se largamente dilatado e continha material finamente granular, que também estava presente nas cisternas dilatadas de algumas "células escuras". Nas semanas subseqüentes, as células basais e suprabasais mantiveram as características ultra-estruturais descritas acima (Figura 15).

A EIF de gerbilho tratada com o modelo bifásico, mostrou na 1<sup>a</sup> semana hipertrofia dos queratinócitos. O citoplasma das células basais, rico em polisomas e mitocôndrias, exibia também cisternas de RER. Os núcleos apresentavam nucléolo proeminente. Notou-se discreta dilatação do espaço intercelular, que continha projeções papilares das células afastadas. As células suprabasais diferenciadas apresentaram as características descritas referentes às células basais, exibindo feixes de tonofilamentos. Na 2<sup>a</sup> semana, os queratinócitos hipertrofiados exibiam eletrodensidade variável e a maioria mostrava nucléolo proeminente (Figura 16). Ocasionalmente observou-se dilatação do espaço intercelular entre as células suprabasais. Nas sema-



**FIGURA 14** — Grupo IIIA. 2<sup>a</sup> semana. EIF hiperplásica de camundongo. Queratinócitos "escuros". Cisterna de retículo endoplasmático dilatada (seta), contendo material finamente granular, semelhante ao do espaço intercelular largamente dilatado. 6.600x.



**FIGURA 15** — Grupo IIIA. 6<sup>a</sup> semana. EIF hiperplásica de camundongo. Queratinócitos basais hipertrofiados, eletrodensidade moderada. Espaço intercelular dilatado e projeções papilares. 4.500x.



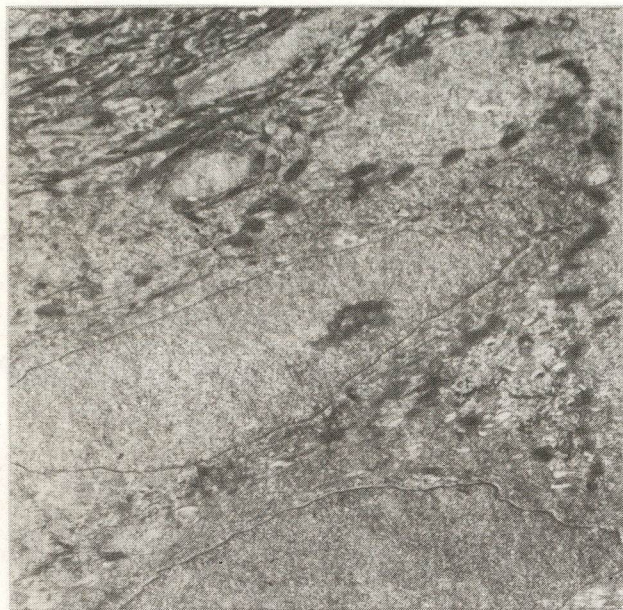


FIGURA 16 — Grupo IIIB. 2ª semana. EIF de gerbilho. Queratinócitos hipertrofiados, eletrodensidade moderada. 10.500x.

(Figura 17). Notaram-se, todavia, células claras, dendríticas, cujos prolongamentos podiam ser visualizados entre os queratinócitos.

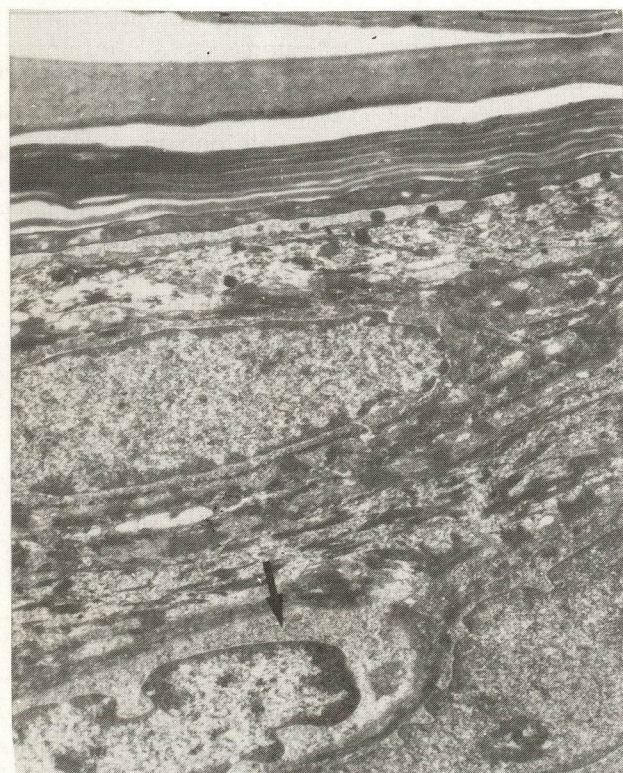


FIGURA 17 — Grupo IIIB. 10ª semana. EIF de gerbilho. Queratinócitos hipertrofiados, eletrodensidade moderada. Célula clara (seta). 10.500x.

## DISCUSSÃO

O modelo de pele de camundongo tem sido um dos mais usados, revelando-se de grande utilidade na pesquisa da carcinogênese química.

No presente trabalho, os resultados referentes à resposta da pele dessa espécie animal aos dois modelos de carcinogênese aplicados corresponderam, em linhas gerais, aos dados existentes na literatura. Verificou-se, porém, que a pele de gerbilho responde aos mesmos tratamentos com menor intensidade, e sob alguns aspectos de forma paradoxal, mostrando relativa resistência à indução química de tumores de linhagem epidérmica.

Da mesma forma que diversos autores<sup>3 4 -3 6</sup>, observou-se a indução de papiloma no gerbilho com o modelo cumulativo, verificando-se, todavia, um período de latência maior que o do camundongo.

Ao contrário de outros experimentos<sup>1 0, 3 5 -3 7</sup>, não foi verificada indução tumoral com o modelo bifásico no gerbilho, mas não se pode deixar de considerar que o período de observação foi de trinta semanas, inferior ao citado por Van Duuren<sup>3 7</sup>. A dose e a frequência de aplicação de OC também foram menores que as referidas na literatura<sup>3 6, 3 7</sup>, e sabe-se que o período de latência e a efetividade da promoção são determinados por esses dois fatores relacionados ao promotor<sup>2, 4 5</sup>.

Verificou-se que a estrutura da EIF do dorso do gerbilho é basicamente igual à do camundongo<sup>2 5, 4 6</sup>. Entre os parâmetros de comparação estabelecidos, só o índice mitótico da EIF do gerbilho foi em geral mais elevado, refletindo talvez uma renovação celular mais rápida, inerente a essa espécie animal.

A ultra-estrutura da EIF do dorso do gerbilho mostrou-se semelhante à do camundongo<sup>3 1, 4 6, 4 7</sup>, exceto pela presença de células claras dendríticas, que não puderam ser categoricamente identificadas, já que não apresentavam todas as características ultra-estruturais nem de melanócitos, nem de células de Langerhans<sup>4 8</sup>.

De acordo com diversos autores<sup>2 5, 3 1, 4 9, 5 0</sup> o espessamento da pele, e portanto da epiderme do camundongo, induzido pela aplicação de cancerígeno e promotor, associados ou não, ocorre inicialmente às custas de hipertrofia celular e retardamento da renovação celular e, mais tarde, de proliferação. Na pele de gerbilho, durante os dois tratamentos, observou-se o paradoxo de estímulo permanente da proliferação celular, evidenciado pela elevação do índice mitótico, sem hiperplasia progressiva da epider-



me. Este achado diferente sugere uma aceleração da renovação celular.

A correlação que existe entre a indução de hiperplasia permanente e a susceptibilidade à promoção<sup>17</sup> também foi observada neste trabalho, porquanto no camundongo ocorreu potenciação da resposta ao tratamento contínuo com OC no modelo bifásico, resultando em hiperplasia progressiva, e no gerbilho verificou-se uma adaptação, sendo a hiperplasia muito discreta. Ambas as observações se correlacionam muito bem com os resultados obtidos nas duas espécies, com o modelo bifásico de indução de tumores.

Além da ausência de hiperplasia progressiva, outro achado que parece importante na resposta da pele do gerbilho ao modelo bifásico se refere à dilatação do espaço intercelular. Na EIF de camundongo, durante a carcinogênese cumulativa e bifásica, foi descrita dilatação do espaço intercelular a nível ultra-estrutural<sup>28, 32, 46</sup>. No gerbilho, essa dilatação mostrou-se menos evidente no modelo cumulativo, e no modelo bifásico ocorria apenas inicialmente e de forma mínima, desaparecendo depois, apesar da continuidade do tratamento. Tal fenômeno também sugere uma adaptação da epiderme do gerbilho à promoção com OC.

Ainda a nível ultra-estrutural, foi descrita a indução de "células escuras" na EIF de camundongo durante a carcinogênese química<sup>29</sup>, o que também foi observado em nosso material de camundongo. Por outro lado, no gerbilho só foi verificada a presença de "células escuras" características no papiloma induzido com o modelo cumulativo. A indução de "células escuras", refletindo desdiferenciação celular, se correlaciona com a capacidade promotora do agente utilizado<sup>30</sup>, e portanto parece que o OC é relativamente incapaz de promover tumores na pele de gerbilho.

Notou-se ainda que a regressão das alterações após a suspensão dos diversos tratamentos foi sempre mais rápida na pele de gerbilho. No modelo bifásico, três semanas depois da última aplicação de OC, a pele de camundongo ainda apresentava discreta hiperplasia e reação inflamatória moderada, enquanto a pele de gerbilho era semelhante à normal. No modelo cumulativo, três semanas após a suspensão do MC, a pele de ambos os roedores era morfológica-mente semelhante à normal; contudo, no gerbilho persistia a elevação do índice mitótico — também registrada durante o tratamento — sem haver hiperplasia. Como foi dito, esse fenômeno sugere uma renovação celular acelerada que,

nesse caso, parece persistir após a suspensão do tratamento.

Observou-se também durante os diversos tratamentos na pele de gerbilho uma reação inflamatória menos intensa que a registrada na pele de camundongo, o que sugere a interferência de algum fator antiinflamatório endógeno.

Handler e colaboradores<sup>34</sup> referiram que no gerbilho as glândulas adrenais são grandes, em comparação às de outros roedores de tamanho corporal maior, fato que também foi notado ao serem realizadas as primeiras necrópsias. A proporção peso glandular/peso corporal revelou-se maior no gerbilho: o peso das glândulas adrenais do gerbilho (~0,06g) é o triplo das do camundongo (~0,02g) e o peso corporal do gerbilho (~60g) é o dobro do camundongo (~30g).

Essa observação é similar à de Slaga e colaboradores<sup>7</sup>, em relação a camundongos de linhagem C57BL/6, que apresentam glândulas adrenais maiores que as dos camundongos SENCAR. Os camundongos C57BL/6, do mesmo modo que o gerbilho, respondem bem à carcinogênese cumulativa e não à bifásica. Os autores também citaram que a adrenalectomia aumenta a promoção por OC, o que sugere a modulação da promoção por glucocorticóides endógenos. Os esteróides antiinflamatórios — cortisol, dexametasona, acetonafluocionolona — inibem por completo a promoção com ésteres de forbol em pele de camundongo, ao frustrar a indução de proliferação celular, enquanto que a dexametasona só reduz parcialmente o efeito do MC como cancerígeno completo<sup>2, 7, 8, 10, 26</sup>.

Entretanto, deve-se levar em conta que no gerbilho o "stress" agudo, provocado pela exposição a um novo meio ambiente ou a vapor de éter, aumenta de forma significativa a concentração de glucocorticóides, quase quadruplicando os níveis plasmáticos normais<sup>51</sup>, uma vez que em nosso trabalho os animais foram sempre tratados sob anestesia com éter etílico.

Os achados referentes ao tamanho das glândulas adrenais, junto à baixa intensidade da reação inflamatória durante os diversos tratamentos na pele de gerbilho, associados às observações extraídas da literatura, sugerem uma relação entre esses aspectos e a relativa resistência do gerbilho à carcinogênese química cutânea.

Contudo, não podemos estabelecer categoricamente essa relação baseados em resultados exclusivamente morfológicos. Outros estudos deverão ser realizados para esclarecer a reação



da pele do gerbilho à indução química de tumores, particularmente em relação à promoção tumoral, procurando-se verificar a existência de uma dose e uma frequência de aplicação do promotor mais eficientes nessa espécie animal.

Os resultados obtidos neste estudo sugerem que a relativa resistência da epiderme do gerbilho à carcinogênese química poderia estar relacionada aos seguintes fenômenos isolados ou à interação deles:

- adaptação à promoção com OC em si;
- interferência de hormônio esteróide anti-inflamatório endógeno;
- manutenção do equilíbrio entre proliferação celular e maturação, através de aceleração da renovação celular.

Entre os achados deste trabalho devem ainda ser mencionadas as alterações pigmentares induzidas pelo tratamento com os modelos cumulativos e bifásico na pele de gerbilho. Assim como outros pesquisadores<sup>3,5,36,52</sup>, observou-se um maior número de células pigmentadas, tanto de "unidades epidérmicas de melanina" quanto de melanóforos na derme perifolicular, o que sugere inicialmente um estímulo da síntese de melanina; já com o tratamento prolongado com MC cumulativo, observaram-se, além da hiperpigmentação dérmica progressiva, vários focos de hiperplasia melanocítica atípica na junção dermo-epidérmica.

## SUMMARY

*The reaction of the gerbil's skin to the chemical induction of tumors was studied, comparing the early morphologic alterations occurring in the gerbil to the ones we have also studied in the mouse. Two models of carcinogenesis were used: the cumulative with methylcholanthrene and the biphasic using methylcholanthrene as initiator, followed by croton oil as promoter. The gross findings, such as thickening of the skin and hyperemia induced by the various experiments above, were less evident in the gerbils. The microscopic findings of hyperplasia and inflammatory reaction, were also less intense in the gerbil's skin. The cellular proliferation was simulated, as shown by increased mitotic rate, without any recognizable progressive hyperplasia of the epidermis. With the cumulative model electron microscopy displayed a less evident dilatation of intercellular space in the interfollicular epidermis of gerbils than that observed in mice, and the induction of "dark cells" was not registered in gerbils, up to the 10th week of treatment. Gerbils did not show any "dark cell" with the biphasic model, and the initial minimal dilatation of the intercellular space disappeared despite the continuing treatment. It has been demonstrated that the skin of the gerbil is more resistant to chemical carcinogenesis than*

*that of the mouse. Gerbils did not develop any papilloma up to the 30th week of treatment with the biphasic model, while mice developed such tumors after a seven-week latency period. With the cumulative model, both gerbil and mouse each developed one papilloma, but the latter did so after ten weeks of treatment, while the former took fifteen weeks. The results suggest that the relative resistance of the gerbil's skin to chemical carcinogenesis is based upon and adaptation to the promotion process, specially with the croton oil.*

**Uniterms:** chemical skin carcinogenesis, cumulative model, biphasic model, gerbil.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Becker FF. Recent concepts of initiation and promotion in carcinogenesis. *Am. J. Pathol.* 1981;105(1): 3-9.
2. Boutwell RK. Some biological aspects of skin carcinogenesis. *Prog. exp. Tumor Res.* 1964; 4:207-250.
3. Boutwell RK, Verma AK, Ashendel CL, Astrup E. Mouse skin: a useful model system for studying the mechanism of chemical carcinogenesis. *Carcinog. Compr. Surv.* 1982; 7:1-12.
4. Guzmán Silva MA, Guimarães JSP. Carcinogênese química cutânea. *Rev. Bras. Cancerol.* 1985;31:285-291.
5. Ryses HJP. Chemical carcinogenesis. *New Engl. J. Med.* 1971; 285 (13): 721-734.
6. Scribner JD, Süss R. Tumor initiation and promotion. *Int. Rev. exp. Pathol.* 1978; 18: 137-198.
7. Slaga TJ, Fischer SM, Weeks CE, Klein-Szanto AJP, Reiners J. Studies on the mechanism involved in multistage carcinogenesis in mouse skin. *J. cell. Biochem.* 1982;18(1):99-119.
8. Slaga TJ, Fischer SM, Weeks CE, Nelson K, Mammack M, Klein-Szanto AJP. Specificity and mechanism(s) of promoter inhibitors in multistage promotion. *Carcinog. Compr. Surv.* 1982;7:19-34.
9. Slaga TJ, Klein-Szanto AJP. Initiation-promotion versus complete skin carcinogenesis in mice: importance of dark basal Keratinocytes (stem cells). *Cancer Invest.* 1983;1(5): 425-436.
10. Weinstein IB, Troll W. National Cancer Institute workshop on tumor promotion and cofactors in carcinogenesis. *Cancer Res.* 1977; 37:3461-3463.
11. Yuspa SH, Hennings H, Saffiotti U. Cutaneous chemical carcinogenesis: past, present and future. *J. Invest. Dermatol.* 1976;67:199-208.
12. Ashman LK, Murray AW, Cook MG, Kotlarski I. Two-stage skin carcinogenesis in sensitive and resistant mouse strains. *Carcinogenesis* 1982; 3(1):99-102.
13. Di Giovanni J, Slaga TJ, Juchau MR. Comparative epidermal metabolism of mice with differing sensitivity to skin tumorigenesis by DMBA. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* 1979;20:134.
14. Hennings H, Devor D, Wenk ML, et al. Comparison of two-stage epidermal carcinogenesis initiated by 7-12-dimethylbenz(a) — anthracene of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in newborn and adult SENCAR and BALB/c mice. *Cancer Res.* 1981; 41:773-779.
15. Legraverend C, Mansour B, Nebert DW, Holland JM. Genetic differences in benzo(a)pyrene-initiated tumorigenesis in mouse skin. *Pharmacology* 1980;20(5):242-255.
16. Shubick P. Studies on the promoting phase in the stages of carcinogenesis in mice, rats, rabbits and guinea pigs. *Cancer Res.* 1950; 10:13-17.
17. Siskin EE, Gray T, Barrett JC. Correlation between sensitivity to tumor promotion and sustained epidermal hyperplasia of mice and rats treated with 12-O-tetradecanolyphorbol-13-acetate. *Carcinogenesis* 1982; 3(4):403-407.
18. Stenbäck F. Skin carcinogenesis as a model system: observations on species strain and tissue sensitivity to 7,12-dime-



- thylbenz (a) anthracene with or without promotion from croton oil. *Acta Pharmacol. Toxicol.* 1980; 46(2):89-97.
19. Salaman MH, Roe FJC. Cocarcinogenesis. *Br. med. Bull.* 1964; 20 (2):139-144.
  20. Fischer SM, Gleason, GL, Bohrman JS, Slaga TJ. Prostaglandin enhancement of skin tumor initiation and promotion. *Adv. Prostaglandin Thromboxane Res.* 1980; 6:517-522.
  21. Frei JV, Stephens P. The correlation of promotion of tumor growth and of induction of hyperplasia in epidermal two-stage carcinogenesis. *Br. J. Cancer* 1968; 22:83-92.
  22. Fürstenberger G, Berry DL, Sorg B, Marks F. Skin tumor promotion by phorbol esters is a two-stage process. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1981; 78(12):7722-7726.
  23. Fürstenberger G, Sorg B, Marks F. Tumor promotion by phorbol esters in skin: evidence for a memory effect. *Science* 1983; 220:89-91.
  24. Pound AW. Carcinogenesis and cell proliferation. *N.Z. med. J.* 1968; 67:88-99.
  25. 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. *J. Natl. Cancer Inst.* 1959; 23:925-951.
  26. Slaga TJ, Fischer SM, Weeks CE, Klein-Szanto AJP. Multistage chemical carcinogenesis in mouse skin. *Curr. Probl. Dermatol.* 1980; 10:193-218.
  27. Berenblum I. A speculative review; the probable nature of promoting action and its significance in the understanding of the mechanism of carcinogenesis. *Cancer Res.* 1954; 14(7): 471-477.
  28. Setälä K, Merenmies L, Niskanen EE, Nyholm M, Stjernvall L. Mechanisms of experimental tumorigenesis. VI. Ultrastructural alterations in mouse epidermis caused by locally applied carcinogen and dipole-type tumor promoter. *J. Natl. Cancer Inst.* 1960; 25:1155-1189.
  29. Raick AN, Ritchie AC. The fine structural changes induced in the epidermis by croton oil fraction A<sub>1</sub> and two stage carcinogenesis in mouse skin. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* 1971; 12:66.
  30. Klein-Szanto AJP, Slaga TJ. Numerical variation of dark cells in normal and chemically induced hyperplastic epidermis with age of animal and efficiency of tumor promoter. *Cancer Res.* 1981; 41 (11 Part1): 4437-4440.
  131. Raick AN. Ultrastructural, histological and biochemical alterations produced by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate on mouse epidermis and their relevance to skin tumor promotion. *Cancer Res.* 1973; 33:269-286.
  32. Raick AN. Cell differentiation and tumor-promoting action in skin carcinogenesis. *Cancer Res.* 1974; 34:2915-2925.
  33. Schwentker V. The gerbil. A new laboratory animal. *Illinois Vet.* 1963; 6:5-9.
  34. Handler AH, Magalini SI, Pav D. Oncogenic studies on the Mongolian gerbil. *Cancer Res.* 1966; 26:844-847.
  35. McDonald CJ, Quevedo Jr. WC, Bienieki TC, Fausto N. Role of melanocytes in responses of the skin of Mongolian gerbils to chemical carcinogens. *J. Invest. Dermatol.* 1970; 54:92.
  36. Quevedo Jr WC, Bienieki TC, Fausto N, Magalini SI. Induction of pigmentary changes in the skin of the Mongolian gerbil by chemical carcinogens. *Experientia* 1968; 24: 585-586.
  37. Van Duuren BL. Tumor promoting agents in two-stage carcinogenesis. *Prog. exp. Tumor Res.* 1969; 11:51-68.
  38. Burke TJ. Rats, mice, hamsters and gerbils. *Vet. Clin. North Am.: Small Anim. Pract.* 1979; 9(3):473-486.
  39. Behmer OA, Castro de Tolosa EM, Freitas Neto AG. Manual de técnicas para histologia normal e patológica. São Paulo: EDART-EDUSP, 1976:117.
  40. Pearse AGE. *Histochemistry. Theoretical and applied* 2nd ed. London: J & A. Churchill Ltd., 1960:919.
  41. Zugibe FT. *Diagnostic histochemistry.* Saint Louis: C. V. Mosby Company, 1970:257.
  42. Humphrey CD, Pittman FE. A simple methylene blue-azure II - basib fuchsin stain for epoxy-embedded tissue sections. *Stain Technol.* 1974;49(1):9-14.
  43. Reynolds ES. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 1963; 17:208-212.
  44. Strauss JS, Matoltsy AG. *Pele.* In: Weiss L, Greep RO. *Histologia.* 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1981: 501.
  45. Berenblum I, Shubick P. A new, quantitative approach to the study of the stages of chemical carcinogenesis in mouse's skin. *Br. J. Cancer* 1947; 1:383-391.
  46. Tarin D. Sequential electron microscopical study of experimental mouse skin carcinogenesis. *Int. J. Cancer* 1967; 2:195-211.
  47. Setälä K, Merenmies L, Stjernvall L, Nyholm M. Mechanism of experimental tumorigenesis. IV. Ultrastructure of interfollicular epidermis of normal adult mouse. *J. Natl. Cancer Inst.* 1960; 24:329-353.
  48. Lever WF. *Histopathology of the skin.* 5th ed. Philadelphia: JB Lippincott Company, 1975:9-45.
  49. Argyris TS. Epidermal growth following a single application of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in mice. *Am J. Pathol.* 1980; 98(3):639-648.
  50. Raick AN, Thumm K, Chivers BR. 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.* 1972; 32:1562-1568.
  51. Fenske M. Production of steroids by in vitro superfusion from adrenals of the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*): effect of acute stress. *Comp. Biochem. Physiol.* IAI 1983; 74(4):971-976.
  52. Quevedo Jr. WC, Fleischmann RD, Dyckman J, Jimbow K, Bienieki TC. Ultrastructural observations on DMBA-induced dermal hyperpigmentation and blue nevus-like tumors in the Mongolian gerbil. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 1980; 163(4):461-468.