

TEMAS DE REVISÃO

CARCINOGENESE QUÍMICA CUTÂNEA *

MARIA ANGÉLICA GUZMÁN SILVA¹, JORGE S.P. GUIMARÃES²

Hospital Universitário Antônio Pedro – Niterói, R.J.

INTRODUÇÃO

Os progressos técnicos obtidos na primeira metade deste século, facilitando a indução química de tumores cutâneos em diversos animais experimentais, permitiram que se avançasse no estudo dos mecanismos biológicos envolvidos na carcinogênese. A pele de camundongo tem uma longa história como modelo vantajoso para esse tipo de pesquisa e as informações que se têm adquirido através do esclarecimento dos eventos que ocorrem durante a carcinogênese cutânea experimental indicam que o processo consiste de múltiplas etapas. As pesquisas mais recentes, que associam os modelos clássicos com fatores modificadores de processos químicos, têm elucidado alguns eventos essenciais para a carcinogênese.

HISTÓRICO DA INDUÇÃO QUÍMICA DE NEOPLASIAS

A primeira observação relacionando uma substância química como agente causal de neoplasia foi feita por Pervical Pott²⁷, em 1775, o qual associou a elevada incidência de tumores cutâneos em limpadores de chaminé com o fato desses indivíduos estarem continuamente expostos à fuligem.

Só 140 anos depois, em 1945, Yamagiwa e Ichikawa⁵² comprovaram a existência de um agente químico cancerígeno, ao conduzir experimentalmente tumores cutâneos em coelhos, pelo pincelamento repetido das orelhas com alcatrão de hulha.

Na década de 30, o trabalho realizado por Gook e colaboradores¹¹ possibilitou a extração do cancerígeno benzopireno (BP) do alcatrão de

hulha. Na mesma época, a síntese de outros hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP) cancerígenos, tais como dibenzantraceno (DBA), dimetilbenzantraceno (DMBA) e metilcolantreno (MC), foi efetuada por outros pesquisadores^{32, 53}. O tratamento continuado da pele com qualquer uma das referidas substâncias induz à formação de tumores e constitui o chamado modelo cumulativo de carcinogênese cutânea.

Desde a década de 20, os estudos feitos por Deelman¹² indicavam a natureza bifásica da carcinogênese. Esse autor observou que tratando a pele de camundongo com alcatrão até o aparecimento do primeiro tumor, as feridas feitas nessa pele, previamente tratada, provocavam o crescimento de numerosos outros tumores.

Mas foi só na década de 40 que a equipe de Rous^{15, 31} ao estudar a relação existente entre cancerígenos, agentes irritantes hiperplásicos e produção de tumores na pele de coelhos, indicou a existência de duas fases distintas e separadas na carcinogênese, denominando-as de iniciação e promoção. Na iniciação, pela exposição da pele a um agente cancerígeno, haveria a transformação de algumas células normais em células tumorais latentes; na promoção, pelo tratamento subsequente com agentes ou procedimentos não cancerígenos, essas células latentes dariam origem a tumores visíveis. Uma das experiências consistiu no pincelamento das orelhas de coelhos com cancerígeno, por um determinado número de vezes; depois, as orelhas ainda aparentemente normais eram perfuradas, havendo então a formação rápida de tumores no local das feridas.

Em 1941, Berenblum² determinou o efeito co-cancerígeno do óleo de cróton (OC) e da sua resina, ao aplicá-los na pele de camundongo jun-

*Tese de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Patologia Experimental da Universidade Federal Fluminense.

¹ Professora Assistente do Departamento de Patologia de Apoio Clínico. ² Professor Titular da Universidade Federal Fluminense, Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Patologia Experimental, Departamento de Patologia e Apoio Clínico da Universidade Federal Fluminense. Endereço para correspondência: ¹ Departamento de Patologia e Apoio Clínico, Hospital Universitário Antônio Pedro, Rua Marquês de Paraná s/n.º – 24030 – Niterói, R.J.

cancerígeno, não induziam a formação de tumores, enquanto que o contrário acontecia, quando o tratamento prévio com cancerígeno era repetido algumas vezes; nesse último caso as feridas determinavam o crescimento de muitos tumores. O autor, mediante diversos estudos experimentais, demonstrou que o processo de promoção consiste em duas etapas, por ele denominadas de conversão e propagação. Na conversão, pelo tratamento com algumas doses de OC, as células anteriormente iniciadas passariam a ser células tumorais "adormecidas". Na propagação, as células tumorais "adormecidas", pelo estímulo subsequente com agentes irritantes, como terebintina, proliferariam constituindo tumores visíveis. Utilizando esta terminologia podemos considerar o OC, e por conseguinte o TPA, como promotor completo, e que dessa forma converte e propaga as células iniciadas, enquanto que a terebintina, outros irritantes e as feridas só têm atividade propagadora e são promotores incompletos.

Os estudos recentes de Slaga e sua equipe^{38, 39, 40, 41} e de Fürstenberger e colaboradores^{16, 17}, utilizando respectivamente mezerein e 12-O-retinoilforbol-13-acetato (RPA), ambos diterpenos similares ao TPA, tanto na sua estrutura quanto nos seus efeitos biológicos, mas que são promotores incompletos dentro do modelo de três etapas (iniciação-conversão-propagação), confirmaram e ampliaram o conceito de Boutwell, ao concluir que a promoção, e portanto a carcinogênese química, é um processo de etapas múltiplas, relacionadas entre si de forma ainda pouco conhecida.

MECANISMOS DE AÇÃO

Iniciação

Yuspa⁵³, em 1976, ao referir-se à natureza irreversível da iniciação, sugeriu que a transformação de células normais em células tumorais deve envolver alterações na informação genética que controla o crescimento e a diferenciação celular. O fenótipo tumoral poderia resultar de modificações no material genético (DNA), ou poderia refletir efeitos epigenéticos, através de moléculas proteicas e RNA alterados. Em qualquer um desses eventos, a ligação física ou covalente do cancerígeno químico com moléculas críticas na célula parece estar relacionada ao mecanismo de transformação neoplásica.

O estudo da interação dos HAP cancerígenos com as macromoléculas teciduais foi iniciado por Miller²³, em 1951, ao descrever a ligação do

BP com proteínas da pele de camundongo. Posteriormente, em 1964, Brookes e Lawley¹⁰ demonstraram a ligação de vários HAP cancerígenos com DNA, RNA e proteínas isolados da pele de camundongo e acharam que há uma boa correlação entre a quantidade de HAP ligada ao DNA e a potência cancerígena dele, correlação essa que não existia na ligação com o RNA ou as proteínas; os autores, empregando métodos de extração do HAP ligado ao DNA, indicaram a ocorrência de ligação covalente entre essas moléculas, baseados na resistência da extração do HAP. A relação da ligação dos HAP, exceto o DBA, ao DNA de origem epidérmico com a carcinogenicidade deles, foi confirmada por Goshman e Heidelberger¹⁸, em 1967.

Hennings e Boutwell²⁰ afirmaram que nas células iniciadas a alteração crítica ocorre no DNA que normalmente não é transcrito em qualquer etapa do ciclo celular. A interação do HAP com o DNA e a alteração genética subsequente parecem ter um papel importante na iniciação^{1, 9}. Slaga e colaboradores³⁹ enfatizaram que os HAP, ao atuar como iniciadores, inibem a síntese de DNA, e que essa atividade iniciadora dos HAP correlaciona-se bem, quer com a capacidade de ligar-se ao DNA como com a de inibir a síntese de DNA.

Sabe-se, atualmente, que os HAP requerem ativação metabólica para interagir com as macromoléculas teciduais. Existe, na pele e em outros órgãos-alvo, um sistema enzimático microsomal que consiste de um grupo de oxidases de função associada denominado arilhidrocarbonetohidroxilase (AHH). Esse sistema enzimático metaboliza os HAP em epóxidos, que seguindo diversas vias, resultam na detoxificação ou na ativação da forma original (pró-cancerígeno) para formas reativas eletrofílicas (cancerígeno terminal)^{9, 39, 45, 53}.

De acordo com Van Lancker⁴⁵, o epóxido, produto da oxidação do HAP, mediada pela enzima AHH, pode: reagir espontaneamente com grupos nucleofílicos de proteínas, RNA e DNA; ser conjugado com glutation, através da enzima glutation-S — epoxidotransferase (GST); isomerizar-se espontaneamente, formando fenol, que por sua vez se conjuga ao ácido glucorônico ou a radicais sulfato; ser hidratado pela ação da enzima epoxidohidrase (EH), originando dihidrodioi.

Estudos de Slaga e sua equipe³⁹ determinaram que o produto dihidrodioi pode entrar num outro ciclo de ativação metabólica mediada também por oxidases microsômicas, dando origem a diolepóxidos, que têm uma potência cancerígena muito maior que o epóxido de origem (figura 2).

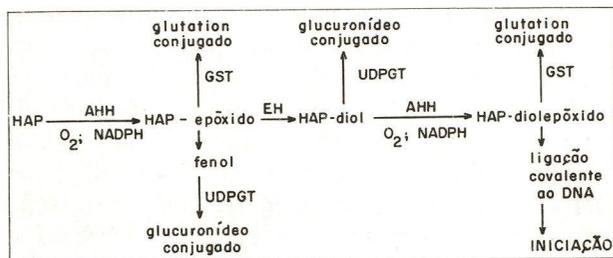


Figura 2 — Diagrama da iniciação segundo Slaga e cols³⁹.

Eastman e Bresnik¹³ estudaram o metabolismo do MC e a ligação dos produtos metabólicos ao DNA. A cromatografia do produto da incubação de MC com microsomas isolados de fígado de rato revelou 17 metabólitos, que submetidos a metabolismo adicional, ligavam-se ao DNA com uma eficiência variável, sendo que 7 metabólitos eram mais efetivos que o HAP de origem. O maior percentual de ligação ao DNA foi obtido com o metabólito identificado como trans-9-10-dihidrodiol, isso devido provavelmente ao metabolismo subsequente, que originaria o diolepóxido correspondente na "região baía" do HAP.

Levin e colaboradores²², ao estudar a atividade tumorigênica de diversos metabólitos do MC na pele de camundongos CD-1, observaram uma maior atividade com o hidróxi-9,10-dihidrodiol, apesar de que outros metabólitos também mostraram a atividade superior ao MC. Esse trabalho reforça a teoria da "região baía", proposta por Jerina e colaboradores²¹, que se refere à ativação dos HAP. De acordo com essa teoria, o cancerígeno terminal de um HAP é o diolepóxido, formado em carbonos vizinhos, relacionados à "região baía", a qual ocorre no HAP pela fusão angular de anéis benzênicos (figura 3).

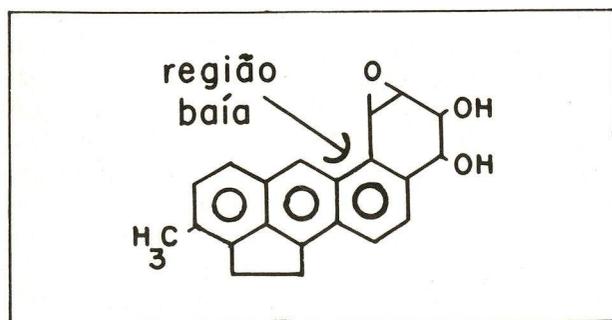


Figura 3 — Estrutura do 9,10-diolepóxido de 3-metilcolantreno, mostrando a "região baía".

Há referências na literatura, indicando que o cancerígeno se liga de forma preferencial às bases purínicas, e que essa ligação ao DNA não re-

quer divisão celular e ocorre predominantemente na fase de síntese³².

Por último, existe um outro fator, o mecanismo de reparo do DNA, que interfere no processo de iniciação^{36, 45}.

Conforme Slaga e colaboradores³⁹, a iniciação é um fenômeno genético, cujo caráter irreversível se deveria à atividade mutagênica do cancerígeno terminal, gerado por ativação metabólica. Esse, teria efeito mutagênico ao ligar-se de forma covalente ao DNA, mais especificamente ao grupo amino exocíclico da adenina ou da guanina. A eficácia da iniciação parece depender da relação existente entre a ativação e a detoxificação do HAP e, ainda, do reparo da ligação do diolepóxido ao DNA; ao estar inibido o reparo por excisão ou aumentado o reparo propenso a erro, prevaleceria a interação crítica entre o cancerígeno terminal e o DNA. Além disso, duas ou três divisões celulares seriam necessárias para fixar o evento no genoma.

Promoção

Após terem isolado os agentes promotores do OC, Van Duuren e colaboradores⁴⁴, em 1968, estudaram o papel desses agentes na carcinogênese química, particularmente seu efeito sobre as membranas biológicas. Considerando que a membrana plasmática, através de permeabilidade seletiva de diversas substâncias, desempenha um papel importante no controle da divisão celular, a interação dos ésteres de forbol com a membrana plasmática pode resultar na alteração dos mecanismos de controle do ciclo celular. Esses autores, ao realizar experiências "in vitro", verificaram que as membranas celulares expostas a ésteres de forbol têm perda de permeabilidade específica. Van Duuren⁴³ relatou também a perda da inibição por contato em células cultivadas "in vitro", devida a ação do agente promotor sobre a membrana plasmática e sugeriu efeito similar "in vivo". Portanto, o papel primário do promotor tumoral seria a alteração das propriedades das membranas celulares.

Já Hennings e Boutwell²⁰, através do estudo sobre o mecanismo da promoção tumoral, verificaram que, após uma única aplicação de OC na pele de camundongos STS, ocorre um estímulo inicial, duplicando e até triplicando a síntese de RNA em 6 horas, e a de proteínas em 12 horas. Além disso, há uma inibição inicial da síntese de DNA, seguida de um estímulo, triplicando-a 18 horas depois da aplicação; sete dias depois, os níveis de síntese macromolecular retornam aos valores normais. Os autores postularam a participa-

ção do estímulo de síntese de RNA específico na promoção tumoral, mais especificamente na etapa de conversão, ao interferir na expressão genética, permitindo a transcrição do DNA alterado das células iniciadas. Raick e Ritchie²⁹ descreveram resultados similares referentes à síntese de RNA e DNA, obtidos com a fração A₁ de OC na pele de camundongo.

Conforme Yuspa e colaboradores^{5,3}, os promotores interagem com membranas, estimulam e alteram a expressão genética e, eventualmente, aumentam a taxa de proliferação celular; uma ou várias dessas interações seriam responsáveis pelo mecanismo de ação.

Outro efeito biológico importante, descrito por Stjernswärd⁴², em 1967, é a imunossupressão provocada pelo OC.

Dos vários outros eventos bioquímicos associados à ação do TPA e outros agentes promotores, citamos⁵¹: indução da enzima ornitinas-carboxilase (ODC), engajada na síntese de poliaminas; alterações na superfície celular, incluindo aumento na síntese de fosfolípidos e fosforilação da membrana; indução da atividade de protease.

Os resultados das pesquisas realizadas por Shoyab e colaboradores³⁷ e por Weinstein e sua equipe⁵⁰, sobre a interação de ésteres de forbol com receptores de membrana, indicaram que os promotores atuam ligando-se aos receptores do fator de crescimento epidérmico (FCE) normal. Portanto, esses agentes alterariam a afinidade entre o receptor e o FCE, sem variar o número de receptores por célula. A inibição da ligação receptor-FCE, devida à usurpação pelo éster de forbol, é reversível.

Weinstein e colaboradores⁵⁰ postularam que o sistema receptor-FCE atuaria durante a embriogênese, aumentando o crescimento de novas populações de células-tronco. No adulto, esse sistema aumentaria a expansão de células-tronco durante a hiperplasia, a cura de feridas e a regeneração; em todas essas situações é necessária a inibição temporal da diferenciação terminal com a conseqüente expansão da população proliferativa. Mais tarde, o desligamento desse sistema receptor-FCE, permitiria o restabelecimento da diferenciação terminal, retornando o tecido a seu nível normal de renovação celular. Considerando isso, o estímulo em excesso do sistema receptor-FCE, produzido pela aplicação contínua de TPA no modelo experimental bifásico, teria efeitos quer inibidores da diferenciação como estimuladores do crescimento das células-tronco aberrantes, geradas no processo de iniciação.

Slaga e colaboradores^{40, 41} citaram também as seguintes respostas da pele de camundongo aos ésteres de forbol e outros promotores tumorais: aumento da síntese e fosforilação de histona; diminuição do estímulo do AMP cíclico pelo isoproterenol; indução de proteínas embrionárias na pele adulta; diminuição da atividade de histidase; diminuição da resposta à calona G₁ na pele adulta.

Vários pesquisadores, na década atual^{25, 26, 35} determinaram que o TPA altera os perfis de proteínas epidérmicas, especialmente o das queratinas, que são o principal produto da diferenciação epidérmica. As modificações na epiderme de camundongos SENCAR, após o tratamento único ou repetido com TPA, resultam em padrões de queratina semelhantes aos da epiderme de camundongo neonato, refletindo uma reversão da expressão da síntese de queratinas. As células de papilomas e carcinomas quimicamente induzidos também apresentam padrões de queratina alterados, similares aos da epiderme de neonatos.

Os resultados da utilização experimental de diversos modificadores da promoção tumoral indicaram que o estímulo de atividade ODC e a elevação conseqüente de poliaminas são importantes no processo de promoção, visto que a inibição dessa atividade pelo ácido retinóico reduz a indução de tumores^{39, 47, 48, 49}. As prostaglandinas também parecem ter papel importante na promoção, uma vez que as prostaglandinas F₂ e E₂ comprovadamente aumentam a promoção tumoral por TPA^{1,4} e reverterem a inibição da atividade ODC pela indometacina^{39, 46}.

Boutwell e colaboradores⁹ relataram que a maioria dos tumores espontâneos, assim como os de origem viral, os resultantes de radiações e os quimicamente induzidos mostram atividade ODC elevada e, ainda, que todos os promotores tumorais induzem atividade ODC em tecido normal. Conforme esses autores, as poliaminas, cuja síntese é determinada pela enzima ODC, participam no controle da síntese de DNA, RNA e proteína e parecem desempenhar um papel decisivo na divisão celular e provavelmente na maturação celular.

Vários pesquisadores relataram a existência de duas ou mais etapas na fase de promoção^{8, 9, 16, 17, 38, 39, 40, 41}. Conforme Slaga e sua equipe³⁹, a promoção é um fenômeno epigenético. Na primeira etapa, isto é, a conversão de Boutwell, haveria a desdiferenciação a estados embrionários por mecanismos ainda não esclarecidos, mas que têm expressão morfológica sob a forma de "células escuras", descritas inicialmente por Raick e

Ritchie³⁰, em 1971. Na segunda etapa, que corresponde a propagação de Boutwell, seriam críticas e necessárias a elevação de poliaminas e prostaglandinas, e também a proliferação celular. Esse último evento poderia constituir, conforme hipótese dos autores³⁹, uma terceira etapa na promoção tumoral, o que ainda não foi comprovado experimentalmente (figura 4).

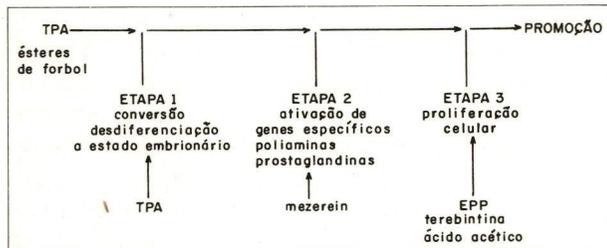


Figura 4 — Diagrama da promoção segundo Slaga e cols³⁹.

A existência de ambigüidades e incertezas ainda envolvendo os mecanismos biológicos propostos para explicar a carcinogênese, no sistema referido acima, certamente limita sua capacidade para explicar a carcinogênese química em geral e especialmente no homem. Não obstante, informações pertinentes indicam que algo muito próximo de um modelo bi ou trifásico se aplica também ao homem. Por exemplo³⁶, a exposição ao asbesto apenas provoca mesotelioma peritoneal, enquanto que a exposição ao asbesto associada ao fumo provoca mesotelioma pleural e aumenta bastante a incidência de câncer pulmonar; a suspensão do hábito de fumar reduz drasticamente a incidência do câncer pulmonar; a demonstração de que fenobarbital é promotor na carcinogênese hepática experimental e adoçantes como sacarina e ciclamato mostram-se potentes promotores na indução de tumores de bexiga; o consumo de substâncias promotoras naturais tem sido associado com câncer de esôfago em Curaçau, etc.

A exposição a cancerígenos por parte dos seres humanos provavelmente acontece concorrentemente com outros cancerígenos, agentes promotores, co-cancerígenos e anticancerígenos, sendo rara a exposição na forma seqüencial característica do modelo iniciação-promoção⁹.

Os fatos citados anteriormente indicam que pelo menos algo semelhante ao observado nos modelos experimentais ocorre na carcinogênese química humana, e que para uma prevenção efetiva, o conhecimento preciso dos fenômenos envolvidos na co-carcinogênese, a caracterização de sua possível natureza multifásica e a identifica-

ção de iniciadores e promotores devem ser de crucial importância.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Becker, F.F.: Recent concepts of initiation and promotion in carcinogenesis. *Am. J. Pathol.* 1981; 105(1): 3-9.
2. Berenblum, I.: The cocarcinogenic action of croton resin. *Cancer Res.* 1941; 1:44-8
3. Berenblum, I.: A speculative review: the probable nature of promoting action and its significance in the understanding of the mechanism of carcinogenesis. *Cancer Res.* 1965; 14(7):471-7
4. Berenblum, I., Haran, N.: The significance of the sequence of initiating and promoting actions in the process of skin carcinogenesis in the mouse. *Br. J. Cancer* 1955; 9:268-71
5. Berenblum, I., Shubik, 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* 1947; 1:379-82
6. Berenblum, I., Shubik, P.: A new, quantitative approach the study of the stages of chemical carcinogenesis in mouse's skin. *Br. J. Cancer* 1947; 1:383-91
7. Berenblum, I., Shubik, P.: The persistence of latent tumor cells induced in the mouse's skin by a single application of 9, 10-dimethyl-1, 2-benzanthracene. *Br. J. Cancer* 1949; 3:384-6
8. Boutwell, R.K.: Some biological aspects of skin carcinogenesis. *Prog. Exp. Tumor Res.* 1964; 4:207-50
9. Boutwell, R.K., Verma, A.K., Ashendel, C.L. et al: Mouse skin: a useful model system for studying the mechanism of chemical carcinogenesis. *Carcinog. Compr. Surv.* 1982; 7:1-12
10. Brookes, P., Lawley, P.D.: Evidence for the binding of polynuclear aromatic hydrocarbons to the nucleic acids of mouse skin: relation between carcinogenic hydrocarbons and their binding to deoxyribonucleic acid. *Nature* 1964; 202:781-4.
11. Cook, J.W., Hewett, C.L., Hieger, I, et al: Cutaneous chemical carcinogenesis: past, present and future. *J. Invest. Dermatol.* 1976. 67: 199-208.
12. Deelman, H.T. et al: Some biological aspects of skin carcinogenesis. *Prog. Exp. Tumor Res.* 1964; 4: 207-50.
13. Eastman, A., Bresniok, E.: Metabolism and DNA binding of methylcholanthrene. *Cancer Res.* 1979; 39 (11):4316-21.
14. Fischer, S.M., Gleason, G.L., Bohman, J.S., et al: Prostaglandin enhancement of skin tumor initiation and promotion. *Adv. Prostaglandin Thromboxane Res.* 1980; 6:517-22.
15. Friedewald, W.F., Rous, P.: The initiating and promoting elements in tumor production. *J. Exp. Med.* 1944; 80:101-25.
16. Fürstenberger, G., Berry, D.L., Sorg, B., et al: Skin tumor promotion by phorbol esters is a two-stage process. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1981; 78(12):7722-6.
17. Fürstenberger, G., Sorg, B., Marks, F.: Tumor promotion by phorbol esters in skin: evidence for a memory affect. *Science* 1983; 220:89-91
18. Goshman, L.M., Heidelberger, C.: Binding of tritium-labeled polycyclic hydrocarbons to DNA of mouse skin. *Cancer Res.* 1967; 27:1678-88.
19. Hecker, E. et al: Tumor promoting activity of phorbol and four diesters of phorbol in mouse skin. *Cancer Res.* 1971; 31:1074-9.
20. Hennings, H., Boutwell, R.K.: Studies on the mechanism of skin tumor promotion. *Cancer Res.* 1970; 30:312-20.
21. Jerina, D.M., Lehr, R.E., Yagi, H., et al: Comparison of the tumor initiating activity of 3-methylcholanthrene in mice. *Cancer Lett.* 1979; 7(2-3):97-102.
22. Levin, W., Buening, M.K., Wood, A.W. et al: Tumorigenic activity of 3-methylcholanthrene metabolites on mouse skin and in newborn mice. *Cancer Res.* 1979; 39(9):3549-53.
23. Miller, E.C.: Studies on the formation of protein-bound derivatives of 3,4-benzopyrene in the epidermal fraction of mouse skin. *Cancer Res.* 1951; 11:100-8.
24. Mottram, J.C., et al: Some biological aspects of skin carcinogenesis. *Prog. Exp. Tumor Res.* 1964; 4: 207-50.
25. Nelson, K.G., Slaga, T.J.: Keratin modifications in epidermis, papillomas and carcinomas during two-stage carcinogenesis in the senescent mouse. *Cancer Res.* 1982; 42:4176-81.

26. Nelson, K.G., Stephenson, K.B., Slaga, T.J.: Protein modifications induced in mouse epidermis by potent and weak tumor promoting hyperplasiogenic agents. *Cancer Res.* 1982; 42: 4164-75.
27. Pott, P. Neoplasia. In: Robbins, S.L., Cottrán, R.S.: *Patologia estrutural e funcional*. 2. ed. Rio de Janeiro, Interamericana 1983; Cap. 5, 143.
28. Pound, A.W.: Carcinogenesis and cell proliferation. *N.Z. Med. J.* 1968; 67:88-99.
29. Raick, A.N., Ritchie, A.C.: Early ultrastructural and biochemical changes induced by croton oil fraction A₁ in mouse skin. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* 1970; 11:65.
30. Raick, A.N., Ritchie, A.C.: The fine structural changes induced in the epidermis by croton oil fraction A₁ and two stage carcinogenesis in mouse skin. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* 1971; 12: 66.
31. Rous, P., Kidd, J.G.: Conditional neoplasms and subthreshold neoplastic states. A study of tar tumors in rabbits. *J. Exp. Med.* 1941; 73:365-89.
32. Ryser, H.J.P.: Chemical carcinogenesis. *New Engl. J. Med.* 1971; 285(13):721-34.
33. Saffiotti, U., Shubik, P.: Studies on promoting action in skin carcinogenesis. *Natl. Cancer Inst. Monogr.* 1963; 10:489-507.
34. Salaman, M.H., Roe, F.J.C.: Carcinogenesis. *Br. Med. Bull.* 1964; 20(2): 139-44.
35. Achweizer, J., Winter, H.: Changes in regional keratin polypeptide patterns during phorbol ester-mediated reversible and permanently sustained hyperplasia of mouse epidermis. *Cancer Res.* 1982; 42: 1517-29.
36. Scribner, J.D., Süß, R.: Tumor initiation and promotion. *Int. Rev. Exp. Pathol.* 1978; 18: 137-98.
37. Shoyab, M., De Larco, J.E., Todaro, G.J.: Biologically active phorbol esters specifically alter affinity of epidermal growth factor membrane receptors. *Nature* 1979; 279:387-91.
38. Slaga, T.L., Fischer, S.M., Nelson, K., et al: Studies on the mechanism of skin tumor promotion: evidence for several stages in promotion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1980; 77(6) 3659-63.
39. Slaga, T.J., Fischer, S.M., Weeks, C.E., et al: Multistage chemical carcinogenesis in mouse skin. *Curr. Probl. Dermatol.* 1980; 10: 193-218.
40. Slaga, T.J., Fischer, S.M., Weeks, C.E.: Studies on the mechanism involved in multistage carcinogenesis in mouse skin. *J. Cell. Biochem.* 1982, 18(1): 99-119.
41. Slaga, T.J., Fischer, S.M., Weeks, C.E., et al: Specificity and mechanism(s) of promoter inhibitors in multistage promotion. *Carcinog. Comp. Surv.* 1982; 7:19-34.
42. Stejernswärd, J.: Further immunological studies of chemical carcinogenesis. *J. Natl. Cancer Inst.* 1967; 38: 515-26.
43. Van Duuren, B.L.: Tumor promoting agents in two-stage carcinogenesis. *Prog. Exp. Tumor Res.* 1969; 11: 51-68.
44. Van Duuren, B.L., Sivak, A.: Tumor-promoting agents from *Croton tiglium* L. and their mode of action. *Cancer Res.* 1968; 28: 2349-56.
45. Van Lancker, J.L.: Molecular and cellular mechanism in disease. New York, Springer-Verlag 1976. Vol. 2, Cap. 16, p. 970-88.
46. Verma, A.K., Asshendel, C.L., Boutwell, R.K.: Inhibition by prostaglandin synthesis inhibitors of the induction of epidermal ornithine decarboxylase activity, the accumulation of prostaglandins, and tumor promotion caused by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Cancer Res.* 1980; 40(2): 308-15.
47. Verma, A.K., Boutwell, R.K.: Vitamin A acid (retinoid acid), a potent inhibitor of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate induced ornithine decarboxylase activity in mouse epidermis. *Cancer Res.* 1977; 37: 2196-201.
48. Verma, A.K., Shapas, B.G., H.M., et al: Correlation of the inhibition by retinoids of tumor promoter-induced mouse epidermal ornithine decarboxylase activity and skin tumor promotion. *Cancer Res.* 1979; 39: 419-25.
49. Verma, A.K., Slaga, T.J., Wertz, P.W., et al: Inhibition of skin tumor promotion by retinoic acid and its metabolite 5,6-epoxyretinoic acid. *Cancer Res.* 1980; 40(7): 2367-71.
50. Weinstein, I.B., Horowitz, A.D., Mufson, R.A., et al: Biochemical effects of the phorbol ester tumor promoters and their implications for polycyclic aromatic hydrocarbon carcinogenesis. In: Weinstein, I. B. *Polycyclic hydrocarbons and cancer*. New York, Academic Press 1981; Vol. 3, 293-315.
51. Weinstein, I.B., Troll, W.: National Cancer Institute workshop on tumor promotion and cofactors in carcinogenesis. *Cancer Res.* 1977; 37: 3461-3.
52. Yamagiwa, K., Ichikawa, K.: Neoplasia. In: Robbins, S.L., Cottrán, R.S.: *Patologia estrutural e funcional*. 2. ed. Rio de Janeiro, Interamericana, 1983. Cap. 5, p. 143.
53. Yuspa, S.H., Hennings, H., Saffiotti, U.: Cutaneous chemical carcinogenesis: past, present, and future. *J. Invest. Dermatol.* 1976; 67: 199-208.