

Histogênese e patogênese das neoplasias hepáticas

ROMILDA E. KUHN¹, M. ANGÉLICA GUZMÁN-SILVA², JORGE S.P. GUIMARÃES³

Trabalho realizado no Hospital Universitário Antonio Pedro - Niterói - RJ

Resumo

Os autores comentam a hepatocarcinogênese e apresentam revisão da bibliografia.

Unitermos: neoplasias hepáticas

Introdução

Nos últimos anos, a ciência tem caminhado a largos passos no estudo químico de tumores em diversas espécies animais, permitindo maior conhecimento dos mecanismos biológicos envolvidos no processo de carcinogênese. Diversos hepatocarcinógenos, diretamente ou após ativação metabólica, interagem com as macromoléculas celulares, exercendo efeito tóxico e carcinogênico. As informações adquiridas através da carcinogênese hepática experimental (Tabela 1) indicam que o processo consiste em várias etapas, caracterizadas como iniciação, promoção e progressão. Nos diversos protocolos é constante o surgimento precoce de focos de hepatócitos com alterações fenotípicas e enzimáticas, seguidas de hiperplasia nodular hepática e, finalmente, de carcinoma hepatocelular.

No protocolo estabelecido por Peraino e col., em 1971, é utilizado como iniciador um hepatocarcinógeno, administrado uma única vez ou por período limitado a animais jovens, lactentes ou neonatos, nos quais os hepatócitos em proliferação ainda são numerosos; a seguir é administrado o promotor de forma crônica. Os tumores assim induzidos, nódulos hiperplásicos e hepatocarcinomas, são mais freqüentes do que os que ocorrem sem o tratamento promotor [34].

O protocolo proposto em 1977 por Pitot e col. difere do anterior na utilização de animais adultos submetidos a HP, 20 a 24 horas antes da iniciação; assim, é induzida proliferação dos hepatócitos, necessária para a fixação da lesão bioquímica do genoma, conseqüente à ligação do carcinógeno - iniciador - ao ADN. Após o período de promoção com FB, adminis-

Tabela 1

Protocolo	Iniciador	Promotor	Referências
Peraino et al., 1971	2-AAF BP cicasina DENA DMNA 2-Me-DAB 3'-Me-DAB NMU NNM	2-AAF DEHF DDFM DDT FB DFP	1-24
Solt-Farber, 1976	DENA	2-AAF/HP/2-AAF	25-30
Pitot et al., 1977	HP+AFB1 HP+DENA HP+NNM HP+safrol	FB	29-32
Cayama et al., 1978	HP+DENA	2-AAF/CCl ₄ /2-AAF	29
Schinozuka et al., 1979	DENA etionina	dieta deficiente em colina	29,33

Abreviaturas: 2-AAF: 2-acetilaminofluoreno; ADN: ácido desoxirribonucleico; ADNase: desoxirribonuclease; AFB₁: aflatoxina B₁; ARN: ácido ribonucleico; ARNase: ribonuclease; ATPase: adenosina trifosfatase; G-6-Fase: glicose-6-fosfatase; BP: benzopireno; CCl₄: tetracloreto de carbono; DDFM: 4,4-diaminodifenilmetano; DDT: diclorodifeniltricloroetano; DEHF: di(2-etilhexil)-ftalato; DENA: dietilnitrosamina; DFP: difenilos policlorados; DMNA: dimetilnitrosamina; FB: fenobarbital; gama-GT: gamaglutamiltranspeptidase; HP: hepatectomia parcial; 2-MEDAB: 2-metil-N,N-dimetil-4-aminoazobenzeno; 3'-Me-DAB: 3'-metil-4-(dimetilamino)azobenzeno; NMU: N-nitroso-N-metiluréia; NNM: N-nitrosomorfolina.

¹Professor Titular, AFE; ²Professor Assistente, UFF; ³Professor Titular, UFF - Endereço do autor para correspondência: Rua Marquês de Paraná, 303 - Departamento de Patologia - CEP 24030 - Rio de Janeiro - Niterói - RJ

trado cronicamente, é possível quantificar os focos de hepatócitos com alterações enzimáticas, bem como os nódulos hiperplásicos e os carcinomas hepatocelulares [34, 35].

Solt e Farber [25], em 1976, desenvolveram um outro protocolo, baseados na observação de que a citotoxicidade dos carcinógenos leva à inibição da proliferação celular, porém os hepatócitos pré-neoplásicos - iniciados - são resistentes a esse efeito citotóxico e, por outro lado, têm a capacidade de proliferar quando normalmente estimulados. Como agente iniciador é administrada DENA, uma única vez a animais adultos; duas semanas depois começa o procedimento promotor, que consiste em ingestão de 2-AAF durante duas semanas, inibindo assim a proliferação dos hepatócitos normais, e no meio desse período os animais são submetidos a HP. Sob essas condições, o parênquima hepático normal não regenera, porém os hepatócitos iniciados proliferam rapidamente, dando origem seqüencial a focos, nódulos e carcinomas [34].

No protocolo proposto por Cayama e col., em 1978, emprega-se a iniciação do modelo Pitot e a promoção do modelo Solt e Farber, exceto pela substituição da HP por administração única de CCl₄ como estímulo da proliferação regenerativa na etapa de promoção [29]. Shinozuka e col., em 1979, propuseram um outro protocolo, que consta de administração permanente de etionina associada a uma dieta deficiente em colina; a iniciação pode ser substituída por administração única de DENA, ao invés de etionina [29, 33].

Mediante esses protocolos experimentais comprovou-se que o desenvolvimento do carcinoma hepatocelular constaria ao menos da seguinte seqüência de eventos:

Iniciação

Carcinógeno (ativado) + hepatócito alvo $\xrightleftharpoons[\text{reparo}]{}$ lesão bioquímica do ADN

Lesão bioquímica + proliferação celular \longrightarrow hepatócitos iniciados do ADN

Promoção

Hepatócitos + proliferação celular \longrightarrow focos fenotipicamente alterados iniciados seletiva

Focos fenotipicamente + proliferação celular \longrightarrow nódulos hiperplásicos alterados seletiva

Nódulos hiperplásicos + remoção do estímulo promotor $\xrightarrow{\text{Regressão}}$ Hepatócitos iniciados / Nódulos hiperplásicos persistentes

Progressão

Nódulos hiperplásicos + proliferação autônoma persistente $\xrightarrow[\text{hormônios}]{\text{dieta}}$ carcinoma

A citotoxicidade do carcinógeno atinge os diversos componentes celulares, como núcleo, nucléolo, citoplasma e membrana plasmática, porém as alterações de natureza tóxica não são uniformes na sua distribuição nas diversas regiões do lóbulo hepático. Em volta da tríade portal (acinoperiférica ou zona 1 de Rappaport) as alterações dos hepatócitos consistem em aumento do acúmulo de glicogênio. Já na zona centrolobular (acinocentral ou zona 3 de Rappaport) ocorre perda de glicogênio. As alterações tóxicas podem provocar necrose e, posteriormente, fibrose e cirrose. Tanto as alterações tóxicas, como suas conseqüências, são reações concomitantes ao efeito cancerígeno do carcinógeno, porém não são relacionadas ao processo de transformação neoplásica. Por outro lado, como reação aos diversos carcinógenos, é freqüente a ocorrência de citomegalia, com surgimento de células hepáticas gigantes e bizarras. Esse fenômeno parece estar relacionado à inibição da divisão celular após a síntese de ADN [36].

Focos de células claras, focos de células eosinofílicas e focos de células basofílicas [14, 16, 36-40], além de proliferação de células "ovais" ou ductulares [34, 36, 38, 39], têm sido descritos em fígado de rato após a exposição ao hepatocarcinógeno. Quanto à arquitetura desses focos, geralmente eles apresentam apenas pequenas alterações do padrão normal, e as lâminas de hepatócitos que os compõem mostram continuidade com o parênquima normal que os circunda. Esses focos não comprimem o tecido adjacente, porém são nitidamente demarcados pela coloração de suas células [37, 38].

Focos de hepatócitos fenotipicamente alterados, únicos ou múltiplos e de diferentes tipos, podem ser encontrados num mesmo fígado [37] e podem coexistir também com nódulos hiperplásicos e/ou carcinoma hepatocelular [14, 16, 20-22, 37]. A sua distribuição não é uniforme em todos os lobos [37], sendo mais freqüente a localização nos lobos direito e mediano [4, 38]. A distribuição heterogênea dos focos de hepatócitos fenotipicamente alterados pode estar relacionada à metabolização do cancerígeno e conseqüente iniciação dos hepatócitos, que ocorreria de forma preferencial em determinadas áreas, uma vez que o conteúdo total de citocromo P-450 difere nos diversos lobos hepáticos (lobo direito > lobo mediano > lobo esquerdo > processos caudal e ventral > lobo caudato) [41].

Os focos de células claras parecem ter suas células mal coradas, com citoplasma vazio, quando comparadas ao parênquima adjacente; a porção clara do

citoplasma contém glicogênio. Geralmente, essas células são de tamanho normal, mas podem estar um pouco aumentadas. Essas lesões são menores ou equivalentes ao tamanho de um lóbulo. Por outro lado, os focos acidofílicos podem ser iguais ou maiores que o lóbulo. O citoplasma desses hepatócitos aparece aumentado, intensamente eosinofílico e com aspecto fosco; o núcleo apresenta-se também aumentado e com nucléolo central proeminente. Os focos basofílicos são caracterizados pela coloração basofílica difusa do citoplasma celular, detectada mediante azul de toluidina; as lâminas dos hepatócitos são tortuosas, devido ao aumento da celularidade, uma vez que os hepatócitos são menores que o normal. Podem ainda ocorrer focos de população celular mista, composta de dois ou dos três tipos celulares descritos acima [37, 38].

Esses três tipos de focos são resistentes ao acúmulo de ferro na siderose hepática induzida e podem ser detectados pela sua reação negativa com azul-da-prússia [4, 19, 23, 37, 38]. Tem sido comprovado que os focos fenotipicamente alterados apresentam outras anormalidades funcionais que podem ser evidenciadas através de análise bioquímica ou mediante técnicas histoquímicas. Tais alterações consistem em decréscimo de ATPase [26, 32, 34, 36-38, 42] e de G-6-Pase [26, 34, 36-38, 43], aumento de gama-GT [11, 15, 19, 23, 27, 29, 31, 34, 36-38, 42], acúmulo persistente de glicogênio [23, 27, 34, 36-38], acúmulo de ARN [37, 44] e hiperbasofilia citoplasmática [25, 36-38, 44]. As variações funcionais dos hepatócitos que constituem os focos fenotipicamente alterados refletem múltiplas alterações do ADN nessas células-alvo [38]. Essas populações focais com expressão fenotípica aberrante teriam caráter pré-neoplásico [25, 35, 36, 38, 42, 44].

Os hepatócitos dos focos hiperbasofílicos são mais resistentes à citotoxicidade do microambiente tissular [25, 36, 38], o que pode ser explicado pela maior saturação dos fosfolípidios microssomais, de forma que essas membranas são menos susceptíveis de experimentar peroxidação lipídica [45]. Além disso, exibem maior potencial de crescimento [42, 45], evidenciado por uma maior taxa de síntese de ADN [3, 36, 38, 46] e um índice mitótico elevado [38, 40, 46]. Outra característica funcional desses hepatócitos é sua resistência ao efeito citotóxico das substâncias químicas que requerem ativação enzimática, como as carcinogênicas. Essa resistência é importante para o crescimento dos focos durante a administração contínua do carcinógeno [25, 36, 38]. A redução da capacidade de metabolizar substâncias tóxicas parece dever-se à diminuição da citocromo P-450, registrada nesses focos [36, 38, 47]. Os hepatócitos fenotipicamente alterados também são resistentes às substâncias inibidoras da mitose, como 2-AAF [25, 26, 34, 36,

47]. O número de focos de hepatócitos alterados seria o índice quantitativo do número de células resistentes a mito-inibitórios. As lesões focais referidas podem ser reversíveis ou irreversíveis, isto é, podem sofrer reversão fenotípica, persistirem e/ou evoluírem para hepatomas, isto dependendo do tempo de administração do carcinógeno, do modelo experimental utilizado e das condições do microambiente tissular [26, 34, 36, 38].

O FB administrado após o carcinógeno estimula o crescimento dos focos e diminui a regressão fenotípica [4, 38]. O mesmo efeito é observado especialmente em relação aos focos com alterações enzimáticas [12, 23, 36], tais como deficiência de ATPase [2, 3, 5, 9, 17, 18, 32] e de G-6-Pase [3]. Diversos autores têm observado a indução de múltiplos focos de atividade gama-GT positiva com essa metodologia [3, 11, 15, 17, 19].

Os nódulos hiperplásicos são lesões arredondadas, compreendendo uma área igual ou superior à de vários lóbulos [37, 38]. Uma característica importante para o diagnóstico dos nódulos hiperplásicos, em adição à sua distorção arquitetônica, é a nítida demarcação periférica do nódulo, o que não é observado nos focos [37, 38]. A organização dos hepatócitos que constituem os nódulos consiste em lâminas com duas ou mais células de espessura, ou em outros padrões, formando túbulos; estes aspectos lembram a estrutura do fígado fetal. Os nódulos podem ainda conter ductos biliares, porém o arranjo não corresponde ao do lóbulo hepático normal [27, 36, 37], e são constituídos por hepatócitos alterados nas suas propriedades biológicas, assim como morfológica e bioquimicamente [34, 36, 38]. As células variam de tamanho, sendo freqüente a citomegalia - hipertrofia - e tanto podem ser acidofílicas, basofílicas ou claras. Os núcleos podem mostrar-se aumentados, hiper cromáticos e com nucléolo muitas vezes proeminente. As figuras mitóticas podem estar aumentadas e serem anormais [36-38].

Assim como os focos, os nódulos podem exibir população mista [37, 40] e apresentar certas funções anormais, tais como resistência ao acúmulo de ferro [38], deficiência de G-6-Pase [3, 8, 38] e de ATPase [3, 38], e aumento de gama-GT [3, 30, 43], além de resistência ao efeito citotóxico dos carcinógenos que requerem ativação metabólica, isto pela redução da citocromo P-450 [8, 38]. Os nódulos, diferentemente dos carcinomas, em geral não estão associados à produção de alfa-fetoproteína [36, 38]. O aumento do índice mitótico observado nos hepatócitos que constituem os nódulos [36, 38], assim como o aumento da síntese de ADN [3, 34, 38], sugerem que os nódulos podem progredir para carcinoma.

Em estudos mediante transplante de nódulos hiperplásicos [38, 47], e outros sobre persistência e

crescimento de nódulos [34, 38], não foi observada conversão para carcinoma, porém ocasionalmente tem sido registrado o surgimento de alterações focais atípicas e câncer dentro de nódulos persistentes [16, 34, 38]. Assim, os nódulos parecem ser condição preliminar necessária para a formação de neoplasia benigna - nódulo hiperplásico persistente - com eventual progressão para carcinoma. A progressão, devida provavelmente ao acúmulo de alterações do ADN [38] por mutações adicionais na população em proliferação e geneticamente instável [3, 26], independe da influência do promotor [30], mas pode ser modificada por hormônios e elementos da dieta [36].

Os nódulos hiperplásicos com população celular predominantemente hiperbasofílica parecem ser os precursores diretos do carcinoma hepatocelular [36, 38]. Essas áreas hiperbasofílicas surgem por diminuição da atividade da ARNase e ADNase, aceleração da síntese de ARN e ADN, e diminuição de várias enzimas [36].

A proliferação ductular - células ovais - é outra alteração precoce, comumente observada durante a hepatocarcinogênese em ratos, com o uso de determinados carcinógenos [34, 36-39]. A proliferação das células ductulares consiste de uma hiperplasia primária das células epiteliais que revestem os ductos biliares da tríade portal (acinoperiférica ou zona 1 de Rappaport) e, às vezes, daquelas dos ductulos intra-lobulares [36, 37]. As células ovais podem surgir diretamente da proliferação das células ductulares, ou, ainda, derivar de outras células primitivas ou indiferenciadas da área portal [34, 39]. Essa proliferação celular cresce em leque, infiltrando-se no parênquima adjacente, produzindo dissociação e desorganização dos hepatócitos. A proliferação progressiva causa distorção hepática e contribui para o desenvolvimento de cirrose [36, 37]. Essas alterações não são essencialmente precursoras de carcinoma hepatocelular, no caso de muitos carcinógenos, entre eles as nitrosaminas [34, 36, 38]. As células ductulares em proliferação diferenciam-se formando ductos que, quando cercados por tecido fibroso, recebem a denominação de colangiofibrose, adenofibrose ou colangiadenoma [36, 37, 39]. Os hepatócitos ficam assim seqüestrados, dando a falsa impressão de invasão. A basofilia dessas células ovais, às vezes é intensa e apresenta nucléolos irregulares [36]. No caso de alguns carcinógenos, como os corantes azóicos, essas células podem tornar-se neoplásicas, originando colangiocarcinoma [34, 36]. Considerando a possível diferenciação das células ovais em hepatócitos [38] e a localização de alfa-fetoproteína nessas células ovais [34, 39], mas não nos hepatócitos dos nódulos hiperplásicos [36, 38] foi levantada a hipótese de participação das células ovais na carcinogênese hepatocelular [36, 39].

Os carcinomas hepatocelulares diferem morfológicamente dos nódulos hiperplásicos, tanto nas suas características citológicas, como no arranjo de suas células. Exibem, ainda, várias funções anormais, já descritas anteriormente, tais como resistência ao acúmulo de ferro e anormalidades enzimáticas. A principal diferença entre os carcinomas e os nódulos reside no crescimento progressivo, na capacidade de invasão e de produção de metástase por parte dos carcinomas [38].

A localização mais freqüente dos carcinomas hepatocelulares quimicamente induzidos é no lobo mediano e, a seguir, no lobo direito [48]. Como já foi mencionado, em relação aos focos de hepatócitos fenotipicamente alterados, a incidência heterogênea entre os lobos hepáticos pode-se explicar pela iniciação preferencial em determinadas áreas, que correspondem às de maior conteúdo de citocromo P-450 [41]. Isto originaria diferenças no metabolismo do carcinógeno, na distribuição de metabólitos ativos, na alquilação de ADN e na fixação dessa lesão bioquímica do genoma através de proliferação celular [48].

Considerando a arquitetura e a diferenciação celular, o carcinoma hepatocelular pode mostrar três padrões histológicos, adenocarcinoma, carcinoma trabecular e carcinoma pouco diferenciado [36-38]. A origem celular dos carcinomas hepáticos, salvo a possível exceção do adenocarcinoma, é geralmente o hepatócito. O adenocarcinoma originar-se-ia dos canalículos e ductulos biliares, porém como o padrão glandular geralmente está associado a outros padrões, como o trabecular, não pode ser excluída a origem a partir de células primitivas comuns [37, 38].

Os adenocarcinomas podem apresentar células com citoplasma contendo glicogênio, lipídios, muco, pigmentos e gotas hialinas. Há também grandes variações na relação e proporção de estruturas glandulares, vasos sanguíneos e estroma. Por estas características, os adenocarcinomas podem ser descritos como mucinosos, escirrosos, angiomatosos, císticos, alveolares e papilíferos [37].

O hepatocarcinoma de padrão trabecular reproduz o padrão celular e arquitetônico dos cordões hepáticos. As células semelhantes aos hepatócitos se reúnem em lâminas de duas ou mais células de espessura. Esses cordões celulares se alternam com canais vasculares semelhantes a sinusóides, que podem ser constituídos de células bem diferenciadas ou de grandes células neoplásicas irregulares, formando, nesse caso, lâminas também irregulares com distorção dos sinusóides. Os hepatócitos neoplásicos exibem, geralmente, basofilia citoplasmática, relação núcleo-citoplasma aumentada e nucléolo proeminente. O carcinoma trabecular pode, ocasionalmente, apresentar áreas com padrão adenomatoso [36-38]. As células neoplásicas podem conter, no seu citoplasma

glicogênico, gordura ou muco. Os núcleos são mais atípicos que os descritos nos nódulos, apresentando alterações cromatínicas. O estroma geralmente é constituído de fibras reticulares e colágenas esparsas [37].

No carcinoma pouco diferenciado, as figuras mitóticas são numerosas e bizarras. O padrão celular pode ser uniforme, de células hiper cromáticas pequenas, similares em tamanho, forma e características tintoriais [37]. Em outros, as células neoplásicas podem mostrar grande pleomorfismo, com núcleo único e intensa basofilia citoplasmática, ou podem aparecer como células neoplásicas gigantes e multinucleadas. Os hepatócitos, no carcinoma pouco diferenciado, se reúnem em lâminas, com várias camadas celulares de espessura [36]. O estroma geralmente é delicado e as estruturas vasculares são dilatadas, podendo apresentar-se trombosadas, junto a extensas áreas de necrose [37].

A metástase é um sinal inequívoco de malignidade. O câncer hepático tanto pode disseminar-se dentro do próprio fígado como para outros órgãos. Os tumores secundários instalados no fígado podem, às vezes, ser confundidos com múltiplos tumores primários. O omento e a superfície inferior do diafragma são locais comuns de metástase de tumor hepático, bem como pulmões, pâncreas, adrenais, rins, baço, estômago, testículos, músculo esquelético, osso, mesentério e, ainda, linfonodos mesentéricos e mediastínicos [36, 37]. Taxas de incidência de metástase de 10%, 20% e 30% têm sido relatadas, porém não há registro da incidência, localização e distribuição das metástases dos tumores hepáticos induzidos em modelos experimentais que permitissem a sobrevivência natural do animal. O tipo e a dosagem do carcinógeno químico podem desempenhar papel importante nessas características. Tem sido comprovado que os carcinomas trabeculares metastatizam, embora muitos não o façam. A disseminação dos tumores menos diferenciados é mais provável. As metástases podem apresentar todos os padrões histológicos descritos nos tumores primários [37].

Diversos aspectos da hepatocarcinogênese experimental são similares aos que ocorrem na patologia humana: maior incidência no sexo masculino, resistência ao acúmulo de ferro em carcinomas e nódulos pré-neoplásicos de indivíduos com hemocromatose, ausência de alfa-fetoproteína em adenomas hepáticos de mulheres jovens que usam anticoncepcionais orais. Por outro lado, a cirrose e suas causas - hepatite B, alcoolismo - são fatores que predis põem ao desenvolvimento de câncer hepático no homem; já nos modelos experimentais de hepatocarcinogênese, a cirrose não é imprescindível. Contudo, a atividade regenerativa crônica, tal como ocorre na cirrose, aumenta o risco de transformação neoplásica - inicia-

ção - das células em replicação, eventualmente expostas a cancerígenos, AFB₁ e nitrosaminas, entre outros. Além disso, a regeneração crônica propicia a proliferação das ditas células - promoção - resultando em crescimento tumoral, e, ainda, substâncias de comprovada ação promotora em roedores, como FB e DDT, poderiam ter alguma participação na hepatocarcinogênese humana.

Summary

This is a study on hepatic carcinogenesis followed by a revision of bibliography on the subject.

Key Words: *hepatic carcinogenesis*

Referências bibliográficas

1. WEISBURGER JH, MADISON RM, WARD JM, VIGUERA C, WEISBURGER EK. Modification of diethylnitrosamine liver carcinogenesis with phenobarbital but not with immunosuppression. *JNCI* 1975; 54: 1185-1188.
2. KITAGAWA T, SUGANO H. Enhancing effect of phenobarbital on the development of enzyme-altered islands and hepatocellular carcinomas initiated by 3-methyl-4-(dimethylamino)azobenzene or diethylnitrosamine. *GANN* 1978; 69: 679-687.
3. PUGH TD, GOLDFARB S. Quantitative histochemical and autoradiographic studies of hepatocarcinogenesis in rats fed 2-acetylaminofluorene followed by phenobarbital. *Cancer Res* 1978; 38: 4450-4457.
4. WATANABE K, WILLIAMS GM. Enhancement of rat hepatocellular-altered foci by the liver tumor promoter phenobarbital: evidence that foci are precursors of neoplasms and that the promoter acts on carcinogen-induced lesions. *JNCI* 1978; 61: 1311-1314.
5. KITAGAWA T, PITOT HC, MILLER EC, MILLER JA. Promotion by dietary phenobarbital of hepatocarcinogenesis by 2-methyl-N,N-dimethyl-4-aminoazobenzene in the rat. *Cancer Res* 1979; 39: 112-115.
6. NISHIZUMI M. Effect of phenobarbital, dichlorodiphenyltrichloroethane, and polychlorinated biphenyls on diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis. *GANN* 1979; 70: 835-837.
7. UCHIDA E, HIRUNO I. Effect of phenobarbital on induction of liver lung tumors by dimethylnitrosamide in newborn mice. *GANN* 1979; 70: 639-644.
8. KANEKO A, DEMPO K, KAKU T, YOKOYAMA S, SATOH M, MURI M, ONOE T. Effect of phenobarbital administration on hepatocytes constituting the hyperplastic nodules induced in rat liver by 3-methyl-4-dimethylaminoazobenzene. *Cancer Res* 1980; 40: 1658-1662.
9. NARITA T, WATANABE R, KITAGAWA T. Mechanisms of inhibition by simultaneously administered phenobarbital of 3'-methyl-4-(dimethylamino)azobenzene-induced hepatocarcinogenesis in the rat. *GANN* 1980; 71: 755-758.
10. MUCHIZUKI Y, FURUKAWA K, SAWADA N, GOTOH M. Dose-dependent enhancing effect of phenobarbital on hepatocarcinogenesis initiated by diethylnitrosamine in the rat. *GANN* 1981; 72: 170-173.

11. UCHIDA E, HIRONO T. Effect of phenobarbital on the development of neoplastic lesions in the liver of cycasin-treated rats. *J Cancer Res Clin Oncol* 1984; 100: 231-238.
12. ALLEN B, LINDAHL R. Sequential 2-acetylaminofluorene-phenobarbital exposure induces a cytosolic aldehyde dehydrogenase during rat hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis* 1982; 3: 533-538.
13. MCLEAN AEM, SMITH M, DRIVER HE. Liver tumours after single dose dimethylnitrosamine, low and high protein diet, and phenobarbitone. *Carcinogenesis* 1982; 3: 701-709.
14. TAPER HS, LANS M, DE GERLACHE J, FORT L, ROBERFOROID M. Morphological alterations and DNase deficiency in phenobarbital promotion of N-nitrosomorpholine initiated rat hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis* 1983; 4: 231-234.
15. TSUDA H, FUKUSHIMA S, IMAIDA K, KURATA Y, ITU N. Organ promoting effect of phenobarbital and saccharin in induction of thyroid, liver, and urinary bladder tumors in rats after initiation with N-nitrosomethylurea. *Cancer Res* 1983; 43: 3292-3296.
16. WARD JM, RICE JM, CREASIA D, LYNCH P, RIGGS C. Dissimilar patterns of promotion by di(2-ethylhexyl)phthalate and phenobarbital of hepatocellular neoplasia initiated by diethylnitrosamine in B6C3F₁ mice. *Carcinogenesis* 1983; 4: 1021-1029.
17. ITO W, MOORE MA, BANNASCH P. Modification of the development of N-nitrosomorpholine-induced hepatic lesions by 2-acetylaminofluorene, phenobarbital and 4,4'-diaminodiphenylmethane: a sequential histological and histochemical analysis. *Carcinogenesis* 1984; 5: 335-342.
18. KITAGAWA T, HINO O, NOMURA K, SUGANO H. Dose-response studies on promoting and anticarcinogenic effects of phenobarbital and DDT in the rat hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis* 1984; 5: 1654-1656.
19. WILLIAMS GM, FURUYA K. Distinction between liver neoplasm promoting and syncarcinogenic effects demonstrated by exposure to phenobarbital or diethylnitrosamine either before or after N-2-fluorenylacetylacetamide. *Carcinogenesis* 1984; 5: 171-174.
20. DIWAN BA, PALMER AE, OHSHIMA M, RICE JM. N-nitroso-W-methylurea initiation in multiple tissues for organ-specific tumor promotion in rats by phenobarbital. *JNCI* 1985; 75: 1099-1105.
21. DIWAN BA, RICE JM, OHSHIMA M, WARD JM. Interstrain differences in susceptibility to liver carcinogenesis initiated by N-nitrosodiethylamine and its promotion by phenobarbital in C57BL/6Ncr, C3H/HeNcrMTV- and DBA/2Ncr mice. *Carcinogenesis* 1986; 7: 215-220.
22. DRIVER HE, MCLEAN AEM. Dose-response relationship for phenobarbitone promotion of liver tumours initiated by single dose dimethylnitrosamine. *Br J Exp Pathol* 1986; 67: 131-139.
23. PERAINO C, CARNES BA, STEVENS FJ. Evidence for growth heterogeneity among foci with different phenotypes in the population of altered hepatocyte foci induced by a single neonatal treatment with carcinogen. *Carcinogenesis* 1986; 7: 191-192.
24. PEREIRA MA, KLAUNIG JE, HERREN-FREUND SL, RUCH RJ. Effect of phenobarbital on the development of liver tumors in juvenile and adult mice. *JNCI* 1986; 77: 449-452.
25. SOLT D, FARBER E. New principle for the analysis of chemical carcinogenesis. *Nature* 1976; 263: 701-703.
26. SOLT DB, MEDLIN A, FARBER E. Rapid emergence of carcinogen-induced hyperplastic lesions in a new model for the sequential analysis of liver carcinogenesis. *Am J Pathol* 1977; 88: 595-618.
27. OGAWA K, MEDLINE A, FARBER E. Sequential analysis of hepatic carcinogenesis: the comparative architecture of preneoplastic, malignant, prenatal, postnatal and regenerative liver. *Br J Cancer* 1979; 40: 782-790.
28. OGAWA K, MEDLINE A, FARBER E. Sequential analysis of hepatic carcinogenesis. A comparative study of the ultrastructure of preneoplastic, malignant, prenatal, postnatal and regenerating liver. *Lab Invest* 1979; 41: 22-35.
29. LEONARD TB, DENT JG, GRAINCHEV ME, LYGH T O, POPP JA. Comparison of hepatic carcinogen initiation-promotion systems. *Carcinogenesis* 1982; 3: 851-856.
30. HAYES MA, LEE G, TATEMATSU M, FARBER E. Influences of diethylnitrosamine on longevity of surrounding hepatocytes and progression of transplanted persistent nodules during phenobarbital promotion of hepatocarcinogenesis. *Int J Cancer* 1987; 40: 58-63.
31. GLAUERT HP, PITOT HC. Influence of dietary fat on the promotion of diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis in female rats. *Proc Soc Exp Biol Med* 1986; 181: 498-506.
32. FISCHER G, DOMINGO M, LOODER D, KATZ N, REINACHER M, EIGENBRODT E. Immunohistochemical demonstration of decreased L-pyruvate kinase in enzyme altered rat liver lesions produced by different carcinogens. *Virchows Arch B* 1987; 53: 359-364.
33. EVCES S, LINDAHL R. Changes in aldehyde dehydrogenase occurring during rat hepatocarcinogenesis induced by ethionine combined with dietary choline deficiency. *Cancer Res* 1986; 46: 3587-3592.
34. FARBER E, CAMERON R. The sequential analysis of cancer development. *ADV Cancer Res* 1980; 31: 125-226.
35. PITOT HC. The natural history of neoplasia. Newer insights into an old problem. *Am J Pathol* 1977; 89: 402-411.
36. FARBER E. The pathology experimental liver cell cancer. In: CAMERON HM, LINSSELL DA, WARWICK GP, eds. *Liver Cell Cancer*. Amsterdam: Elsevier, 1976: 243-277.
37. KEISER CH, LOMBARD LS, MONTALI RJ, STEWART HL, WILLIAMS GM. Histology typing of liver tumors of the rat. *JNCI* 1980(64): 1076-206.
38. WILLIAMS GM. The pathogenesis of rat liver cancer caused by chemical carcinogens. *Biochem Biophys Acta* 1980; 605: 167-189.
39. SELL S, LEFFERT HL. An evaluation of cellular lineages in the pathogenesis of experimental hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1982; 3: 77-86.
40. BANNASCH P. Sequential cellular changes during chemical carcinogenesis. *J Cancer Res Clin Oncol* 1934; 100: 11-22.
41. SUMNER IG, LODOLA A. Total cytochrome P-450, but not the major phenobarbitone or 3-methylcholantrene induced isoenzyme is differentially induced in the lobes the rat liver. *Biochem Pharmacol* 1987; 36: 391-393.
42. RABES H, HARTENSTEIN R, SCHOLZE P. Specific stages of cellular response to homeostatic control during diethylnitrosamine-induced liver carcinogenesis. *Experientia* 1970; 26: 1356-1359.
43. TSUDA H, MERA Y, SEKI K, AOKI T, FUKUSHIMA S, ITU N. Induction of tumors in the liver, urinary bladder, esophagus and forestomach by short-term treatment with different doses of N,N'-

- dibutyl nitrosamine in rats. *GANN* 1987; 78: 227-234.
44. KUEN H, PUGH TD, GOLDFARB S. Hepatocarcinogenesis in the mouse. *Am J Pathol* 1983; 112: 89-100.
45. Carr BT. Experimental chemical hepatocarcinogenesis: early membrane changes of significance for drug resistance. *J Cell Physiol (Suppl.)* 1986; 4: 59-63.
46. RABES HM. Development and growth of early preneoplastic lesions induced in the liver by chemical carcinogens. *J Cancer Res Clin Oncol* 1983; 106: 85-92.
47. CAMERON R, FARBER E. Some conclusions derived from a liver model for carcinogenesis. *Natl Cancer Inst Monogr* 1981; 58: 49-53.
48. RICHARDSON FC, BOUCHERON JA, DYROFF MC, POPP JA, SWENBERG JA. Biochemical and morphologic studies of heterogeneous lobe responses in hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis* 1986; 7: 247-251.