

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

**Paulo Wagner Pires**

**“Exposição crônica ao etanol na hepatocarcinogênese química em  
ratos: marcadores imunocitoquímicos e atividade de  
metaloproteinases -2 e -9”**

Este exemplar corresponde à redação final  
da tese defendida pelo(a) candidato (a)  
Paulo Wagner Pires  
Sérgio Luis Felisbino  
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto  
de Biologia para obtenção do  
Título de Mestre em Biologia  
Celular e Estrutural, na área de  
Biologia Celular.

**Orientador: Prof. Dr. Sérgio Luis Felisbino**

**Co-Orientador: Prof. Dr. Luis Fernando Barbisan**

**Campinas, 2007**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

|              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>P665e</b> | <p>Pires, Paulo Wagner<br/>Exposição crônica ao etanol na hepatocarcinogênese química em ratos: marcadores imunocitoquímicos e atividade de metaloproteínas –2 e -9 / Paulo Wagner Pires. – Campinas, SP: [s.n.], 2007.</p> <p>Orientadores: Sérgio Luis Felisbino, Luis Fernando Barbisan.<br/>Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. Fígado - Câncer. 2. Álcool. 3. Metaloproteínase. 4. Condições pré-cancerosas. I. Felisbino, Sérgio Luis. II. Barbisan, Luis Fernando. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.</p> |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

**Título em inglês:** Chronic ethanol intake in the rat chemical hepatocarcinogenesis: immunohistochemical markers and metalloproteinases –2 and –9 activity.

**Palavras-chave em inglês:** Liver - Cancer; Alcohol; Metalloproteinases; Precancerous conditions.

**Área de concentração:** Biologia Celular.

**Titulação:** Mestre em Biologia Celular e Estrutural.

**Banca examinadora:** Sérgio Luis Felisbino, Thomas Prates Ong, Francisco Eduardo Martinez.

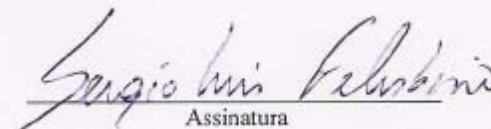
**Data da defesa:** 28/02/2007.

**Programa de Pós-Graduação:** Biologia Celular e Estrutural.

Campinas, 28 de fevereiro de 2007.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Sérgio Luís Felisbino (Orientador)

  
Assinatura

Prof. Dr. Thomas Prates Ong

  
Assinatura

Prof. Dr. Francisco Eduardo Martinez

  
Assinatura

Profa. Dra. Maria Aparecida Marchesan Rodrigues

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Profa. Dra. Noeme Sousa Rocha

\_\_\_\_\_  
Assinatura

*Dedico este trabalho aos meus pais  
“Belinha” e “Paulão” e meu irmão  
Caio, pelo eterno exemplo de  
integridade, solidariedade, perseverança  
e confiabilidade. Vocês são a luz do meu  
caminho, e iluminam todos os meus  
passos. Amarei-os todos os dias de  
minha vida.*

## **Agradecimentos**

Ao Prof. Dr. Sérgio Luis Felisbino e ao Prof. Dr. Luis Fernando Barbisan, pela louvável orientação e co-orientação neste trabalho, que em tanto contribuiu para meu crescimento profissional. Seus ensinamentos extrapolaram o âmbito acadêmico e científico e me engrandeceram também como pessoa. Meus passos futuros poderão ser dados graças ao solo que vocês me ensinaram e ajudaram a construir. A vocês, minha mais sincera gratidão!

Ao Prof. Dr. Thomas Prates Ong, pela análise prévia deste trabalho, e pelos questionamentos muito pertinentes em relação a ele. Também pelas sugestões e por ter me mostrado diferentes maneiras de analisar os meus resultados.

Ao Prof. Dr. Francisco Eduardo Martinez, pelas críticas construtivas e sugestões.

À Profa. Dra. Maria Aparecida Marchesan Rodrigues, a Profa. Tuca, pelas excelentes sugestões na redação do trabalho e auxílio na interpretação dos dados. Ainda, pela imensa ajuda em minha futura vida profissional.

À Profa. Dra. Noeme Souza Rocha, pela pertinente análise crítica do trabalho. Suas sugestões foram mais que bem-vindas para a redação final.

Ao Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, por ter me concedido um espaço em seu biotério para o desenvolvimento do experimento. Em especial agradeço aos funcionários PC e Glória pela ajuda ao longo dos cinco meses, e também pela agradável convivência durante todo esse tempo.

Ao Prof. Dr. Paulo Roberto Rodrigues Ramos, por ceder seu laboratório para a análise densitométrica dos géis de zimografia.

A todos os docentes do Departamento de Morfologia da Unesp que me auxiliaram a cumprir essa etapa. E também me ajudaram a crescer e me proporcionaram ter chegado a essa etapa.

À minha querida e mais que estimada Juliana Lessa Sacoman. A você deixo uma pequena oração: “Existem pessoas indescritíveis e momentos inesquecíveis!”. Perto de ti eu vivi, e ainda vivo, ambos.

Às minhas queridas amigas Rafaela Falaschi e Adriana Restelli. Não há muito a dizer, apenas que nem o tempo nem a distância separam amigos-irmãos.

Às amigas Flávia, Kelly e Fernanda Losi, por terem me aturado todo esse tempo, e pela amizade sincera e verdadeira, sempre me falando o que eu precisava ouvir, e sempre me apoiando.

Aos queridos amigos Pituta, Balada, Saúva, Apatita, Portera, Spuma e Kani. Nossas lembranças e convivência serão eternas.

Aos queridos amigos do Departamento: Justulin, Spike, Robson, Danillo, Danilo Jacu, Lucas, Gisele, Lívia, Sponja, Giletão, Glaura, Jeba, Rachel, e todos os outros que conviveram comigo ao longo desses longos anos de Botucatu. Muito obrigado por tudo.

Aos amigos Rafael, Ricardo e Rafael Bom, da minha querida cidade de Tietê, pela amizade de mais de dez anos, e pelo eterno apoio e pelas muitas risadas.

Aos queridos amigos da minha turma de Biologia Celular da Unicamp, em especial Eliana Lippe, pelas longas horas de estudo e conversas.

Aos professores do Departamento de Biologia Celular, IB-Unicamp, que tanto colaboraram para a minha formação.

A coordenadoria do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, pela competência e determinação empenhadas, e por terem feito desse programa um dos melhores do país.

A Liliam Alves Senne Panagio, pela eficiência com que cuida dos interesses do programa e dos alunos do programa de Pós-Graduação.

A Luciana, secretária do Departamento de Morfologia, pela eterna prontidão para ajudar e bom humor, e pelas conversas nos corredores do departamento.

Aos funcionários do Toxicam, pelo processamento do material histológico para análise.

Aos funcionários do Departamento de Morfologia pela ajuda em todos os momentos desse trabalho.

Aos amigos do curso da XXXVII turma de Ciências Biológicas - Integral da Unesp, Botucatu. “As flores já não crescem mais...”.

A minha família por todo o apoio e suporte, e pelos memoráveis encontros de final de semana, sempre com churrasco e risadas.

Aos animais de experimentação, que tão nobremente contribuíram com suas vidas para a realização desse trabalho.

Finalmente, a todos que, de forma direta ou indireta, contribuíram para a realização desse trabalho e dissertação de mestrado.

## SUMÁRIO

|                                                              |           |
|--------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Resumo</b>                                                | <b>1</b>  |
| <b>Abstract</b>                                              | <b>3</b>  |
| <b>1. Introdução</b>                                         | <b>4</b>  |
| <b>1.1 - Neoplasias hepáticas</b>                            | <b>4</b>  |
| <b>1.2 - Hepatocarcinogênese química</b>                     | <b>6</b>  |
| <b>1.3 - Etanol e hepatocarcinogênese</b>                    | <b>12</b> |
| <b>1.4 - Metaloproteinases, câncer e hepatocarcinogênese</b> | <b>18</b> |
| <b>2. Objetivos</b>                                          | <b>24</b> |
| <b>3. Artigo</b>                                             | <b>25</b> |
| <b>Abstract</b>                                              | <b>27</b> |
| <b>Introduction</b>                                          | <b>29</b> |
| <b>Material and Methods</b>                                  | <b>31</b> |
| <b>Results</b>                                               | <b>35</b> |
| <b>Discussion</b>                                            | <b>37</b> |
| <b>References</b>                                            | <b>40</b> |
| <b>Figures</b>                                               | <b>48</b> |
| <b>Tables</b>                                                | <b>52</b> |
| <b>4. Conclusões Gerais</b>                                  | <b>57</b> |
| <b>5. Referências da Introdução</b>                          | <b>58</b> |

## Resumo

O carcinoma hepatocelular (HCC) é a quinta neoplasia humana mais freqüente no mundo e o abuso crônico do álcool é um conhecido fator de risco, embora uma direta correlação entre o consumo de etanol e o desenvolvimento do HCC permaneça incerta. O presente estudo foi delineado para avaliar os efeitos promotores diferenciais da ingestão crônica de etanol sobre a remodelação e persistência de lesões pré-neoplásicas (LPN) positivas para a forma placentária da glutathione S-transferase (GST-P) e para o fator de crescimento e transformação-alfa (TGF- $\alpha$ ) no modelo de hepatocarcinogênese do hepatócito resistente. Noventa e quatro ratos Wistar machos com seis semanas de idade foram aleatoriamente distribuídos em cinco grupos experimentais: grupo G1, controle não-tratado com água e ração basal de livre acesso; G2, não tratado, ração equivalente ao consumo do grupo G3, e maltodextrina dissolvida em água (calorias equivalentes às fornecidas pelo etanol); G3, tratado com etanol a 5% (v/v) na água e ração basal de livre acesso; G4, dietilnitrosamina (DEN, 200 mg/kg de peso corpóreo) e 2-acetilaminofluoreno (2AAF) 200 ppm por três semanas, com ração basal equivalente ao consumo do grupo G5 e maltodextrina dissolvida na água; G5, DEN/2-AAF mais etanol 5% (v/v) e ração basal de livre acesso. Todos os animais foram submetidos à hepatectomia parcial de 70% na 3ª semana e eutanasiados na 12ª e 22ª semanas. Amostras de fígado foram coletadas e processadas histologicamente para detecção de lesões pré-neoplásicas e neoplásicas e contagem de hepatócitos em apoptose em cortes corados por hematoxilina/eosina, análise imunocitoquímica para antígeno nuclear de proliferação celular – PCNA, GST-P e TGF- $\alpha$  e para análise bioquímica de zimografia (atividade de gelatinases). Ao final do tratamento com o etanol, observou-se aumento da porcentagem da área hepática ocupada por LPN GST-P positivas do tipo persistente ( $P < 0,001$ ), do número de LPN TGF- $\alpha$ -positivas ( $P < 0,001$ ) e do número e multiplicidade de tumores hepáticos ( $P < 0,001$ ) em G5, quando comparado com G4. Além disso, observou-se um aumento do índice de proliferação pelo PCNA (fase-S), mas sem alteração nos índices de apoptose, em ambas LPN em remodelação ou persistente em G5 em relação ao grupo G4 ao final da 22ª semana ( $P < 0,001$ ), quando comparado com G4. A atividade de gelatinases (metaloproteinases –2 e –9) no fígado não foi alterada pelo tratamento com etanol. Os resultados sugerem que a

ingestão crônica de etanol promove o crescimento seletivo de LPN GST-P positivas do tipo persistente, especialmente, com associada à co-expressão de TGF- $\alpha$ , sem mudanças na atividade das gelatinases.

## Abstract

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the fifth most frequent cancer in the world and chronic ethanol abuse is a known risk factor, although a direct correlation between ethanol consumption and development of HCC remains uncertain. The present study was designed to evaluate the differential promoting effects of a long-term ethanol intake on remodeling/persistence of glutathione S-transferase placental form (GST-P) and transforming growth factor alpha (TGF- $\alpha$ ) positive preneoplastic lesions (PNL) using the resistant hepatocyte model. Six-week old male Wistar rats were randomly allocated into 5 experimental groups: G1 group, non-treated and water and chow food *ad libitum*; G2 group, non-treated and pair-fed chow food (restricted to match that of G2 group) and a maltodextrin solution in tap water (matched ethanol-derived calories); G3 group, drinking ethanol 5% ethanol (v/v) and solid food *ad libitum*; G4 group, diethylnitrosamine (DEN, 200 mg/kg body weight) plus 200 ppm of 2-acetylaminofluorene (2AAF) for 3 weeks and pair-fed chow food (restricted to match that of G5 group) and a MD solution in tap water (matched ethanol-derived calories); G5 group, DEN/2-AAF treatments plus ethanol 5% (v/v) in tap water and chow food *ad libitum*. All animals were subjected to 70% partial hepatectomy at week 3 and killed at weeks 12 and 22. Liver samples were collected for histology (preneoplastic and neoplastic lesions and apoptosis detection) and immunohistochemistry (proliferating cell nuclear antigen –PCNA, GST-P and TGF- $\alpha$ ) and gelatin zymography (metalloproteinases –2 and –9, also known as gelatinases, activities). At the end of ethanol treatment, there was an increase in percent of liver area occupied by persistent GST-P-positive PNL ( $P < 0.001$ ), number of TGF- $\alpha$ -positive PNL ( $P < 0.001$ ) and in number per group and multiplicity of liver tumors ( $P < 0.001$ ) in DEN/2-AAF-ethanol group (G5) when compared to respective control group (G4 – DEN/2-AAF). In addition, an increase in PCNA labeling indexes (S-phase), but not in the apoptosis rates, in both remodeling and persistent PNL was observed in DEN/2-AAF-ethanol group (G5) at 22 week ( $P < 0.001$ ), when compared to DEN/2-AAF group (G4). Liver gelatinases activities were not altered by ethanol treatment. The results suggest that chronic ethanol intake promotes a selective growth of persistent GST-P positive PNL, specially, with co-expression of TGF- $\alpha$ , without changes in gelatinases activities.

## **1. Introdução**

### **1.1 Neoplasias hepáticas**

O câncer é uma das mais preocupantes doenças do mundo moderno, isto por ser a segunda maior causa de morte nos países desenvolvidos e a terceira no Brasil, precedido apenas pelas doenças cardiovasculares, e no Brasil, também por óbitos devido a causas externas (Koifman and Koifman 2003). Desta forma, estima-se que uma em cada três pessoas no mundo desenvolverá algum tipo de neoplasia maligna no decorrer de sua vida, o que ratifica a importância da prevenção (Franks and Teich, 1999).

Acredita-se que o câncer se trata de um conjunto heterogêneo de doenças que têm como características comuns à proliferação celular descontrolada e a invasão de tecidos adjacentes, as quais são consequência de desvios no controle da homeostasia dos tecidos, que levam ao surgimento de células transformadas que possuem vantagem proliferativa sobre células normais (Robins and Cotran, 2005). O desenvolvimento da neoplasia, ou carcinogênese, está associado ao acúmulo de alterações no genoma de uma célula, que ocorrem espontaneamente ou por ação de agentes exógenos. Estes agentes podem ser cancerígenos químicos, físicos (energia radiante) e biológicos (vírus oncogênicos) (Robins and Cotran, 2005). Segundo estudos epidemiológicos, grande parte das neoplasias humanas estão relacionadas ao modo de vida, fatores ambientais, compostos naturais, infecções e agentes químicos industriais (Wogan et al., 2004). A exposição constante a esses agentes favorece o surgimento de mutações que podem ocasionar alterações na expressão de genes importantes nos processos de proliferação, diferenciação e morte celular, determinando o fenótipo maligno. Desta forma alguns autores sugerem que a carcinogênese é um processo no qual há acúmulo de lesões no DNA e progressiva instabilidade genética (Pitot and Dragan, 1991, Pitot, 1993; Yamasaki and Mironov, 2000).

Funcionalmente o fígado é composto de diferentes tipos celulares, sendo os principais os hepatócitos e as células ductais, bem como as encontradas no espaço de Disse (células de Ito ou estreladas), nos sinusóides (células endoteliais e de Kupffer) e no tecido conjuntivo do espaço porta (fibroblastos, linfócitos e polimorfonucleares) (Junqueira and Carneiro, 2004). Como funções o fígado tem a tarefa de manter a homeostase metabólica corporal, que inclui o processamento dos aminoácidos, carboidratos, lipídios e vitaminas,

síntese de proteínas séricas e metabolismo de hormônios e biotransformação de substâncias com conseqüente liberação no sangue e na bile de resíduos endógenos e de xenobióticos, sendo, portanto, alvo freqüente de várias doenças com conseqüências extensas, incluindo o câncer (Robins and Cotran, 2005).

As principais neoplasias primárias que acometem o fígado são o carcinoma hepatocelular (HCC, da sigla em inglês), oriundo de hepatócitos, e o colangiocarcinoma, oriundo do epitélio de ductos biliares (Robins and Cotran, 2005). O HCC é o quinto tipo mais comum de neoplasia maligna no mundo, sendo o tipo mais freqüente de câncer hepático primário, correspondendo a cerca de 80% do número de casos de neoplasias hepáticas (Marrero, 2005; Yu and Yuan, 2004; Wilner and Reuben, 2005; Motola-Kuba et al, 2006; Stickel et al, 2002). De maneira geral, o HCC apresenta maior incidência nos países asiáticos e na África, chegando a atingir taxas de 98,93 casos/100.000 habitantes por ano na Mongólia (Bosch et al, 2005), sendo essas áreas consideradas de alto-risco. Nas áreas consideradas de baixo-risco, como nos Estados Unidos e Europa Ocidental, a taxa de incidência é menor que 10 casos/100.000 habitantes por ano (Bosch et al, 2005). No Brasil, OHCC não consta entre os dez mais incidentes segundo dados obtidos dos Registros de Basew Populacional existentes (INCA, 2006).

Dentre os fatores de risco associados ao desenvolvimento do HCC, os mais comuns são os vírus de hepatite B e C (HBV e HCV, respectivamente), a ingestão crônica de etanol, o uso de tabaco, a ingestão de alimentos contaminados com aflatoxinas e uso de contraceptivos orais (Yu and Yuan, 2004; Marrero, 2005; Bosch et al, 2005; Motola-Kuba, 2006). Desses, o mais comum é a associação entre os vírus de hepatite B e C e o desenvolvimento de câncer hepático (Bosch et al, 2005), o que explica as elevadas taxas de incidência dessa neoplasia na Ásia e África, regiões endêmicas de contaminação pelo HBV (Yu and Yuan, 2004; Bosch et al, 2005; McKillop and Schrum, 2005). Ainda, nesses países, a ingestão de alimentos contaminados com aflatoxinas também exerce forte influência no aparecimento de neoplasias hepáticas (Bosch et al, 2005).

A infecção crônica por HCV é a responsável pelo aumento na taxa de incidência de HCC nos países da Europa Ocidental e nos Estados Unidos, em conseqüência de epidemia por HCV que atingiu esses países na década de 70 (Yu and Yuan, 2004; Bosch et al, 2005,

McKillop and Schrum, 2005). Nesses países ainda, o consumo crônico de etanol, associado ou não ao uso concomitante de tabaco, é um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de neoplasias hepáticas, dado o hábito freqüente de se ingerir bebidas alcoólicas nesses países (Pöschl and Seitz, 2004; McKillop and Schrum, 2005).

## **1.2 Hepatocarcinogênese química.**

A carcinogênese química é um processo de múltiplas etapas bem caracterizadas experimentalmente, incluindo as etapas de iniciação, promoção e progressão (Pitot and Dragan, 1991; Pitot, 1993; Pitot et al., 1996; Pitot, 2001). A iniciação consiste na ação de compostos genotóxicos sobre o DNA, provocando danos genéticos ainda compatíveis com a sobrevivência da célula e passíveis de serem transmitidos (Pitot and Dragan, 1991, Pitot, 1993; 2001). A fase de promoção caracteriza-se pela proliferação celular, que ocasiona expansão clonal de células iniciadas (Pitot and Dragan, 1991; Pitot, 1993, 2001). Neste estágio a célula acumula progressivamente mutações, agravando a instabilidade genética que pode culminar com a transformação maligna. Se o estímulo for removido em tempo hábil ou o tecido agredido restabelecer sua integridade, este processo pode ser interrompido ou revertido (Pitot and Dragan, 1991; Pitot, 1993; 2001). Na progressão ocorre o desenvolvimento da massa tumoral maligna e eventualmente metástases. Esse estágio está diretamente ligado à perda da estabilidade genética levando a aneuploidias, amplificações e deleções gênicas, enquanto a iniciação e a promoção não causam alterações genéticas abundantes (Pitot and Dragan, 1991; Pitot, 1993; 2001).

O processo de transformação celular ocorre durante o acúmulo progressivo de mutações. No mínimo duas classes de genes atuam em sintonia na célula normal e desempenham função importante no desenvolvimento de neoplasias: os proto-oncogenes/oncogenes e genes supressores tumorais. Alterações nestes genes são eventos essenciais no desenvolvimento das neoplasias e podem ser identificadas nas diferentes etapas da carcinogênese (Anderson et al, 1992; Stanley, 1995; Feo et al., 2000; Meza-Junco et al, 2006). Os proto-oncogenes regulam de forma positiva os processos de proliferação e diferenciação celulares, incluindo genes que pertencem às classes que codificam fatores de crescimento, receptores para os fatores de crescimento, proteínas reguladoras da transdução

de sinais e de fatores de transcrição (Anderson et al, 1992; Stanley, 1995; Feo et al., 2000; Meza-Junco et al, 2006). Entre os proto-oncogenes da classe dos fatores de crescimento temos o fator de crescimento e transformação alpha (TGF- $\alpha$ ).

O TGF- $\alpha$  é um membro da família de fatores de crescimento, entre os quais, inclui também o fator de crescimento epidérmico (Derynck, 1992; Hufnagl et al, 2001), que possui afinidade pelo receptor do fator de crescimento epidérmico promovendo sua atividade de tirosina quinase, e levando em última instância a síntese de DNA, transformação e diferenciação celulares (Derynck, 1988; Salomon et al, 1990; Thomas et al, 1992; Hufnagl et al, 2001).

O TGF- $\alpha$  é sintetizado na superfície celular na forma de um precursor, e pode existir sobre duas formas transmembrânicas, uma apresenta clivagem nos resíduos Ala-Val-Val da ligação N-terminal na seqüência dos 50 aminoácidos do TGF- $\alpha$ , enquanto que na outra ocorre uma N-glicosilação (Derynck, 1988). Portanto, os dois tipos são encontrados nas células que produzem o TGF- $\alpha$ .

O TGF- $\alpha$  secretado tem vários tamanhos, variando entre 5-20 Kda. A menor forma é constituída por um polipeptídeo de 50 aminoácidos dos quais seis são cisteínas, as quais se apresentam em distâncias definidas, incluindo três pontes de dissulfeto entre os resíduos de cisteína. Esta forma de 50 aminoácidos tem origem a partir da clivagem de um precursor transmembrânico de 160 aminoácidos (humano) de 159 aminoácidos (rato) e, denominado de pro-TGF- $\alpha$ , estes dois precursores tem aproximadamente 90% de similaridade (Lee et al, 1985; Derynck, 1988; Salomon et al, 1990). O pro-TGF- $\alpha$  humano está contido dentro de uma longa cadeia de mRNA de aproximadamente 4-5 a 4,8 kb, que contém seis éxons em um gene de 70-100 kb localizado no cromossomo 2 (2p11-13). O gene do pro-TGF- $\alpha$  de rato contém também seis éxons em um gene de 85 kb (Derynck, 1988; Salomon et al, 1990).

Como todo polipeptídeo este também apresenta uma porção inicial formada por uma região N-terminal e por uma porção final formada por uma região C-terminal. A região N-terminal apresenta 22 aminoácidos, os quais são clivados no precursor latente entre os resíduos de Ala e Leu, restando ainda 17 aminoácidos que serão N-glicosilados nos

resíduos de asparagina. Há também uma clivagem que marca a região C-terminal dos 50 aminoácidos que formarão a molécula de TGF- $\alpha$ , o qual é seguido de nove resíduos hidrofílicos e por uma longa sequência hidrofóbica (Derynck, 1988).

A importância da expressão de TGF- $\alpha$  vem sendo estudada em tecidos normais (embriogênese, crescimento e adulto) (Derynck, 1988; Salomon et al, 1990) e em tumores humanos (Watkins and Levine, 1991; Kaufmann et al, 1992), além de sua participação nos processos de carcinogênese química experimental (Burr et al, 1996; Moser et al, 1997; Deguchi et al, 1993; Livingstone et al, 1994; Calvisi and Thorgeirsson, 2005). A expressão aumentada de TGF- $\alpha$  tem sido observada em condições de proliferação celular aumentada, tais como, durante o desenvolvimento fetal e neonatal de vários órgãos, injúria química ou hepatectomia parcial e durante o processo de hepatocarcinogênese e carcinogênese renal (Kaufmann et al, 1992; Deguchi et al, 1993; Burr et al, 1996).

O TGF- $\alpha$  é um potente agente mitogênico para vários de tipos celulares. Além disso, isoladamente ou em combinação com outros fatores de crescimento pode induzir ou estimular o aumento de ancoragem independente em meio mínimo de algumas células normais e de células malignas (Derynck, 1988; Derynck, 1992). O aumento da produção e secreção de TGF- $\alpha$  tem sido observado em fibroblastos humanos e de roedores, células epiteliais transformadas por retrovírus oncogênicos (i.e., Ki and Ha-Ras, mos, fes, fms, e trk) por ativação celular de proto-oncogenes (Ha-ras, met, e trk), por papovavírus (SV40 e poliomavírus) e pela exposição a cancerígenos químicos como a N-nitrosometiluréia e o dimetilbenzoantraceno. Estes resultados sugerem que TGF- $\alpha$  possa funcionar como um intermediário autócrino no caminho de transformação destes oncogenes (Salomon et al, 1990). Células que secretam grandes quantidades de TGF- $\alpha$  são capazes de formar clones em meio mínimo (direto em passos autócrinos externos) e, em alguns casos, de formar fibrossarcomas quando inoculadas em camundongos *nude* (Salomon et al, 1990).

Alguns resultados obtidos de experimentos de transformação *in vitro* e de estudos *in vivo* com camundongos transgênicos indicam que a superexpressão de TGF- $\alpha$  é uma condição importante no processo de tumorigênese. Por ser um potente agente mitogênico, o TGF- $\alpha$  pode funcionar como um promotor de tumores de pele, fígado e mama,

provavelmente amplificando populações de células malignas. O mRNA e a proteína do TGF- $\alpha$  têm sido detectados em uma variedade de carcinomas e em um limitado número de sarcomas (Derynck, 1992; Salomon et al, 1990). Camundongos transgênicos para TGF- $\alpha$ , ou seja, que possuem alta expressão deste fator de crescimento, apresentam uma elevada incidência de tumores hepáticos (Tamano et al, 1994; Calvisi and Thorgeirsson, 2005).

Experimentalmente, o fígado tem se destacado no estudo das diferentes etapas da carcinogênese química experimental devido ao seu grande tamanho, sua relativa homogeneidade estrutural e, em particular, pela facilidade de indução e detecção de lesões pré-neoplásicas (Moore and Kitagawa, 1986; Farber and Sarma, 1987; Ito et al., 1988; Bannasch et al., 1989; Bannasch and Zerban, 1992). Por isso, tem sido utilizado como órgão-alvo em modelos de carcinogênese química de média duração *in vivo* (Ito et al., 1988; Hasegawa and Ito, 1992; Dragan et al., 1992). O câncer hepático induzido quimicamente em roedores ocorre através do desenvolvimento de alterações sequenciais caracterizadas inicialmente por focos de hepatócitos alterados fenotipicamente (FHA) e nódulos hiperplásicos (NH) e, por fim, pelo desenvolvimento de adenomas e do HCC. A demonstração de que estas lesões estão sequencialmente associadas, indicam que os FHA e NH representam etapas pré-neoplásicas, podendo ser considerados marcadores histológicos da futura neoplasia hepática (Bannasch, 1986; Farber and Sarma, 1987; Enzmann and Bannasch, 1987; Farber, 1988).

As lesões hepáticas pré-neoplásicas (LPN), que compreendem os FHAs (formato irregular e menor que um lóbulo hepático) e nódulos hiperplásicos (formato nodular e maior que um lóbulo hepático), são caracterizadas por ausência de compressão do tecido hepático normal subjacente. Sob coloração de rotina, HE, as LPN podem ser classificadas de acordo com a morfologia citoplasmática em claras, eosinofílicas basofílicas, tigróides, anfofílicas ou mistas (Bannasch et al., 1989; Bannasch and Zerban, 1992). Da mesma forma, as LPN foram identificadas em amostras coletadas de autópsias e biópsias de fígado e considerados como lesões precursoras de adenomas e hepatocarcinomas no homem (Bannasch et al., 1998; Su and Bannasch, 2003). A forma placentária da glutathione S-transferase (GST-P) foi estabelecida como um dos melhores marcadores de LPN no fígado de ratos (Satoh et al., 1985; Ito et al., 1989; Dragan et al., 1992) e a expressão do fator de crescimento e

transformação (TGF- $\alpha$ ) como marcador de progressão tumoral (Kaufmann et al., 1992; Moser et al., 1997).

A expressão da GST-P é normalmente baixa em hepatócitos fetais, adultos quiescentes ou em regeneração, mas elevado em LPN e neoplasias hepáticas (Satoh et al., 1985). O significado biológico da expressão aumentada da GST-P em lesões hepáticas pré-neoplásicas e neoplásicas não foi, ainda, totalmente estabelecido. No entanto, este fato parece ser importante nas etapas iniciais do processo de hepatocarcinogênese química, assim como na adaptação e crescimento seletivo de células iniciadas em ambiente químico tóxico (Satoh and Katayama, 2002). A GST-P, em contraste as outras famílias de GST, parece ser mais eficiente na neutralização de cancerígenos hidrossolúveis (fracos eletrófilos), e sua expressão é pouco sensível à inibição por ânions orgânicos ou induzida de forma inespecífica por compostos químicos e cancerígenos (Satoh et al., 1991; Satoh, 1998).

Vários estudos experimentais têm avaliado a expressão de TGF- $\alpha$  em LPN e em neoplasias hepáticas (adenomas e carcinomas) induzidas quimicamente, indicando que a expressão de TGF- $\alpha$  nas LPN pode representar uma etapa importante no processo de progressão da hepatocarcinogênese química (Kaufmann et al., 1992; Burr et al., 1996; Moser et al., 1997). Uma pequena proporção de LPN apresenta expressão de TGF- $\alpha$ , independentemente do modelo ou cancerígeno utilizado (Kaufmann et al., 1992; Burr et al., 1996; Moser et al., 1997). A maioria das LPN de células eosinofílicas e poucas LPN de células basofílicas mostram positividade para TGF- $\alpha$ , sendo que a maioria dos adenomas e carcinomas são fortemente TGF- $\alpha$  positivos, em especial os de origem basofílica (Kaufmann et al., 1992; Burr et al., 1996; Moser et al., 1997).

Dentre os modelos de hepatocarcinogênese química, o modelo do hepatócito resistente é um dos mais clássicos. O modelo original desenvolvido em ratos Fischer 344 machos consiste da administração de dose única intraperitoneal de 200 mg/kg de dietilnitrosamina (DEN) e administração de 0,02% de 2-acetilaminofluoreno (2-AAF) na dieta associada à hepatectomia parcial de 70% (HP), levando a indução rápida de LPN sem envolver processo fibrótico (Solt and Faber, 1976). A seleção/promoção de hepatócitos

iniciados pela DEN parece decorrer de sua maior resistência à toxicidade exercida pela 2-AAF, o que favorece o crescimento seletivo destas células frente ao estímulo proliferativo induzido pela perda de parênquima hepático após a HP (Sell and Dunsford, 1989; Tiwawech *et al.*, 1991). Ainda, o efeito anti-mitótico da 2-AAF sobre hepatócitos normais induz a ativação de células-tronco hepáticas (células ovas). As células ovas formam uma população de células imaturas e/ou em estágios diferentes de diferenciação com características antigênicas tanto de hepatócitos como de células do epitélio biliar. A proliferação de células ovas no modelo pode também ser seguida pela proliferação de células de Ito (células estelares, perisinusoidais ou armazenadora de vitamina A) (Evarts *et al.*, 1990). Entretanto, no modelo 2-AAF/HP o desenvolvimento do câncer hepático pode ocorrer também pela desdiferenciação de hepatócitos maduros (Gournay *et al.*, 2002).

Esse modelo experimental de hepatocarcinogênese química possibilita o estudo de dois tipos de LPN no fígado: as LPN em remodelação e as persistentes. As LPN em remodelação apresentam padrão heterogêneo de marcação pela GST-P, com bordas indistintas e até mesmo com células negativas no interior da lesão, ao passo que as LPN persistentes apresentam marcação homogênea e forte da GST-P, com bordas distinguíveis do parênquima hepático normal, delimitando bem a lesão e em geral sem a compressão do tecido adjacente (Tatematsu *et al.*, 1988; Schulte-Hermann, 1989, 1990). No fenômeno de remodelação ou reversão fenotípica, os hepatócitos iniciados, na ausência de um estímulo promotor contínuo, tendem a sofrer processo de “re-diferenciação” progressiva com perda na expressão de marcadores fenotípicos (como a enzima GST-P,  $\gamma$ -GGT, etc) com aquisição de um fenótipo normal (Tatematsu *et al.*, 1988; Schulte-Hermann, 1989, 1990; Feo *et al.*, 2006). Esse processo de remodelação fenotípica pode ocorrer principalmente nos estágios precoces do processo de hepatocarcinogênese (Enomoto and Farber, 1982; Moore *et al.*, 1983; Garcea *et al.*, 1989), atingindo um pico, em ratos F344 (altamente susceptíveis ao processo hepatocarcinogênico), em 15 semanas após a iniciação, sendo que em aproximadamente 32 semanas após iniciação, cerca de 85-90% dos focos são persistentes (precursores das lesões neoplásicas). Esse processo de reversão fenotípica está sujeito a controle genético com a inter-relação de vários genes de susceptibilidade ao

desenvolvimento de HCC localizados em locus do cromossomo 7 e 1 em ratos (De Miglio et al, 2003).

As LPN em remodelação não apresentam crescimento autônomo, e tendem a desaparecer, sendo que essa regressão ocorre por reversão fenotípica e indução de apoptose, enquanto as LPN persistentes apresentam crescimento autônomo com menores taxas de apoptose (Tatematsu et al, 1983, 1986; Feo et al, 2006). O que acarreta essa diferença de comportamento ainda não foi determinado, no entanto algumas hipóteses já foram levantadas, entre elas a de que as células em re-diferenciação apresentam mecanismos de vigília genômica mais eficientes, reduzindo o número de erros transcripcionais e com um aparato de reparo eficiente, o que reduz a instabilidade genômica nas lesões em desenvolvimento (Feo et al, 2006). A relação entre LPN em remodelação e persistentes tem sido muito utilizada para detectar o potencial quimiopreventivo de vários agentes como, por exemplo, do ácido retinóico,  $\beta$ -caroteno e S-adenosil-L-metionina (Gerbracht et al., 1993; Fonseca et al, 2005), bem como de agentes promotores como, por exemplo, o fenobarbital sódico e a nodularina (Schulte-Hermann, 1990; Song et al., 1999).

### **1.3 Etanol e hepatocarcinogênese**

O consumo crônico de etanol está relacionado diretamente com o desenvolvimento de neoplasias no trato aéreo-digestivo superior, principalmente a cavidade oral, faringe, laringe e esôfago, sendo que cerca de 25% a 80% desses tipos de cânceres podem ser atribuídos ao consumo crônico de etanol (Brown, 2005). Além desses órgãos, o desenvolvimento de neoplasias no fígado, intestino grosso, mama e pâncreas, estão relacionados também ao consumo excessivo de etanol (Brown, 2005; Schottenfeld, 1979, Boffeta and Hashibe, 2006). Vários estudos epidemiológicos, revisados em Poschl and Seitz, 2004, mostram forte correlação entre a ocorrência dessas neoplasias e a ingestão de álcool, sugerindo que o etanol é um fator de risco importante para o desenvolvimento dessas doenças.

No fígado, o consumo crônico de etanol pode levar a vários danos, entre eles a esteatose, a hepatite e a cirrose alcoólica, sendo esta última uma das causas mais frequentes de transplante hepático nos EUA e Europa (Willner and Reuben, 2005; Voight, 2005). A

esteatose hepática alcoólica caracteriza-se morfologicamente por acúmulo macrovesicular de gotículas lipídicas nos hepatócitos decorrentes de alterações no metabolismo de lipídeos, deslocando o núcleo da célula para a periferia, sem ocorrência inicial de fibrose. A hepatite alcoólica caracteriza-se morfologicamente por edema e necrose de hepatócitos, aparecimento de corpúsculos de Mallory (inclusões citoplasmáticas eosinofílicas presentes nos hepatócitos em degeneração), reação neutrofílica (neutrófilos permeando os hepatócitos em degeneração, sobretudo os que apresentam corpúsculos de Mallory) e fibrose sinusoidal, perivenular e, predominantemente, periportal. Por fim, advém a cirrose alcoólica hepática, onde se observa acúmulo cada vez maior de placas fibróticas ao redor de ilhas de parênquima hepático, sendo que o tecido hepático assume padrão macro e micronodular. A partir dessa etapa, observa-se a evolução para necrose isquêmica e obliterações fibrosas dos nódulos, que originam grandes áreas de tecido cicatricial pálido e resistente (Robbins and Cotran, 2005). A cirrose é considerada o fator de risco mais importante para o desenvolvimento do HCC (Tanaka et al, 2001; Stickel et al, 2002; Pöschl and Seitz, 2004; Marrero, 2005; McKillop and Schrum, 2005; Voight, 2005), podendo ser de etiologia viral (vírus da hepatite B e C), ou alcoólica (Stickel et al, 2002; Pöschl and Seitz, 2004; Marrero, 2005; Willner and Reuben, 2005).

O potencial hepatocarcinogênico do etanol para o homem ainda não está bem estabelecido e os dados experimentais em roedores são ainda inconsistentes, visto que existem diferenças marcantes nos delineamentos experimentais como dose, período de exposição, protocolos e etapas de hepatocarcinogênese e tipos de lesões avaliadas (pré ou neoplásicas). Alguns trabalhos indicam que o etanol pode atuar como agente co-cancerígeno (Stickel et al, 2002; Pöschl and Seitz, 2004; Yu and Yuan, 2004) ou promotor da hepatocarcinogênese química (Takada, 1986; Tanaka, 2001; Stickel et al, 2002; Karim et al, 2003; Pöschl and Seitz, 2004; Kushida et al, 2005), ou de ambas as formas, dependendo da fase e via de administração utilizada (Pöschl and Seitz, 2004).

O etanol pode apresentar efeito co-carcinogênico, pois seu consumo abusivo pode reduzir os níveis de substâncias antioxidantes, como as glutatônicas (redutases e transferases),  $\alpha$ -tocoferol e  $\beta$ -caroteno, seja pela perda de estoques teciduais, por inibição de síntese ou por destruição através da geração de radicais livres (Kock et al, 2004; Valko

et al, 2006), além de alterar a função de enzimas hepáticas antioxidantes, como a glutathione-S-transferase em decorrência da formação de adutos acetaldeído-enzima (Sultana et al, 2005). Não obstante, o consumo de etanol aumenta a expressão da enzima CYP2E1 em vários órgãos, em especial no fígado (Kushida et al, 2005; Tsutsumi et al, 1993; Stickel et al, 2002; Pöschl and Seitz, 2004; McKillop and Schrum, 2005). Essa enzima, pertencente à família do citocromo P450, é também responsável pela biotransformação de vários pró-cancerígenos em suas formas reativas, como, por exemplo, as aflatoxinas, nitrosaminas (entre eles a DEN) e hidrocarbonetos policíclicos (Tsutsumi et al, 1993; Stickel et al, 2002; Yu and Yuan, 2004; Pöschl and Seitz, 2004), o que aumenta o risco de formação de células iniciadas no organismo, uma vez que essas substâncias estão presentes no ar, são produzidas no preparo de carnes e no cozimento dos alimentos, no uso de cigarros e consumo de bebidas alcoólicas (Tsutsumi et al, 1993; Stickel et al, 2002; Karim et al, 2003; Pöschl and Seitz, 2004; McKillop and Schrum, 2005; Marrero, 2005; Kushida et al, 2005).

A CYP2E1 é uma das enzimas responsáveis pela biotransformação do etanol a acetaldeído, com conseqüente geração de radicais livres de oxigênio (RLO) (Stickel et al, 2002; Karim et al, 2003; Pöschl and Seitz, 2004; Donohue et al, 2005; McKillop and Schrum, 2005), sendo o estresse oxidativo um evento promotor da hepatocarcinogênese (Bunout, 1999; Karim et al, 2003; Stickel et al, 2002; Donohue et al, 2005; Petersen, 2005). Em estudo desenvolvido por Kushida et al (2005) foi observado que animais expostos por 16 semanas ao etanol numa concentração de 20% apresentam elevada expressão hepática da enzima CYP2E1 em sua forma protéica. O acetaldeído gerado da metabolização do etanol apresenta atividade mutagênica e carcinogênica, uma vez que reage com o DNA nuclear, formando adutos e inibindo o sistema de reparo de DNA, induzindo aberrações cromossômicas e estimulando a apoptose e outros danos celulares (Stickel et al, 2002; Pöschl and Seitz, 2004; Brooks e Theruvathu, 2005).

Quando administrado nas concentrações entre 5% a 20%, após o período de iniciação da hepatocarcinogênese química pela DEN, o álcool atua como potente agente promotor, aumentando o número e tamanho de focos de hepatócitos GST-P positivos (Tanaka et al, 2001; Karim et al, 2003) e a incidência e multiplicidade de adenomas e hepatocarcinomas em ratos (Takada et al, 1986; Tsutsumi et al, 1993; Tanaka et al, 2001;

Karim et al, 2003; Kushida et al, 2005). Entretanto, alguns trabalhos são controversos em relação ao efeito de períodos de abstenção de etanol sobre o efeito promotor deste químico (Tanaka et al, 2001; Karim et al, 2003). Desta forma, o aumento de proliferação celular associado ao uso contínuo de etanol é um evento fundamental para sua atividade promotora, mas que em períodos longos de abstenção a associação entre redução na produção de RLO e diminuição de proliferação celular podem frear o desenvolvimento das lesões pré-neoplásicas (Karim et al, 2003).

Os possíveis modos de ação através dos quais o etanol exerce efeito promotor da hepatocarcinogênese são: 1) aumento nas taxa de proliferação celular (Takada et al, 1986; Tanaka et al, 2001; Karim et al, 2003; Kushida et al, 2005), indução de estresse oxidativo (Bunout, 1999; Stickel et al, 2002; Pöschl and Seitz, 2004; McKillop and Schrum, 2005; Karim et al, 2003; Petersen, 2005; Donohue et al, 2005) e formação de acetaldeído (Stickel et al, 2002; Pöschl and Seitz, 2004; McKillop and Schrum, 2005). A formação de um ambiente oxidativo, seja por produção de RLO ou por radicais livres de nitrogênio (RLN), promove alteração no potencial redox da célula, que pode levar a danos no DNA e outros componentes celulares, como lipídeos e proteínas (Valko et al, 2006; Niemelä, 2001) e, eventualmente, à formação de células iniciadas.

O consumo abusivo de etanol é, ainda, uma das maiores causa de má nutrição entre adultos nos países desenvolvidos (Bunout, 1999). A ingestão de etanol causa deficiências nutricionais tais como alterações no metabolismo lipídico, protéico, de carboidratos, de vitaminas, principalmente a vitamina A e do complexo B, e micronutrientes, como o zinco (Bunout, 1999). Essas deficiências contribuem para a hepatocarcinogênese, uma vez que o consumo excessivo de etanol promove hipometilação do DNA, aumentando a necessidade de ingestão de doadores de metil, cuja absorção fica comprometida após o consumo de etanol (Stickel et al, 2002; Pöschl and Seitz, 2004). Não obstante, o aldeído causa destruição do folato na célula, o que inibe a transmetilação de genes envolvidos no processo de hepatocarcinogênese (Pöschl and Seitz, 2004) e, além disso, a deficiência de lipotrofos pode levar ao desenvolvimento de esteatose, fibrose e cirrose hepática, com participação de células ovais e de Ito (Tee et al, 1994; Besshi et al, 2004).

Os dados experimentais sobre o efeito do etanol em experimentos de hepatocarcinogênese são controversos, provavelmente devido aos diferentes protocolos utilizados, tempo de exposição ao etanol, concentração e linhagem de animal utilizada. No entanto, há um consenso na literatura de que o etanol *per se* não apresenta atividade hepatocancerígena, atuando como um agente promotor ou co-carcinógeno. Radike et al (1981) mostraram efeito potencializador do etanol a 5% na hepatocarcinogênese induzida por cloreto de vinil em ratos Sprague-Dawley. Esses autores mostraram também redução no período de sobrevida dos animais e no período de latência dessa doença. Nesse mesmo ano, outro trabalho com ratos Sprague-Dawley mostrou que o etanol a 25%, quando administrado concomitantemente com a DEN, apresentou efeitos inibidores da carcinogênese hepática (Habs and Schmähl, 1981). Em ambos os estudos, o etanol foi administrado concomitantemente com o agente iniciador, sendo que no primeiro a exposição ao álcool iniciou-se quatro semanas antes da exposição ao cloreto de vinil.

Vários outros trabalhos indicam efeito promotor do etanol na hepatocarcinogênese. Driver and McLean (1986) demonstraram que uma concentração de etanol a 5% apresenta o mesmo potencial promotor que uma concentração elevada de fenobarbital (1000 µg/ml), um potente indutor enzimático e agente promotor da hepatocarcinogênese, após iniciação pela DEN. Nesse mesmo ano, um outro grupo de pesquisadores mostrou o potencial indutor de lesões neoplásicas do etanol a 20% após iniciação com a DEN e estímulo proliferativo promovido pela hepatectomia parcial de 70% em ratos Wistar (Takada et al, 1986), fato não observado por Cho and Jang (1993), quando administraram etanol a 10% após a iniciação com DEN em neonatos de ratos Sprague-Dawley. O etanol mostrou atividade promotora não apenas em experimentos cujo agente iniciador foi a DEN, mas também com a aflatoxina B1 (AFB1), 3'-metil-4-dimetilaminobenzeno (3-Me-DAB), N-nitrosomorfolina (NNM), estrógenos sintéticos e progestágenos, 2-amino-3,8-dimetilimidazo[4,5-f]quinoxalina (MeIQx) e dieta deficiente em colina e suplementada com etionina (CDE).

Quando administrado após a iniciação com AFB1, o etanol a 10% aumentou o número e a área de FHA ferro-negativos em ratos machos ACI/N (Tanaka et al, 1989). Quando administrado concomitantemente com etinilestradiol e acetato de noretidrona, o etanol a 10% promoveu aumento da proliferação celular relacionada com a cinética dos receptores de

estrógenos, tanto nuclear quanto citoplasmático e aceleração da formação de picos de adutos de DNA induzidos pelos agentes iniciadores, resultando em aumento na incidência de lesões pré-neoplásicas e neoplásicas no fígado tanto de machos quanto de fêmeas de ratos Wistar JLC (Yamagiwa et al, 1991; Yamagiwa et al, 1994). Em animais iniciados com a NNM o etanol (1 g/kg) apresentou atividade promotora quando administrado intra-peritonealmente concomitantemente com a droga iniciadora e não após o período de iniciação de ratos Sprague-Dawley (Tatsuta et al, 1997). De maneira contrária, quando o etanol a 5% foi administrado em dieta líquida antes do período de iniciação com a dimetilnitrosamina (DMN) houve redução na incidência de HCC e também aumento na sobrevivência de fêmeas da linhagem Sprague-Dawley, o que sugere aumento no período de latência dessa doença (Teschke et al, 1983). Karim et al (2003) expuseram machos F344/DuCrj a uma dieta líquida contendo etanol a 5% por um período de 16 semanas, após período de iniciação de 8 semanas com MeIQx e observaram aumento no número de FHA GST-P positivos concomitantemente com um aumento nos índices de proliferação celular e dano oxidativo no material genético dos hepatócitos desses animais (Karim et al, 2003). Um outro experimento utilizando a mesma droga iniciadora pelo mesmo período de iniciação em ratos F344/DuCrj mostrou novamente que o etanol exerce atividade promotora, mas somente em concentrações acima de 3%, estabelecendo, portanto, um limiar de ação para baixas doses de consumo de etanol (Kushida et al, 2005). Em administração concomitante com a MeIQx (10 e 100 ppm), a exposição ao etanol a 10% acarretou em aumento no número de FHA GST-P positivos em ratos F344 (Wanibuchi et al, 2006).

Misslbeck et al. (1984) administraram etanol a 5% em dieta líquida em combinação com uma variedade de dietas contendo altos ou baixos teores de gordura, após iniciação com AFB1, e observaram efeito promotor da hepatocarcinogênese química apenas quando o etanol foi administrado com dieta contendo altos teores de gordura a machos da linhagem Sprague-Dawley. Ainda, o etanol a 5% em dieta líquida mostrou efeito promotor da hepatocarcinogênese química em ratos Wistar quando administrado antes da introdução de dieta deficiente em colina e suplementada com etionina (dieta CDE). Nessas condições o etanol acelerou o aparecimento de alterações celulares associadas aos estágios iniciais da hepatocarcinogênese nesse modelo (Croager et al, 2003).

#### 1.4 Metaloproteínases, câncer e hepatocarcinogênese

As metaloproteínases da matriz (MMP, *sigla do termo em inglês*) pertencem a uma família de proteases extracelulares que regulam ou participam de processos fisiológicos e de desenvolvimento normais no organismo (Vu and Werb, 2000). Entretanto, a expressão anormal das MMPs contribui para vários processos patológicos, tais como artrite reumatóide e osteoartrite, enfisema pulmonar, crescimento e metástase tumoral, entre outros (Kähäri and Saarialho-Kere, 1999; Nagase and Woessner, 1999; Zeng et al, 1999; Duffy et al., 2000; Wang, 2003).

As MMPs são um grupo de endopeptidases dependentes de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$  com especificidade para diferentes substratos, podendo degradar lamininas, fibronectinas, elastinas, colágenos, proteoglicanas e outros componentes da matriz extracelular (MEC) (Duffy et al., 2000; Hoekstra et al., 2001). São sintetizadas e secretadas na forma inativa (pró-peptidases latentes) sendo, então, ativadas em pH neutro pela remoção de um pró-peptídeo N-terminal (forma ativa) por membros da família das MMPs ou por outras proteases (Vu and Werb, 2000). As MMPs são inibidas por uma família de inibidores teciduais de metaloproteínases, os chamados TIMPs (*sigla do termo em inglês*), que são inibidores endógenos. Há também os inibidores exógenos de MMPs, os chamados MMPis (*sigla do termo em inglês*), como por exemplo o batimastat (inibidor de MMP-1, 2, 3, 7, 9) e o marimastat (inibidor de MMP-1, 2, 3, 7, 9, 12) (Hoekstra et al., 2001).

Atualmente são conhecidos mais de 25 membros da família das MMPs. De uma forma geral, as MMPs são agrupadas em decorrência das similaridades estruturais e funcionais (ação sobre substratos específicos) em cinco subgrupos gerais (Jones and Walker, 1997; Duffy et al., 2000; Määtä et al., 2000) 1) as Colagenases, que degradam o colágeno fibrilar intersticial, e incluem a MMP-1 (colagenase intersticial) que degrada preferencialmente colágeno tipo III, a MMP-8 (colagenase de neutrófilo) que tem preferência pelo colágeno tipo I e a MMP-13 (colagenase-3) pelo colágeno tipo II; 2) as Gelatinases A e B (MMP-2 e MMP-9 respectivamente), que possuem alta atividade na clivagem do colágeno desnaturado e degradam o colágeno tipo IV da membrana basal (MB), assumindo, portanto, uma importante função na invasão tumoral (Woessner, 1994; Wang, 2003); 3) as Estromelisinases (STR), que compreendem quatro membros: STR-1

(MMP-3), STR-2 (MMP-10), STR-3 (MMP-11) e a matrilisina (MMP-7 ou PUMP-1 – supostamente a metaloproteinase 1). Com exceção da STR-3, as estromelisinases têm especificidade para uma grande variedade de substratos, sendo capazes de degradar fibronectinas, lamininas, elastinas, proteoglicanas e colágenos; 4) as MMPs associadas a membrana (MT-MMPs, *sigla do termo em inglês*) que são moléculas transmembrana; e 5) as MMPs que não se enquadram nos grupos anteriores.

Para que ocorram os processos de invasão e metástase tumoral é necessário que haja perda das propriedades de adesão celular, degradação da MB e da MEC (tumores de células epiteliais), levando a invasão do tecido conjuntivo subjacente. Desta forma a ativação local de MMPs, que estão intimamente relacionadas a esses processos, são importantes visto que: 1) As MMPs são detectadas em uma grande variedade de tumores; 2) Os níveis de um membro específico da família das MMPs, ou mesmo um número de diferentes membros da família das MMPs já detectados tendem a aumentar com a progressão da neoplasia; 3) MMPs podem ser produzidas pelas próprias células tumorais ou em resposta ao tumor (células estromais); 4) as MMPs mais frequentemente expressas nos tumores são as MMP-2, 3, 7, 9, 11, 13 e 14. Assim, o desequilíbrio entre a ativação e a inibição da atividade das MMPs pode favorecer o desenvolvimento do câncer por facilitar a invasão de células tumorais pela MEC. (Jones and Walker, 1997; Aparicio et al, 1999; Stamenkovic, 2000; Foda and Zucker, 2001; Hoekstra et al, 2001; Cui, 2004).

Pesquisadores têm demonstrado que existe uma correlação positiva entre a progressão das neoplasias e a expressão de vários membros das MMPs, tanto em tumores humanos como de animais de experimentação (Zeng, 1999; Stamenkovic, 2000; Foda and Zucker, 2001). Entretanto, técnicas de hibridização *in situ* mostraram que muitas MMPs não são produzidas por células tumorais, mas sim por células estromais adjacentes. Isto sugere que células tumorais produzem um fator estimulador (indutor de metaloproteinase da matriz, EMMPRIN) que induz fibroblastos estromais a produzirem as MMPs. Além disso, muitos fatores de crescimento, hormônios, oncogenes e promotores de tumor têm papel importante na regulação da transcrição de genes das MMPs (Hoekstra et al., 2001).

O crescimento expansivo das neoplasias também depende do estroma para formação de novos vasos (angiogênese). A angiogênese é um processo complexo que requer

degradação da MB e dos vasos sanguíneos circundantes da MEC; quimiotaxia de células endoteliais para estímulo angiogênico; proliferação de células endoteliais; e remodelação da MB com a formação de novos vasos sanguíneos. Essa remodelação é resultado da atividade das MMPs. As células endoteliais produzem MMP-1, 2, 3 e MT-MMP, sendo que as principais proteases envolvidas no processo de angiogênese tumoral são a MMP-2 e a MT-MMP (Foda and Zucker, 2001). Portanto, as MMPs promovem a angiogênese por dois mecanismos básicos: pela degradação de barreiras permitindo a invasão de células endoteliais; e pela liberação de fatores que promovem ou mantêm o fenótipo angiogênico (Duffy et al., 2000). O aumento da expressão das MMPs pode conferir às células tumorais a capacidade de invasão de tecidos vizinhos e, paradoxalmente, levar a produção de moléculas que limitam esse crescimento, como a produção de fatores anti-angiogênicos, tais como a angiostatina (clivagem do plasminogênio) e endostatina (clivagem do colágeno XVIII) (Vu and Werb, 2000).

A perda na regulação da maquinaria enzimática envolvida na degradação da MEC é um fator importante em processos patológicos associados ao fígado, como fibrose, cirrose e desenvolvimento de neoplasias (Kossakowska et al, 1998; Thérét et al, 1998). Os componentes da MEC mais importantes no fígado normal são colágenos dos tipos I, III, IV, V e VI, em especial o I e III que correspondem a cerca de 80% do colágeno total presente. Há também componentes não-colágenos, como fibronectina, laminina, tenascina, undulina e entactina. Estes componentes, no fígado normal, estão em constante remodelação pela ação de enzimas como as MMPs e de seus inibidores teciduais, os TIMPs (Kossakowska et al, 1998; Gagliano et al, 2002).

Altos níveis de atividade de MMPs no fígado têm sido relatados em processos patológicos tais como cirrose e fibrose, e no desenvolvimento de neoplasias, como o carcinoma hepatocelular e colangiocarcinomas. As principais MMPs encontradas em alta expressão em estudos *in vitro* e *in vivo* com tecido hepático alterado (patológico) são MMP-2, MMP-9, MMP-1 (colagenase intersticial de humanos), MMP-13 (colagenase intersticial de ratos), MMP-3, MMP-7 e MMP-14 (MT1-MMP) (Iredale et al, 1998; Kossakowska et al, 1998; Arthur, 2000; Maata et al, 2000; Kaneyoshi et al, 2001; Nomura et al, 2001; Ishii et al, 2003; Sun et al, 2003; Wang et al, 2003a,b; Cui, 2004).

As MMPs 2 e 9 são conhecidas como gelatinases tipo IV, pois degradam o colágeno IV da MB, e são as mais estudadas nos processos patológicos do fígado. A pró-MMP-2 é ativada por um complexo formado pela MT1-MMP e TIMP-2. Ativa, a MMP-2 é capaz de ativar a pró-MMP-9, que também pode ser ativada por plasmina, estromelisina 1 (MMP-3) e calicreína tecidual (Fridman et al, 1995; Arthur, 2000; Kaneyoshi et al, 2001, Olaso et al, 2001).

O fator de crescimento e transformação  $\beta$  (TGF- $\beta$ , sigla do termo em inglês), também está envolvido na regulação da atividade de MMPs e TIMPs. Em adição, estudos sugerem que a interação entre células tumorais e estromais hepáticas também participam da ativação das MMPs, influenciando o crescimento e a invasão tumoral (Matrisian, 1990; Stetler-Stevenson et al, 1990; Kaneyoshi et al, 2001).

Como salientado anteriormente, a exposição crônica ao etanol é um fator de risco para o desenvolvimento de doenças hepáticas, como a fibrose, a cirrose e o câncer (Robbins and Cotran, 2005; Tanaka et al, 2001; Stickel et al, 2002; Pöschl and Seitz, 2004; Marrero, 2005; McKillop and Schrum, 2005). A fibrose hepática é tida como um processo patológico dinâmico, onde há constante degradação e deposição de elementos da MEC (Arthur, 2000; Leon et al, 2005; Senties-Gomes et al, 2005, Preaux et al, 2002), com intensa participação de MMPs (Arthur, 2000; León et al, 2005; Senties-Gomes et al, 2005; Preaux et al, 2002; Kim et al, 2000; Knittel et al, 2000; Murphy, 2002; Schuppan et al, 2001).

Em fígados normais, a MEC é organizada de duas maneiras: uma MEC densa, mais fibrilar, localizada nos espaços porta, ao redor das veias centro-lobulares e na cápsula que envolve o órgão, e uma MEC que forma uma rede de baixa densidade localizada nos espaços perisinusoidais, ou espaço de Disse, que separa os hepatócitos do endotélio sinusoidal, que é composta por colágeno tipo IV, laminina e proteoglicanas (Arthur, 2000; Schuppan et al, 2001). Nesse espaço ficam localizadas, ainda, as células de Ito ou estreladas hepáticas (HSC, da sigla em inglês), as células de Kupffer e as células endoteliais dos capilares fenestrados (Schuppan et al, 2001).

As HSC são células que, em estado quiescente, ou não-ativado, acumulam vitamina A (Friedman, 2004; Arthur, 2000; Wang et al, 2004; Murphy et al, 2002). Quando o parênquima hepático normal sofre algum tipo de injúria, há um desequilíbrio nos

mecanismos de degradação/reposição da MEC (Knittel et al, 2000; Friedman, 2004; Senties-Gómez et al, 2005), com depósito de colágeno fibrilar do tipo I e III no espaço de Disse, alterando o microambiente que envolve as HSC e ativando-as (Arthur, 2000; León et al, 2005; Senties-Gomes et al, 2005; Preaux et al, 2002; Kim et al, 2000; Knittel et al, 2000; Murphy, 2002; Schuppan et al, 2001). Essas células adquirem então um fenótipo proliferativo, contrátil, migratório, fibrogênico e inflamatório (Friedman, 2004) e, juntamente com miofibroblastos também ativados dessa região, passam a sintetizar um amplo espectro de moléculas da MEC, principalmente colágenos fibrilares, MMPs e TIMPs (Arthur, 2000; León et al, 2005; Senties-Gomes et al, 2005; Preaux et al, 2002; Kim et al, 2000; Knittel et al, 2000; Murphy, 2002; Schuppan et al, 2001), sendo que as MMPs parecem estar relacionadas com os estágios mais precoces das lesões fibróticas (Arthur, 2000; Kim et al., 2000) e as TIMPs mais relacionadas com a progressão/manutenção dessas lesões (Xu et al, 2004).

Vários trabalhos mostram aumento na atividade de MMP-2 e 9 no início das lesões fibróticas ou em exposições agudas ao etanol, levando a degradação das membranas basais dos capilares sinusóides e também de resíduos de fibrilas de colágeno reduzindo, assim, as janelas dos capilares (Knittel et al, 2000; Kim et al, 2000; Arthur, 2000). Durante a manutenção da fibrose hepática as HSC e miofibroblastos são mantidos ativados pela inibição direta da atividade das MMPs pela TIMP-1 (cuja expressão se mantém alta ao longo de todo período de evolução da fibrose hepática), o que acarreta aumento na deposição de MEC densa, inibindo a apoptose das HSC (Murphy et al, 2002). Durante a reversão da fibrose ocorre apoptose das HSC e miofibroblastos, através da diminuição na expressão e atividade de TIMP-1, resultando em ativação de MMPs presentes na MEC, como a MMP-1, 2, 3 e 9 (Arthur et al, 2000; Preaux et al, 2002; Friedman, 2004). Nesse contexto, convém destacar que o etanol *per se* é capaz de promover ativação das HSC (Xu et al., 2004).

Existem poucos relatos na literatura que esclarecem o papel do etanol na ativação de MMPs durante o processo de carcinogênese. Aye et al (2004) demonstraram que o etanol aumenta a ativação de MMP-2 produzida por fibroblastos da linhagem HS68 e CCD1056SK *in vitro*, e, utilizando-se desse meio de cultura condicionado para avaliar o

potencial invasivo das linhagens BT474, SKBR-3 e HB2<sup>ErbB2</sup> de células de câncer de mama, observaram aumento no potencial metastático dessas células, fato corroborado por outro trabalho mais recente desse mesmo grupo (Ke et al., 2006). Etique et al (2006) demonstraram aumento na ativação de MMP-2 e 9 presentes no meio de cultura de células da linhagem MCF-7 (uma linhagem oriunda de neoplasia de mama) que foram expostas ao etanol.

Baseado nos estudos relacionados ao potencial carcinogênico do etanol, elaboramos uma investigação experimental para elucidar o efeito promotor do etanol, utilizando-se de marcadores de lesões pré-neoplásicas e de progressão tumoral no fígado e analisando duas vias principais: aumento da atividade de metaloproteinases e do fator de crescimento e transformação  $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ).

## **2. Objetivos**

Caracterizar o potencial promotor do etanol no modelo de hepatocarcinogênese do hepatócito resistente, analisando seu efeito diferencial sobre o crescimento/desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas.

### **3. Artigo**

Pires PW, Furtado KS, Justulin Jr LA, Barbisan LF, Felisbino SL. Chronic Ethanol Intake Promotes the Development of Liver Preneoplastic Lesions with Persistent Phenotype in Rats. A ser submetido para publicação na revista *Cancer Science*.

**Chronic Ethanol Intake Promotes the Development of Liver Preneoplastic Lesions  
with Persistent Phenotype in Rats.**

Paulo Wagner Pires<sup>1,2</sup>, Kelly Silva Furtado<sup>2</sup>, Luis Antonio Justullin Jr.<sup>1,2</sup>, Luis Fernando Barbisan<sup>2</sup>, Sergio Luis Felisbino<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> UNICAMP, Institute of Cell Biology, Department of Cell Biology, 13083-950 Campinas, SP, Brazil

<sup>2</sup> UNESP São Paulo State University, Institute of Biosciences, Department of Morphology, 18618-000 Botucatu, SP, Brazil.

*Running title:* Ethanol and hepatocarcinogenesis

\*Address correspondence to:

Sergio Luis Felisbino, Ph.D.

Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (UNESP), 18618-000 Botucatu, SP, Brazil.

Telephone/Fax-simile: 55-14-38116264

E-mail: felisbin@ibb.unesp.br

## Abstract

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the fifth most frequent cancer in the world and chronic ethanol abuse is a known risk factor, although a direct correlation between ethanol consumption and development of HCC remains uncertain. The present study was designed to evaluate the differential promoting effects of the long-term ethanol intake on remodeling/persistence of glutathione S-transferase placental form (GST-P) and transforming growth factor alpha (TGF- $\alpha$ ) positive preneoplastic lesions (PNL) using a resistant hepatocyte model. Male Wistar rats six week-old were randomly allocated into 5 experimental groups: G1 group, non-treated and water and chow *ad libitum*; G2- non-treated and pair-fed chow (restricted to match that of G3 group) and a maltodextrin (MD) solution in tap water (matched ethanol-derived calories); G3 group, drinking ethanol 5% ethanol (v/v) and chow *ad libitum*; G4- Diethylnitrosamine (DEN, 200 mg/kg body weight) plus 200 ppm of 2-acetylaminofluorene (2AAF) for 3 weeks and pair-fed chow (restricted to match that of G5 group) and a MD solution in tap water (matched ethanol-derived calories); G5- DEN/2-AAF treatments and ethanol 5% and chow *ad libitum*. All animals were subjected to 70% partial hepatectomy at week 3 and killed at weeks 12 or 22. Liver samples were collected for histology (preneoplastic and neoplastic lesions and apoptosis detection) and immunohistochemistry (proliferating cell nuclear antigen –PCNA, GST-P and TGF- $\alpha$ ) and zymography (metalloproteinases –2 and –9, also known as gelatinases, activities). At the end of ethanol treatment, there was an increase in percent of liver area occupied by persistent GST-P-positive PNL ( $P < 0.001$ ), number of TGF- $\alpha$ -positive PNL ( $P < 0.001$ ) and in number per group and multiplicity of liver tumors ( $P < 0.001$ ) in DEN/2-AAF-ethanol group (G5) when compared to DEN/2-AAF group (G4). In addition, an increase in PCNA labeling indices (S-phase), but not in the apoptosis rates, in both remodeling and persistent PNL, was observed in DEN/2-AAF-ethanol group (G5) at 22 week ( $P < 0.001$ ), when compared to the DEN/2-AAF group (G4). Liver gelatinase activities were not altered by ethanol treatment. The results suggest that chronic ethanol intake promotes a selective growth of persistent GST-P positive PNL, especially with co-expression of TGF- $\alpha$ . Further studies should be done to provide better information on the

mechanisms of the modifying effect of chronic ethanol intake on development of persistent PNL.

*Keywords:* Resistant hepatocyte model, Ethanol, Remodeling and persistent GST-P-positive preneoplastic lesions; TGF- $\alpha$  positive preneoplastic lesions, Rat liver carcinogenesis, Metalloproteinases 2 and 9.

## Introduction

Ethanol consumption is a widespread habit, especially in the western world, with important familial and socioeconomic impacts. Although many studies show that chronic ethanol abuse increases the risk for developing cancer of the upper aerial-digestive tract (i.e., oro-pharynx, hypopharynx, larynx and oesophagus), breast, liver, pancreas and colorectal cancer<sup>1-3</sup>, the exact mechanism(s) of ethanol-associated carcinogenesis still remain obscure, since this abuse drug *per se* is not considered a carcinogen<sup>4,5</sup>.

The hepatocellular carcinoma (HCC) is the fifth more frequent cancer worldwide, with incidence rising in the Western countries<sup>6,7</sup>, being that after diagnosis, long-term survival outcomes for patients with HCC remain poor owing to the insidious nature of the disease, leading to late detection and limiting the treatments available<sup>6-8</sup>. Alcohol is a known risk factor for the development of HCC, mainly in patients infected with the hepatitis C virus (HCV) who drink heavily are likely to suffer more severe liver injury, promoting disease progression to cirrhosis and increasing their risk for liver cancer<sup>5,9</sup>. However, a direct correlation between alcohol consumption and the development of HCC in humans remain inconclusive.

In the liver, the hepatocyte represents the major site of ethanol metabolism through three main pathways, including ADH, inducible CYP2E1 and catalase enzymes, that leads to the generation of acetaldehyde and reactive oxygen and nitrogen species<sup>10,11</sup>. These free radicals can bind rapidly to cell constituents, including DNA, lipids and proteins, raising mainly oxidative DNA damage, lipid peroxidation, protein impairment and depletion of many antioxidant systems including reductions in glutathione, vitamin E and phosphatidylcholine<sup>2,11,12</sup>. In addition, acetaldehyde is highly toxic, mutagenic and carcinogenic<sup>13,14</sup> and the induction of CYP2E1 has been demonstrated to enhance the activation of many xenobiotics, among them the diethylnitrosamine (DEN), a known genotoxic and carcinogen agent to the liver that are present in many alcoholic beverages, tobacco smoke, and the dieting compounds<sup>15</sup>.

Recently, some studies have demonstrated that ethanol and its metabolites including acetaldehyde induce or inhibit, respectively, the production of matrix metalloproteinases (MMPs) or the tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) in different cells types.

Ethanol and acetaldehyde directly promote the production of transforming growth factor beta-1 (TGF $\beta$ -1) and several extracellular matrix (ECM) constituents and also alters TIMPs/MMPs regulation by directly activate hepatic stellate cells (HSCs) inducing liver fibrosis<sup>16,17</sup>. In fact, acetaldehyde is a fibrotic agent for the liver that induces the expression of type-1 and type-3 collagen genes in HSCs<sup>17</sup>. Also, in fibrotic liver there is a increased expression of TIMPs, which plays an important role in the regulation of MMPs activities, including the gelatinases (MMP-2 and 9), which degrade basal membrane compounds, a important step in the liver carcinogenesis that leads to the vascular invasion and formation of metastasis<sup>18,19</sup>. Fibroblastic HS68 and CCD1056SK and mammary MCF-7 cell lines exposed to ethanol produces MMPs (gelatinases or MMP-2 and 9)<sup>20,21</sup>.

In rodent liver carcinogenesis assay, there are some controversy concerning in whether ethanol is a promoting agent or exerts co-carcinogenic effects, or neither<sup>1,5</sup>. Some studies showed a promoting action of ethanol<sup>22-27</sup>, while others showed no-addictive effect, or even an inhibition of hepatocarcinogenesis<sup>28,29</sup>. The disagreements between these data are due probably by differences in experimental designs: different initiators used, moment of administration of ethanol (i.e., before, during or after the administration of the hepatocarcinogen), preneoplasia and neoplasia end-points, and the strain of the rodent<sup>1</sup>.

Among the experimental models of hepatocarcinogenesis, the resistant hepatocyte (RH) model is one of the most classical to the study of the different steps of the rat hepatocarcinogenesis. In this model, DEN-initiating agent induces single cells and small foci of putative initiated hepatocytes that then are promoted with 2-acetylaminofluorene (2-AAF) associated with a 70% partial hepatectomy (PH)<sup>30</sup>. 2-AAF is a mito-inhibitor to normal hepatocytes but does not inhibit a subpopulation of the glutathione S-transferase (GST-P)-positive hepatocytes. The PH acts as a mitotic stimulus that results in the rapid growth of this subpopulation into larger GST-positive lesions, while the surrounding liver remains quiescent. Some lesions eventually develop into grossly visible nodules and, over months, tumours arise<sup>31,32</sup>.

Two phenomena that occur following the promotional stimulus of the RH protocol are remodeling (or redifferentiation) of lesions and the proliferation and migration of oval cells. Hepatocytes within remodeling lesions loose expression of GST-P and other enzymes

common to preneoplastic liver lesions (PNL) and also trend to revert to a more normal liver phenotype<sup>32,33</sup>. Remodeling occurs in most lesions over the months following promotion and persistent PNL that remain are one site within which HCC can develop<sup>34</sup>. Differential effects of promoting and anti-promoting liver agents and susceptibility of rat strains on remodeling and persistence of PNL have been investigated by others<sup>35-36</sup>.

Although the hepatopromoting potential of ethanol has been reported by others, little is known about the potential of this abuse drug in inducing the selective growth of putative preneoplastic lesions. Thus, the present study was developed to verify the differential ethanol-promoting activity on remodeling and persistent PNL that expresses GST-P and transforming growth factor alpha (TGF- $\alpha$ ) markers. In addition, we evaluated the selective growth of PNL (PCNA and apoptosis) and gelatinases activity (MMP-2 and MMP-9), which are important markers of tumour progression, between non-treated and ethanol-treated groups.

## Material and Methods

**Animals and treatments.** Four-week-old male Wistar rats were obtained from Multidisciplinary Center for Biological Investigation (CEMIB, UNICAMP Campinas- SP, Brazil) and housed in polypropylene cages (five animals/cage) covered with metallic grids in a room maintained at  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ,  $55 \pm 10\%$  humidity and with a 12-hr light-dark cycle. They were fed commercial Purina chow (LABINA, Paulínia, SP, Brazil) and water *ad libitum* for a 2-week acclimation period. Then, the animals were randomly divided into five experimental groups (Figure 1): G1 group- non-treated and water and chow *ad libitum*; G2- non-treated and pair-fed chow (restricted to match that of G3 group) and a maltodextrin (MD, Neo-Nutri, Poços de Caldas-MG, Brazil) solution in tap water (matched ethanol-derived calories); G3 group- drinking ethanol 5% (v/v) (Dinâmica Química, São Paulo-SP, Brazil) and chow *ad libitum*; G4- Diethylnitrosamine (DEN, Sigma-Aldrich Co., St. Louis Mo, USA) (200 mg/kg body weight) plus 200 ppm of 2-acetylaminofluorene (2AAF, Sigma-Aldrich Co., St. Louis Mo, USA) for 3 weeks and pair-fed chow (restricted to match

that of G5 group) and a MD solution in tap water (matched ethanol-derived calories); G5-DEN/2-AAF treatments plus 5% ethanol in tap water and chow *ad libitum*. All animals were subjected to 70% partial hepatectomy at week 3 and killed at weeks 12 (5 weeks after the beginning of ethanol exposure) or 22 (15 weeks after the beginning of ethanol administration). Food and liquid intake were measured daily to calculate the volume of solid food and of isocaloric MD solution offered to the pair fed groups. Body weight was measured twice a week during all experiment. The protocols used were consistent with the Ethical Principles for Animal Research adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and approved by the Bioscience Institute/UNESP Ethical Committee for Animal Research (CEEa).

**Tissue processing, histology and immunohistochemical procedures.** At necropsy, the liver were removed, weight, and fixed in 10% phosphate-buffered formalin by 24 hours. After fixation, representative samples of liver and right and left kidneys were processed for paraffin embedding. The paraffin blocks were cut into 5- $\mu$ m-thick sections and stained with hematoxylin-eosin (HE) for histopathological and apoptosis analysis and by immunohistochemistry for GST-P, PCNA or TGF- $\alpha$  antigen (serially sectioned liver slides).

Hepatic preneoplastic lesions (PNL, Figure 2-D) were classified as altered foci of hepatocytes (AFH) or as hyperplastic nodules (HN) with clear/eosinophilic, amphophilic, basophilic, tigroid cell foci and mixed cell types, according to the previously published criteria<sup>37</sup>. AFH were considered PNL smaller than one hepatic lobule, whereas HN comprised spherical PNL larger than one or more hepatic lobules, both PNL without no visible compression of surrounding liver. Liver tumors were classified as hepatocellular adenomas (HA) or HCC, according to the previously published criteria<sup>37</sup>.

PCNA, GST-P and TGF- $\alpha$  expression were immunohistochemically detected as follow described<sup>38,39</sup>. Briefly, deparaffinated 5- $\mu$ m-thick serial liver sections on poly-L-lysine coated slides were treated with 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in phosphate-buffered saline for 15 min, nonfat milk for 60 min, anti-PCNA (clone PC10, 1:200 dilution), anti-GST-P (Medical and Biological Laboratories Co., Tokyo, Japan, clone 311, 1:1000 dilution) clone or anti-TGF-

$\alpha$  (Oncogene Science Inc., New York, USA, clone Ab-2, 1:200 dilution) antibodies, biotinylated horse anti mouse IgG or anti-goat IgG antibodies (Dako Corporation, Carpinterie, CA, USA, 1:200 dilution) for 60 min, and streptavidin-biotin-peroxidase solution (TissuGnost ABC Kit, Merck, Darmstadt, Germany, 1:1:50 dilution). A pretreatment with 0.25% trypsin (Sigma-Aldrich Co., St. Louis Mo, USA) for 15 minutes and 0.05% saponin (Calbiochem, La Jolla, CA, USA) solution for 30 minutes were done in slides submitted to TGF- $\alpha$  immunoreactivity<sup>39</sup>. Chromogen color development was accomplished with 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB, Sigma-Aldrich Co., St. Louis Mo, USA) as the substrate to demonstrate the sites of peroxidase binding. The slides were counterstained with Harris's hematoxin (GST-P and TGF- $\alpha$  analysis) or with HE (PCNA analysis).

**Analysis of PNL expressing GST-P and TGF- $\alpha$  phenotypes.** PNL expressing uniformly (distinct borders) and non-uniformly (indistinct borders) staining for GST-P were classified as the persistent (Figure 2-A) and remodeling (Figure 2-B) phenotype<sup>40</sup>. GST-P-positive PNL larger than 0.20 mm in diameter were measured using a Nikon photomicroscope (Microphot-FXA, Tokyo, Japan) connected to a KS-300 apparatus (Kontron Elektronik, Munich, Germany). The data were expressed as number (PNL/cm<sup>2</sup>), mean size (mm<sup>2</sup>) and area (mm<sup>2</sup> /cm<sup>2</sup>) of all (persistent + remodeling), persistent or remodeling GST-P positive PNL

The number of the clearly discernible TGF- $\alpha$  positive PNL (Figure 2-C) per liver area (cm<sup>2</sup>) was also analyzed with the aid of the KS-300 system, as indicated above. Differential expression of TGF- $\alpha$  in persistent and remodeling PNL was also analyzed. TGF- $\alpha$  positive PNL were also expressed as a percentage of persistent and remodeling or all (persistent + remodeling) GST-P positive PNL.

**Cell proliferating and apoptosis analysis.** The liver PCNA labeling indices (PCNA LI %) and apoptoses indices (AI%) for each animal of G1 to G3 groups were estimated by counting the number of immunohistochemically labeled hepatocytes nuclei (S-Phase) per

total number of counted hepatocytes ( $\sim 1000$ )  $\times 100$ . The PCNA LI% AI% indices within persistent (Figure 3-A, C, E) or remodeling PNL (Figure 3-B, D, F) and HA were also determined ( $\sim 200$  hepatocytes per LPN and 500 hepatocytes per adenoma). Criteria for identification and quantification of hepatocytes in apoptosis were taken from the literature<sup>41</sup>.

**Gelatin zymography for MMP2 and MMP9.** Frozen samples of liver ( $\sim 200$  mg) were mechanically homogenized in 50 mM Tris buffer pH 7,5 plus 0,25% triton-X 100 with a Polytron for 30 sec at 4 °C, centrifuged and protein extracted on supernatant was quantified by Bradford methods<sup>42</sup>. Aliquots (30  $\mu$ g protein) from liver extracts (non-altered, with PNL and adenoma) were subjected to electrophoresis in gelatin containing polyacrylamide (8% acrylamide) gels in the presence of SDS under non-reducing conditions. The gelatin substrate was present at 0.1% final concentration in the gel. The gels (0.75 mm thick) were electrophoresed for 2 h at 100 V, 4°C, in a Bio-Rad MiniProtean II system (Bio-Rad Laboratories, Inc., Richmond, CA, USA). Following electrophoresis, the gels were washed by gentle shaking at room temperature with 2.5% Triton X-100 (two changes) for 1 h. The gels were incubated overnight (18–20 h) in 50 mM Tris-HCl (pH 8.4) containing 5 mM CaCl<sub>2</sub> and 1  $\mu$ M ZnCl<sub>2</sub> at 37°C. Following incubation, the gels were stained by Coomassie Blue. Areas of proteolysis appeared as clear zones against a blue background. Molecular mass determinations were made with reference to prestained protein standards (Bio-Rad Laboratories, Inc.) coelectrophoresed into the gels. The IOD spectrophotometry was determined.

**Statistical analysis.** Statistical analysis was made using the Jandel Sigma Stat Software (Jandel Corporation, San Rafael, CA, USA). The body weight, body weight-gain, absolute and relative liver and kidney weights, PCNA-labeling and apoptosis indices and lesion multiplicity were analyzed by Student's t test or Mann-Whitney test. The incidence of different types of PNL and neoplastic lesions was examined using  $\chi^2$  test or the Fischer exact test. The data was considered statistically significant when  $p < 0.05$ .

## Results

**General findings and biochemical analysis of ALT and AST.** A total of 8 rats (six rats in group 4 and two rats in group 5) died during selection treatment with 2-AAF. At the end of the weeks 12 and 22, no differences in the mean final body weight and body-weight gain were observed between the experimental groups and the absolute and relative liver weights from DEN/2-AAF-treated groups (G4 and G5) were higher than non-initiated/promoted groups (G1 to G3) but without statistic significance (Table 1). The ethanol consumption was similar (~1.05 g/rat/day) between the ethanol-treated groups (G3 and G5).

At the end of week 22, ALT and AST values were higher in DEN/2-AAF/ethanol-treated group (G5) than the others groups but without statistic significance (Table 1).

**Histological findings.** At weeks 12 and 22, liver histological analysis showed that the non-initiated/promoted groups (G1 to G3) did not develop any PNL or neoplastic lesions. Similarly, liver lesions indicative of hepatic injury (such as steatosis, fibrosis and inflammation) were not observed in ethanol-treated animals (G3) (data not shown).

Data for incidence of PNL and liver tumors (i.e., hepatocellular adenomas and hepatocellular carcinomas) in DEN/2-AAF-treated groups (G4 and G5) are shown in Table 2. Treatment with 5% ethanol did not alter the incidences of the different types of PNL or neoplastic lesions identified by HE staining at the end of weeks 12 and 22. In contrast, the mean number/group and multiplicity of liver tumors were increased in DEN/2-AAF/ethanol-treated group (G5) in relation to DEN/2-AAF-treated group (G4) only at week 22 ( $P < 0.001$ ) (Table 2).

**Analysis of GST-P and TGF- $\alpha$  positive PNL.** The non-initiated/promoted groups (G1 to G3) did not develop any GST-P positive PNL above the established cut-off value (0.20 mm in diameter) at the end of 12 and 22 weeks. In the week 12, number and percentage of the liver area occupied by total (persistent + remodeling), persistent or remodeling GST-P positive PNL GST-P positive PNL was not influenced by treatment with 5% ethanol. However at week 22, the number of remodeling PNL per area of liver was lower in DEN/2-AAF/ethanol-treated group (G5) when compared to DEN/2-AAF-treated group (G4) ( $P < 0.001$ ). The mean size and the percentage of the liver area occupied by total (persistent + remodeling) and persistent GST-P positive PNL was higher in DEN/2-AAF/ethanol-treated group (G5) in relation to DEN/2-AAF-treated group (G4) ( $P = 0.002$ ,  $P < 0.038$  and  $P < 0.001$ , respectively). The data from GST-P analysis of the groups submitted to the resistant hepatocyte protocol is summarized in table 3.

The results of immunostaining of liver lesions using serial sections at weeks 12 and 22 showed that the TGF- $\alpha$  immunoreactivity was more intense and uniform in HCA and HCC and often heterogeneous in most PNL, and was more frequently observed in persistent (~95%) rather than in remodeling (~5%) GST-P positive PNL (Figure 2) in both DEN/2-AAF and DEN/2-AAF/ethanol-treated groups (G4 and G5). At week 22, an increase in number of TGF- $\alpha$  positive PNL per liver area was observed in DEN/2-AAF/ethanol-treated group (G5) when compared to DEN/2-AAF-treated group (G4) (Table 3), especially in persistent PNL GST-P phenotype ( $P < 0.001$ ). The data from GST-P analysis of the groups submitted to the resistant hepatocyte protocol is summarized in table 4.

**PCNA labeling and apoptosis analysis in PNL.** The differential influence of ethanol treatment on cell proliferation and apoptosis in remodeling and persistent PNL are shown in Table 5. In the week 12, there were no differences in the PCNA LI%, and apoptosis within the remodeling and persistent PNL between the DEN/2-AAF- treated groups (G4 and G5). On the other hand, it was observed an increase in PCNA LI% in both remodeling and persistent PNL in DEN/2-AAF/etanol group (G5) when compared to G4 ( $p < 0.001$ ), but not the apoptosis rates, at week 22. Liver PCNA LI% and AI% were not altered by 5% ethanol or MD intake (data not shown).

**MMP-2 and 9 activities.** The activity of the gelatinases (MMP2 and 9) was measured by gelatin zymography at weeks 12 and 22 (Figure 4). Liver gelatinases activities were not significantly altered by ethanol treatment in both non-treated and DEN/2-AAF-treated groups.

## Discussion

The present study showed that long-term administration of 5% ethanol promotes chemically-induced rat hepatocarcinogenesis in the resistant hepatocyte model, as previously observed in others protocols of rat hepatocarcinogenesis<sup>24-26,43-45</sup>. Kushida et al (2005) have determined a threshold level for the promoting effect of ethanol on rat hepatocarcinogenesis. These authors observed that in doses below 3% ethanol has a weak or even no effect in the promotion of the preneoplastic GST-P-positive liver foci. In this work a dose of 5% ethanol was used, in agreement with the threshold previously proposed<sup>26</sup>.

The tumor-promoting potential of ethanol involves the expansion of persistent GST-P and TGF- $\alpha$  positive PNL with enhancement of cell proliferation, but without alters apoptosis rates or gelatinases activities. Also, ethanol accelerates the process of progression of hepatocarcinogenesis by enhancing the number and multiplicity of neoplastic lesions in the liver of the DEN/2-AAF-treated animals.

The remodeling, or phenotypic reversion, or redifferentiation, is a process where the initiated hepatocyte gradually loose the expression of some preneoplastic markers, i.e. GST-P,  $\gamma$ -GGT, and return to a normal phenotype<sup>46</sup>. This process occurs naturally in the earlier stages of the multistep process of chemically-induced hepatocarcinogenesis and is under genetic control<sup>46,47</sup>. The quantitative relation between remodeling and persistence of PNL in the liver of rats subjected to the resistant hepatocyte model has been used to determine the chemopreventive and/or promoter potential of various agents<sup>35,36</sup>. GST-P is a stable marker of putative preneoplastic foci of altered hepatocytes and hepatic nodules described in various rat hepatocarcinogenesis studies<sup>48-49</sup>. A typical and characteristic of PNL is their capability of expressing one of two options: spontaneously remodeling to a normal appearing liver by the majority (95–98%) or persistence with cell proliferation and evolution to cancer by a small minority (2–5%)<sup>32,33</sup> since that remodeling PNL exhibit a progressive loss of the expression of GST-P protein and mRNA<sup>47</sup>. Persistence of PNL could indicate a block in remodeling by differentiation or apoptosis and appears to be linked to enhanced evolution of hepatocellular carcinomas<sup>46,47</sup>. The present work indicate that the chronic intake of 5% ethanol increased the percent liver area occupied by total (persistent and remodeling) and persistent GST-P positive PNL associated with a enhance in the medium size of this lesions, also reducing the number of remodeling GST-P positive PNL. Taken together, these data show that ethanol has a selective effect on expansion of persistent PNL, as the classical tumor promoter phenobarbital and nafenopin<sup>48</sup>, inhibiting or delaying the normal process of remodeling and enhancing the growth (size) of the persistent lesions, which are thought to be the precursors of HCC.

During the process of hepatocarcinogenesis, several alterations in the expression of proto-oncogenes occur, including an increase in the expression and release of TGF- $\alpha$ <sup>49</sup>. TGF- $\alpha$  is a growth factor that activates the protein tyrosine kinase activity of the epidermal growth factor receptor, and its overexpression have also been linked to tumorigenesis in transgenic mice, which were found to present a high incidence of spontaneous mammary gland, pancreas and liver malignant tumors<sup>50,51</sup>. Immunohistochemical expression of TGF- $\alpha$  has been demonstrated in rodent hepatic preneoplastic and neoplastic lesions<sup>52,53</sup>, although a few GST-P positive PNL (~10%) presents immunoreactivity for this growth

factor<sup>54</sup>. Double positive GST-P and TGF- $\alpha$  positive PNL showed higher cell proliferation than TGF- $\alpha$  negative positive PNL and could represents a potential lesion to progress to liver tumors with action of a promoter stimulus such as phenobarbital<sup>54</sup>. A selective increase of TGF- $\alpha$  positive PNL by ethanol treatment could indicate an important promoting effect since that this growth factor may act as a potent hepatocyte mitogen to progression of liver carcinogenesis<sup>52,55-57</sup>. Also, a higher concentration of TGF- $\alpha$  was found in the culture media from ethanol-exposed HepG2 cells (used as model for alcoholic liver disease), suggesting that this growth factor plays an important role in the liver regeneration induced by ethanol exposure<sup>58</sup>. The present study shows that chronic ethanol intake enhanced the number of TGF- $\alpha$  positive PNL per area of liver, and that this enhancement mainly occurred in persistent PNL, suggesting that these lesions have a growth advantage over the remodeling PNL. One interesting fact is that almost 95% of the total TGF- $\alpha$  positive PNL had persistent phenotype, which corroborates the hypothesis that this growth factor is an important peptide to the tumor progression in this experimental carcinogenesis model, since that persistent PNL are more likely to evolve to hepatocellular carcinomas<sup>46</sup>.

The quantitative analysis of cell proliferation and apoptosis during liver carcinogenesis may be an important factor to evaluate the potential modifying influence of chemicals. The increase in cell proliferation and apoptosis in preneoplastic and neoplastic lesions during the multi-steps of liver carcinogenesis has been described by others<sup>35,36,38,39</sup>. One of the mechanisms proposed by which ethanol exerts a liver promoting effect is by enhancement of cell proliferation associated to DNA oxidative damage in chronically exposure male F344/DuCrj and Fischer 344 rats, mainly in relation to dosing<sup>25,26</sup>. In fact, oxidative stress and reactive oxygen species are linked to toxic responses associated with major organs by ethanol biotransformation<sup>59</sup>. In addition, the cessation of long-term ethanol administration also increases the cell proliferation and acts as an additional stimulus to growth of PNL in rat hepatocarcinogenesis<sup>60</sup>. Here we present that chronic ethanol intake enhanced cell proliferation in both remodeling and persistent PNL without significantly affect on the apoptotic index of this lesions.

Matrix metalloproteinases (MMPs) are a family of proteases that degrades components from the extracellular matrix, and are involved in many physiological and pathological

processes<sup>61</sup>. The processes of angiogenesis, tumor invasion of the adjacent normal parenchyma, and metastasis, are dependent on the activity of MMP-2 and 9, the so called gelatinases, which degrade the basement membrane<sup>62</sup>. Those MMPs are produced in the liver by the activated hepatic stellate cells (HSCs)<sup>63</sup>, which are cells located in the liver perisinusoidal spaces, in response of extracellular matrix changes caused by many agents, including ethanol, since that stimulates the deposition of fibrillar collagens (collagen I and III) in the space of Disse<sup>64</sup>. Also, the ethanol itself is a stimulating agent for the release of activated gelatinases in cultured fibroblasts and breast cancer cells<sup>20,21</sup>. However, no ethanol-induced hepatic change on the activity of these proteases was observed in both animals from G1, G2 and G3 or submitted to the resistant hepatocyte model (G4 and G5). This result must be associated with the fact that, in this experiment, was not observed any histological alterations in the liver stroma.

In conclusion, the present study showed that long-term administration of ethanol promotes rat hepatocarcinogenesis, selecting the lesions with a persistent phenotype that express TGF- $\alpha$  concomitantly. Therefore, the potential promoting of ethanol is similar to the classical promoter phenobarbital to both GST-P and TGF-  $\alpha$  markers.

### **Acknowledgements**

This study was supported by CAPES, FAPESP and TOXICAM. Pires, P.W. was recipient of a fellowship from CAPES.

### **References**

1. Pöschl G, Seitz HK. Alcohol and cancer. *Alcohol & alcoholism*, 2004; 39: 155-65.
2. Bofetta P, Hashibe M. Alcohol and cancer. *Lancet Oncol*, 2006; 7: 149-56
3. Brown LM, Epidemiology of alcohol-associated cancers. *Alcohol*, 2005; 35: 161-68.
4. Holmberg B, Ekstrom T. The effects of long-term oral administration of ethanol on Sprague-Dawley rats – a condensed report. *Toxicology*, 1995; 96: 133-45.
5. Stickel F, Schuppan D, Hahn EG, Seitz HK. Cocarcinogenic effects of alcohol in hepatocarcinogenesis. *Gut*, 2002; 51: 132-39.
6. Marrero J. Hepatocellular carcinoma. *Curr Opin Gastroenterol*, 2005; 21: 308-12.

7. Motola-Kuba D, Zamora-Valdés D, Uribe M, Méndez-Sánchez N. Hepatocellular carcinoma. An overview. *Ann Hepatol*, 2006; 5: 16–24.
8. Bosch FX, Ribes J, Cléries R, Díaz M. Epidemiology of hepatocellular carcinoma. *Clin Liver Dis*, 2005; 9: 191-211.
9. Voight MD. Alcohol in hepatocellular cancer. *Clin Liver Dis*, 2005; 9: 151-69.
10. Vidal F, Toda R, Gutiérrez C et al. Influence of chronic alcohol abuse and liver disease on hepatic aldehyde dehydrogenase activity. *Alcohol*, 1998; 15: 3-8
11. Lieber CS, Abittan CS. Pharmacology and metabolism of alcohol, including its metabolics effects and interactions with other drugs. *Clin Dermatol*, 1999; 17: 365-79.
12. Bunout D. Nutritional and metabolic effects of alcoholism: their relationship with alcoholic liver disease. *Nutrition*, 1999; 15:583-89.
13. Brooks TJ, Theruvathu JA. DNA adducts from acetaldehyde: implications for alcohol-related carcinogenesis. *Alcohol*, 2005; 35: 187-93
14. Niemellä O. Distribution of ethanol-induced protein adducts in vivo: relationship to tissue injury. *Free Radical Biology & Medicine*, 2001; 31: 1533-38.
15. Verna L, Whysner J, Williams GM. N-Nitrosodiethylamine mechanistic data and risk assessment: bioactivation, DNA-Adduct formation, mutagenicity and tumor initiation. *Pharmacol Ther*, 1996; 71: 57-81
16. Friedman SL. Mechanisms of disease: mechanisms of hepatic fibrosis and therapeutic implication. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*, 2004; 1: 98-105.
17. Purohit V, Brenner DA. Mechanisms of alcohol-induced hepatic fibrosis: a summary of the Ron Thurman symposium. *Hepatology*, 2006; 43: 872-78.
18. Westermarck J, Kähäri VM. Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumour invasion. *The FASEB Journal*, 1999; 13: 781-92.
19. Foda HD, Zucker S. Matrix metalloproteinases in cancer invasion, metastasis and angiogenesis. *Drug Discov Today*, 2001; 6: 478-82.
20. Aye MM, Cuiling MA, Lin H, Bower KA, Wiggins RC, Luo J. Ethanol-induced in vitro invasion of breast cancer cells: the contribution of MMP-2 by fibroblasts. *Int J Cancer*, 2004; 112: 738-46.

21. Ke Z, Lin H, Fan Z et al. MMP-2 mediates ethanol-induced invasion of mammary epithelial cells over-expressing ErbB2. *Int J Cancer*, 2006; 119: 8-16.
22. Takada A, Nei J, Takase S, Matsuda Y. Effects of ethanol on experimental carcinogenesis. *Hepatology*, 1986; 6: 65-72.
23. Tatsuta M, Iishi H, Baba M et al. Enhancement by ethyl alcohol experimental hepatocarcinogenesis induced by N-nitrosomorpholine. *Int J Cancer*, 1997; 71: 1045-48.
24. Croager EJ, Smith PGJ, Yeoh GCT. Ethanol interactions with a choline-deficient, ethionine-supplemented feeding regime potentiate pre-neoplastic cellular alterations in rat liver. *Carcinogenesis*, 2002; 23: 1685-93.
25. Karim MR, Wanibuchi H, Wei M, Morimura K, Salim E, Fukushima S. Enhancing risk of ethanol on MeIQx-induced rat hepatocarcinogenesis is accompanied with increase levels of cellular proliferation and oxidative stress. *Cancer Letters*, 2003; 192: 37-47.
26. Kushida M, Wanibuchi H, Morimura K et al. Dose-dependence of promotion of 2-amino-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline-induced rat hepatocarcinogenesis by ethanol: evidence for a threshold. *Cancer Sci*, 2005; 96: 747-57.
27. Wanibuchi H, Wei M, Karim R et al. Existence of no hepatocarcinogenic effect levels of 2-amino-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline with or without coadministration with ethanol. *Toxicol Pathol*, 2006; 34: 232-36.
28. Misslbeck NG, Campbell C, Roe D. Effect of ethanol consumed in combination with high or low fat diets on the postinitiation phase of hepatocarcinogenesis in the rat. *J Nutr*, 1984; 114: 2311-23.
29. Yanagi S, Yamashita M, Hiasa Y, Kamiya T. Effect of ethanol on hepatocarcinogenesis initiated in rats with 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene in the absence of liver injuries. *Int J Cancer*, 1989; 44: 681-684.
30. Solt D, Farber E. New principles for the analysis of chemical carcinogenesis. *Nature*, 1976; 263: 701-03.
31. Semple-Roberts E, Hayes MA, Armstrong D, Becker RA, Racz WJ, Farber E. Alternative methods of selecting hepatocellular nodules resistant to 2-acetylaminofluorene. *Int J Cancer*, 1987; 40: 643-45.

32. Tatematsu M, Nagamine Y, Farber E. Redifferentiation as a basis for remodeling of carcinogen-induced hepatocyte nodules to normal appearing liver. *Cancer Res*, 1983; 43: 5049-58.
33. Enomoto K, Farber E. Kinetics of phenotypic maturation of remodeling of hyperplastic nodules during liver carcinogenesis. *Cancer Res*, 1982; 42: 2330-35.
34. Wood GA, Sarma DSR, Archer MC. Resistance to the promotion of glutathione S-transferase 7-7-positive liver lesions in Copenhagen rats. *Carcinogenesis*, 1999; 20: 1169-75.
35. de Almeida Vasconcelos Fonseca EM, Chagas CE, Mazzantini RP, Heidor R, Ong TP, Moreno FS. All-trans and 9-cis retinoic acids, retinol and beta-carotene chemopreventive activities during the initial phases of hepatocarcinogenesis involve distinct actions on glutathione S-transferase positive preneoplastic lesions remodeling and DNA damage. *Carcinogenesis*, 2005; 26(11):1940-46.
36. Song KY, Lim IK, Park SC, Lee SO, Park HS, Choi YK, Hyun BH. Effect of nodularin on the expression of glutathione S-transferase placental form and proliferating cell nuclear antigen in N-nitrosodiethylamine initiated hepatocarcinogenesis in the male Fischer 344 rat. *Carcinogenesis*, 1999; 20(8): 1541-48.
37. Bannasch P, Zerban H. Predictive value of hepatic preneoplastic lesions as indicators of carcinogenic response. In: Vainio H, Magee PN, McGregor DB, McMichael AJ, editors. *Mechanism of Carcinogenesis in Risk Identification*. Lyon: IARC Sci Publ, n<sup>o</sup> 116, 1992: 389- 427.
38. Barbisan LF, Miyamoto M, Scolastici C, Salvadori DM, Ribeiro LR, Eira AF, de Camargo JL. Influence of aqueous extract of *Agaricus blazei* on rat liver toxicity induced by different doses of diethylnitrosamine. *J Ethnopharmacol*, 2002; 83: 25-32.
39. Pinheiro F, Faria RR, de Camargo JL, Spinardi-Barbisan AL, da Eira EF, Barbisan LF. Chemoprevention of preneoplastic liver foci development by dietary mushroom *Agaricus blazei* Murrill in the rat. *Food Chem Toxicol*, 2003; 41: 1543-50.
40. Schulte-Hermann R, Timmermann-Trosiener I, Barthel G, Bursch W. DNA synthesis, apoptosis, and phenotypic expression as determinants of growth of altered foci in rat liver during Phenobarbital promotion. *Cancer Res*, 1990; 50: 5127-35.

41. Goldsworthy TL, Goldsworthy SM, Sprankle CS, Butterworth BE. Expression of myc, fos and Ha-ras associated with chemically induced cell proliferation in the rat liver. *Cell Prolif*, 1994; 27:269-78.
42. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-254.
43. Tanaka T, Nishikawa A, Iwata H, Mori Y, Hara A, Hirono I, Mori H. Enhancing effect of ethanol on aflatoxin B1-induced hepatocarcinogenesis in male ACI/N rats. *Jpn J Cancer Res*, 1989; 80(6): 526-30.
44. Yamagiwa K, Higashi S, Mizumoto R. Effect of alcohol ingestion on carcinogenesis by synthetic estrogen and progestin in the rat liver. *Jpn J Cancer Res*, 1991; 82(7): 771-78.
45. Yamagiwa K, Mizumoto R, Higashi S, Kato H, Tomida T, Uehara S, Tanigawa K, Tanaka M, Ishida N. Alcohol ingestion enhances hepatocarcinogenesis induced by synthetic estrogen and progestin in the rat. *Cancer Detect Prev*, 1994; 18(2): 103-14.
46. Feo F, De Miglio MR, Simile MM, Muroi MR, Calvisi DF, Frau M, Pascale RM. Hepatocellular carcinoma as a complex polygenic disease. Interpretive analysis of recent developments on genetic predisposition. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2006; 1765(2): 126-47.
47. De Miglio MR, Simile MM, Muroi MR, Calvisi DF, Virdis P, Asara P, Frau M, Bosinco GM, Seddaiu MA, Daino L, Feo F, Pascale RM. Phenotypic reversion of rat neoplastic liver nodules is under genetic control. *Int J Cancer*, 2003; 105: 70-5.
48. Schulte-Hermann R, Kraupp-Grasl B, Bursch W, Gerbracht U, Timmermann-Trosiener I. Effects of non-genotoxic hepatocarcinogens phenobarbital and nafenopin on phenotype and growth of different populations of altered foci in rat liver. *Toxicol Pathol*, 1989;17:642-9; discussion 649-50.
49. Feo F, Pascale RM, Simile MM, De Miglio MR, Muroi MR, Calvisi D. Genetic alterations in liver carcinogenesis: implications for new preventives and therapeutics strategies. *Crit Rev Oncog*, 2000;11(1):19-62.

50. Sandgren EP, Luetkeke NC, Palmiter RD, Brinster RL, Lee DC. Overexpression of TGF alpha in transgenic mice: induction of epithelial hyperplasia, pancreatic metaplasia, and carcinoma of the breast. *Cell*, 1990; 61:1121-35.
51. Calvisi DF, Thorgeirsson SS. Molecular mechanisms of hepatocarcinogenesis in transgenic mouse models of liver cancer. *Toxicol Pathol*, 2005; 33: 181-84.
52. Kaufmann WK, Zhang Y, Kaufmann DG. Association between expression of transforming growth factor-alpha and progression of hepatocellular foci to neoplasms. *Carcinogenesis*, 1992; 13: 1481-3.
53. Burr AW, Toole K, Mathew J, Hines JE, Chapman C, Burt AD. Transforming growth factor- $\alpha$  expression is altered during experimental hepatocarcinogenesis. *J Pathol*, 1996; 179: 276-82.
54. Kitano M, Wada J, Ariki Y et al. Possible tumour development from double positive foci for TGF-alpha and GST-P observed in early stages on rat hepatocarcinogenesis. *Cancer Sci*, 2006; 97: 478-483.
55. Derynck R. Transforming growth factor- $\alpha$ . *Cell*, 1988; 54: 593-5.
56. Lee DC, Rose TM, Webb NR, Todaro GJ. Cloning and sequence analysis of a cDNA for rat transforming growth factor- $\alpha$ . *Nature*, 1985; 313: 489-91.
57. Tamano S, Merlino GT, Ward JM. Rapid development of hepatic tumors in transforming growth factor alpha transgenic mice associated with increased cell proliferation in precancerous hepatocellular lesions initiated by N-nitrosodiethylamine and promoted by phenobarbital. *Carcinogenesis*, 1994; 15: 1791-98.
58. Kato J, Sato Y, Nakano Y et al. Ethanol induces transforming-growth factor- $\alpha$  expression in hepatocytes, leading to a stimulation of collagen synthesis by hepatic stellate cells. *Alcohol Clin Exp Res*, 2003; 27: 58S-63S.
59. Kovacic P, Cooksy AL. Role of diacetyl metabolite in alcohol toxicity and addiction via electron transfer and oxidative stress. *Arch Toxicol*, 2005; 79: 123-28.
60. Tanaka T, Hirota Y, Kuriyama M, Nishiguchi S, Otani S. Time course of change in glutathione S-transferase positive foci and ornithine decarboxylase activity after cessation of long-term alcohol administration in rats. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 2001; 2: 131-134.

61. Vu TH, Werb Z. Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. *Genes & Dev.* 2000; 14: 2123-33.
62. Foda HD, Zucker S. Matrix metalloproteinases in cancer invasion, metastasis and angiogenesis. *DDT.* 2001; 6: 478-82.
63. Preaux AM, D'Ortho MP, Bralet MP, Laperche Y, Mavrier P. Apoptosis of human hepatic myofibroblasts promotes activation of matrix metalloproteinase-2. *Hepatology*, 2002; 36: 615-22.
64. Arthur MJP. Fibrogenesis: metalloproteinases and their inhibitors in liver fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2000; 279: 245-9.

## Legend of figures

### Figure 1 – Experimental Design

Figure 2- A) Remodeling (R) and persistent (P) GST-P positive PNL (20x objective); B-D) Serial liver section showing a persistent PNL immunohistochemically stained for GST-P (B) and TGF- $\alpha$  (C) and HE (D). The HE diagnosis showed that the PNL is an eosinophilic foci (20x objective).

Figure 3. A,C,E) Serial liver section of a persistent GST-P positive PNL from an animal of G5, showing the immunohistochemical GST-P staining (A), and the immunohistochemical PCNA plus HE staining (C,E) for the detection of PCNA positive cell nuclei within the PNL (C, 20x objective; E, 40x objective; arrows: PCNA positive hepatocyte nuclei); B,D,F) Serial liver section of a remodeling GST-P positive PNL from an animal of G4, showing the immunohistochemical GST-P staining (A), and the immunohistochemical PCNA plus HE staining (C,E) for the detection of PCNA positive cell nuclei within the PNL (D, 20x objective; F, 40x objective; arrows: PCNA positive hepatocyte nuclei); Note the less content of PCNA positive hepatocyte nuclei within the remodeling PNL, when compared to the persistent PNL

Figure 4. Gelatin zymography analysis of MMP-2 and MMP-9 activities in the livers from twelve weeks (A) and twenty-two weeks experimental groups (B). In all group liver extracts were observed the clear bands with 92, 72, 64 and 59 kDa corresponding to pro-MMP-9, pro-MMP-2, intermediate-MMP-2 and active-MMP2, respectively. No statistically significant differences were observed between the pair-fed groups.

Figure 1

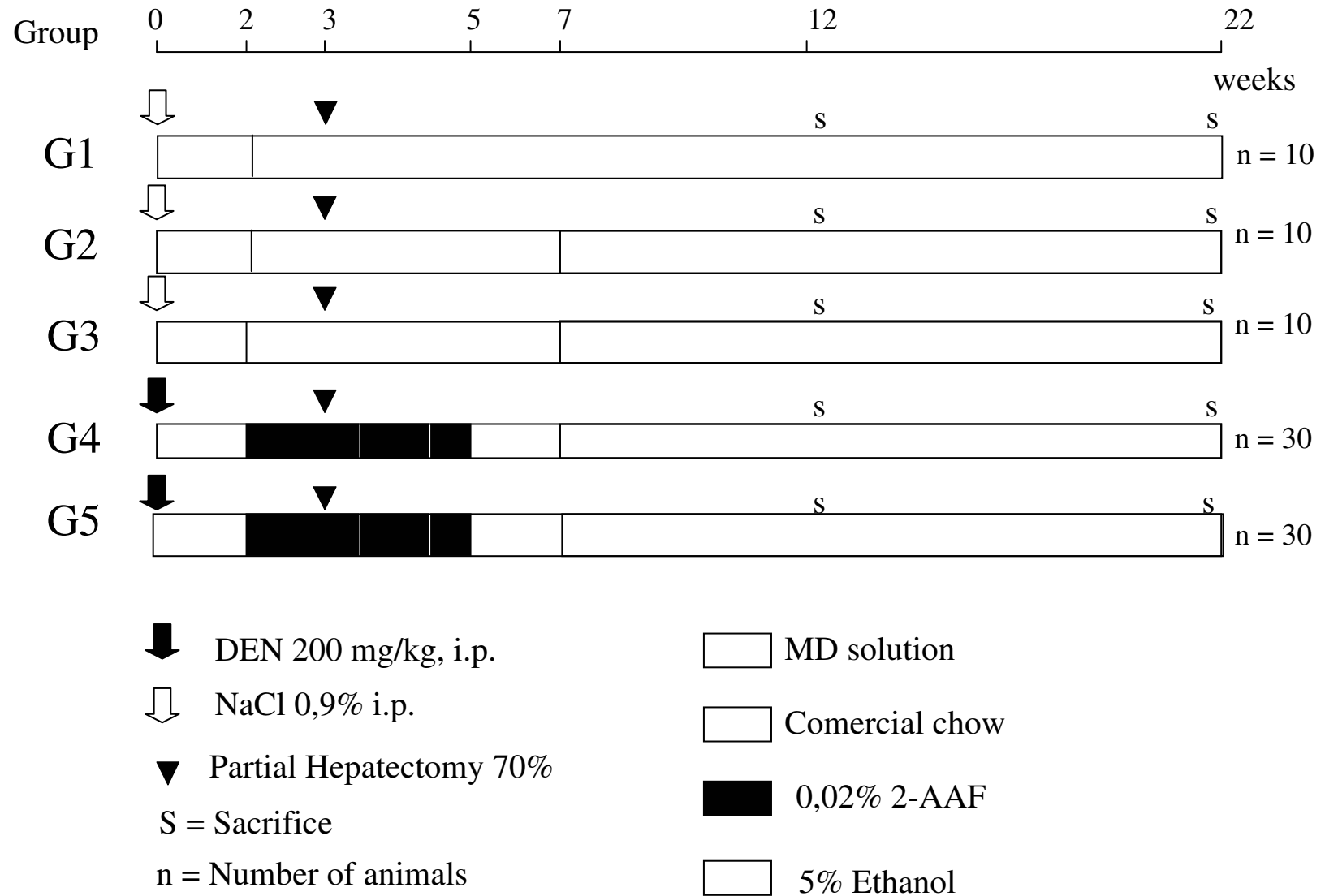


Figure 2

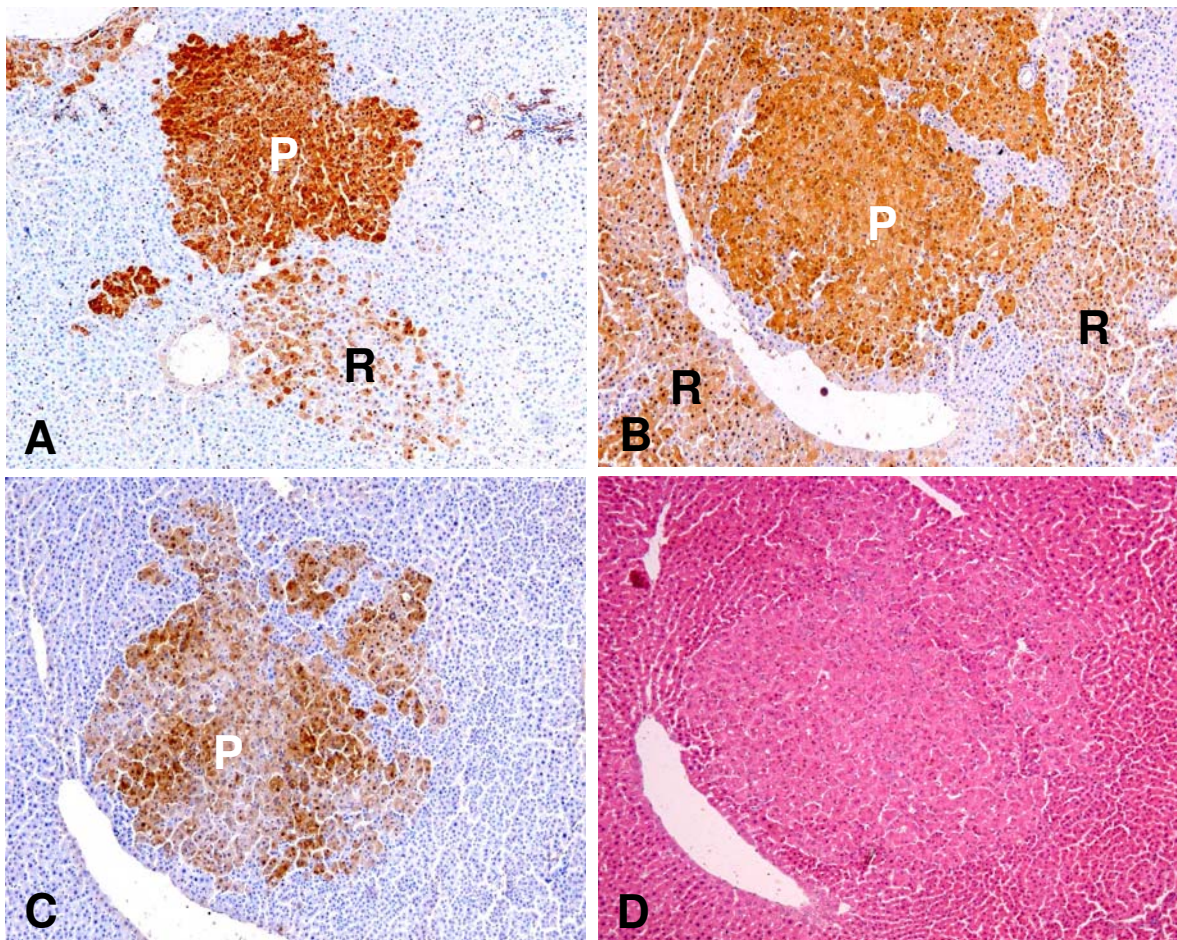
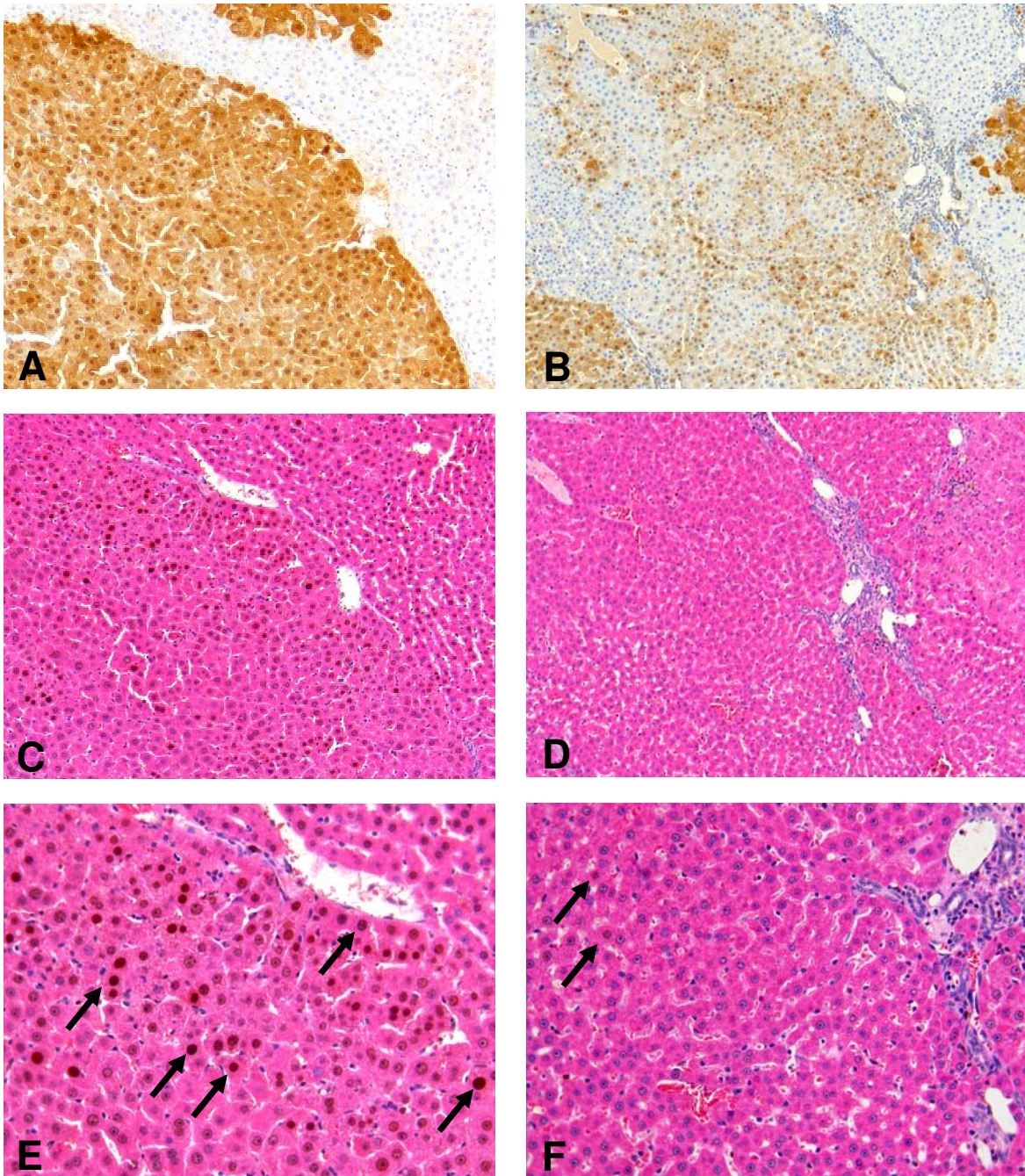
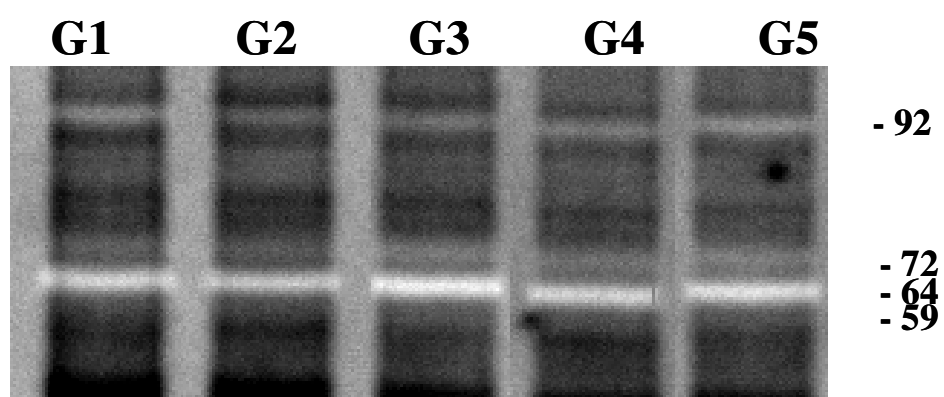


Figure 3



**Figure 4**

**A**



**B**

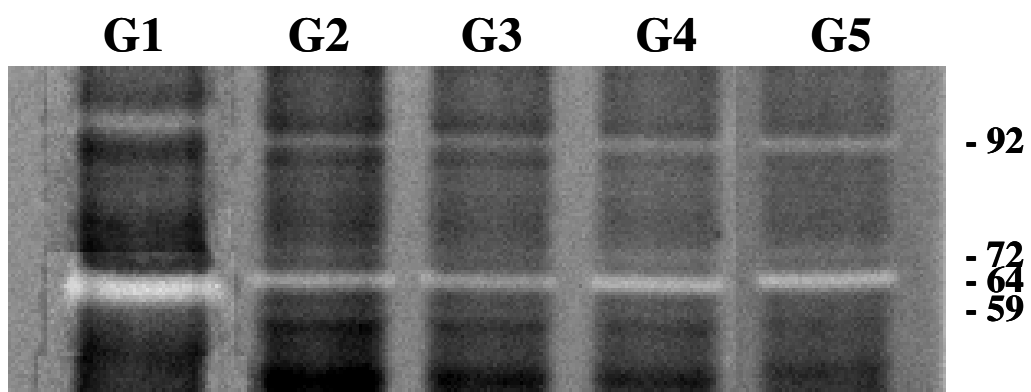


Table 1- Final body weights, body-weight gain, liver weights and transaminases levels serum in different experimental groups. <sup>1</sup>

| Treatment <sup>2</sup><br>(Group) | Final body<br>weight<br>(g) | Body-weight<br>gain<br>(g) | Ingestion of<br>ethanol<br>(g/rat/day) | Liver Weights   |                 | Transaminases analysis |                |
|-----------------------------------|-----------------------------|----------------------------|----------------------------------------|-----------------|-----------------|------------------------|----------------|
|                                   |                             |                            |                                        | Absolute<br>(g) | Relative<br>(%) | ALT<br>(U/l)           | AST<br>(U/L)   |
| 12 Weeks                          |                             |                            |                                        |                 |                 |                        |                |
| Control<br>(G1, n=5)              | 433 ± 61.07                 | 267.60 ± 40.60             | -                                      | 13.72 ± 1.65    | 3.03 ± 0.16     | 59.43 ± 12.28          | 138.34 ± 27.77 |
| Control + MD<br>(G2)              | 439 ± 47.93                 | 272.40 ± 38.06             | -                                      | 13.52 ± 1.70    | 3.01 ± 0.10     | 63.80 ± 14.97          | 136.00 ± 33.86 |
| EtOH 5%<br>(G3, n=5)              | 441 ± 61.50                 | 267.60 ± 40.60             | 1.00 ± 0.11                            | 13.12 ± 2.11    | 2.97 ± 0.12     | 60.80 ± 18.62          | 149.00 ± 28.80 |
| DEN+2-AAF+MD<br>(G4, n=7)         | 394 ± 34.13                 | 225.63 ± 27.13             | -                                      | 18.20 ± 1.35    | 5.09± 1.30      | 70.75 ± 23.66          | 137.25 ± 29.99 |
| DEN+2-AAF+EtOH 5%<br>(G5, n=8)    | 409 ± 39.39                 | 233.90 ± 31.28             | 1.05 ± 0.08                            | 18.21 ± 5.68    | 4.46 ± 0.42     | 64.70 ± 10.63          | 138.90 ± 25.53 |
| 22 Weeks                          |                             |                            |                                        |                 |                 |                        |                |
| Control<br>(G1n=5)                | 444 ± 27.49                 | 262.00 ± 35.91             | -                                      | 10.32 ± 2.51    | 2.21 ± 0.33     | 56.11 ± 13.97          | 147.23 ± 22.21 |
| Control + MD<br>(G2, n=5)         | 431 ± 31.91                 | 271.43 ± 35.70             | -                                      | 9.62 ± 1.22     | 2.24 ± 0.18     | 62.75 ± 18.14          | 156.50 ± 17.14 |
| EtOH 5%<br>(G3, n=5)              | 440 ± 38.10                 | 287.71 ± 29.47             | 1.04 ± 0.23                            | 10.84 ± 1.51    | 2.45 ± 0.21     | 55.67 ± 6.28           | 139.50 ± 16.17 |
| DEN+2-AAF+MD<br>(G4, n=5)         | 396 ± 24.92                 | 245.73 ± 37.43             | -                                      | 14.65 ± 2.58    | 3.65 ± 0.61     | 86.33 ± 29.22          | 145.13 ± 39.18 |
| DEN+2-AAF+EtOH 5%<br>(G5, n=5)    | 401 ± 34.28                 | 235.96 ± 28.04             | 1.10 ± 0.17                            | 16.10 ± 2.54    | 4.04 ± 0.65     | 98.83 ± 38.41          | 213.61 ± 89.32 |

<sup>1</sup>Values are means ± SD; <sup>2</sup> DEN= 200 mg/kg of diethylnitrosamine. 2-AAF= 200 ppm of 2-acethylaminofluorene. MD= maltodextrin solution. EtOH 5%= 5% ethanol (v/v), n= Effective number of animals.

Table 2- Incidence of animals with PNL and neoplastic lesions in liver in different experimental groups.

| Treatment <sup>1</sup><br>(Group) | Types of PNL <sup>2</sup> |           |           | Neoplastic lesions <sup>3</sup> |        |              |                               |
|-----------------------------------|---------------------------|-----------|-----------|---------------------------------|--------|--------------|-------------------------------|
|                                   | CCF                       | ECF       | BCF       | HA                              | HCC    | Number/group | Multiplicity <sup>4</sup>     |
| <b>12 Weeks</b>                   |                           |           |           |                                 |        |              |                               |
| Control<br>(G1, n=5)              | 0                         | 0         | 0         | 0                               | 0      | 0            | 0                             |
| Control + MD<br>(G2, n=5)         | 0                         | 0         | 0         | 0                               | 0      | 0            | 0                             |
| EtOH 5%<br>(G3, n=5)              | 0                         | 0         | 0         | 0                               | 0      | 0            | 0                             |
| DEN+2-AAF+MD<br>(G4, n=7)         | 6 (86%)                   | 7 (100%)  | 6 (86%)   | 5 (71%)                         | 0      | 1.56 ± 2.24  | 2.29 ± 2.21 (22) <sup>5</sup> |
| DEN+2-AAF+EtOH 5%<br>(G5, n=8)    | 6 (75%)                   | 8 (100%)  | 5 (63%)   | 6 (75%)                         | 0      | 3.14 ± 3.28  | 4.40 ± 2.73 (16)              |
| <b>22 Weeks</b>                   |                           |           |           |                                 |        |              |                               |
| Control<br>(G1, n=5)              | 0                         | 0         | 0         | 0                               | 0      | 0            | 0                             |
| Control + MD<br>(G2, n=5)         | 0                         | 0         | 0         | 0                               | 0      | 0            | 0                             |
| EtOH 5%<br>(G3, n=5)              | 0                         | 0         | 0         | 0                               | 0      | 0            | 0                             |
| DEN+2-AAF+MD<br>(G4, n=15)        | 7 (46%)                   | 15 (100%) | 15 (100%) | 13 (87%)                        | 0      | 1.87 ± 1.13  | 2.15 ± 0.90 (29)              |
| DEN+2-AAF+EtOH 5%<br>(G5, n=18)   | 8 (44%)                   | 18 (100%) | 18 (100%) | 17 (94%)                        | 1 (6%) | 5.00 ± 3.24* | 5.29 ± 3.08** (90)            |

<sup>1</sup> DEN= 200 mg/kg of diethylnitrosamine,, 2-AAF= 200 ppm of 2-acethylaminofluorene, MD= maltodextrin solution, EtOH 5%= 5% ethanol (v/v), n= Effective number of animals; <sup>2</sup> CCF= clear cell PNL, ECF= eosinophilic cell PNL, BCF= basophilic cell PNL; <sup>3</sup> HA= Hepatocellular adenoma, HCC= Hepatocellular carcinoma; <sup>4</sup> Number of tumors/tumor-bearing rats; <sup>5</sup> Total number of tumors/group \*G4<G5, p<0.001; \*\*G4<G5, p=0.002.

Table 3- Analysis of development of GST-P positive PNL in DEN/2-AAF-treated groups.<sup>1</sup>

| Treatment <sup>2</sup><br>(Group) | Number of GST-P positive PNL<br>per liver area (cm <sup>2</sup> ) |              |                           | Mean size of GST-P positive PNL |                             |               | Area occupied by GSTP<br>positive PNL (%) |                            |               |
|-----------------------------------|-------------------------------------------------------------------|--------------|---------------------------|---------------------------------|-----------------------------|---------------|-------------------------------------------|----------------------------|---------------|
|                                   | All <sup>3</sup>                                                  | P            | R                         | All                             | P                           | R             | All                                       | P                          | R             |
| <b>12 Weeks</b>                   |                                                                   |              |                           |                                 |                             |               |                                           |                            |               |
| DEN+2-AAF+MD<br>(G4)              | 73.69 ± 15.48                                                     | 26.40 ± 4.07 | 47.29 ± 13.23             | 62.09 ± 91.05                   | 90.16 ± 67.98               | 57.42 ± 45.87 | 45.01 ± 26.01                             | 22.12 ± 14.91              | 22.89 ± 12.64 |
| DEN+2-AAF+EtOH 5%<br>(G5)         | 60.15 ± 5.74                                                      | 22.06 ± 5.58 | 38.09 ± 2.14              | 79.03 ± 78.83                   | 117.67 ± 16.00              | 57.07 ± 8.05  | 48.20 ± 8.04                              | 26.47 ± 10.34              | 21.72 ± 3.11  |
| <b>22 Weeks</b>                   |                                                                   |              |                           |                                 |                             |               |                                           |                            |               |
| DEN+2-AAF+MD<br>(G4)              | 66.59 ± 14.67                                                     | 25.55 ± 7.72 | 41.04 ± 8.77              | 71.78 ± 78.91                   | 92.13 ± 38.16               | 66.16 ± 33.86 | 47.04 ± 14.35                             | 21.45 ± 5.27               | 25.58 ± 9.94  |
| DEN+2-AAF+EtOH 5%<br>(G5)         | 55.42 ± 8.91                                                      | 28.52 ± 5.30 | 26.89 ± 5.31 <sup>a</sup> | 114.03 ± 121.35                 | 152.89 ± 39.12 <sup>b</sup> | 57.42 ± 45.87 | 62.59 ± 16.57                             | 41.11 ± 11.44 <sup>c</sup> | 21.49 ± 9.46  |

<sup>1</sup>Values are means ± SD; 2 DEN= 200 mg/kg of diethylnitrosamine. 2-AAF= 200 ppm of 2-acethylaminofluorene. MD= maltodextrin solution. EtOH 5%= 5% ethanol (v/v); All = persistent + remodeling PNL; P= persistent PNL; R= remodeling PNL. <sup>a</sup> Statically different from group G4,. p<0.001; <sup>b</sup>Statically different from group G4, p=0.002; <sup>c</sup>Statically different from group G4, p<0.001;

Table 4: Analysis of development of TGF- $\alpha$  positive PNL in DEN/2-AAF treated groups.<sup>1</sup>

| Treatment <sup>2</sup><br>(Group) | Number of TGF- $\alpha$ positive PNL per liver area (cm <sup>2</sup> ) |                               |                 | Relation between GST-P and TGF- $\alpha$ positive staining (%) <sup>4</sup> |                  |                 |
|-----------------------------------|------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|-----------------|-----------------------------------------------------------------------------|------------------|-----------------|
|                                   | All <sup>3</sup>                                                       | P                             | R               | GST-P+/TGF- $\alpha$ + <sup>4</sup>                                         | P <sup>5</sup>   | R <sup>5</sup>  |
| <b>12 Weeks</b>                   |                                                                        |                               |                 |                                                                             |                  |                 |
| DEN+2-AAF+MD<br>(G4)              | 5.21 $\pm$ 2.26                                                        | 4.94 $\pm$ 2.09               | 0.27 $\pm$ 0.32 | 9.21 $\pm$ 5.23                                                             | 95.59 $\pm$ 5.34 | 4.41 $\pm$ 5.34 |
| DEN+2-AAF+EtOH 5%<br>(G5)         | 4.69 $\pm$ 3.75                                                        | 4.41 $\pm$ 3.53               | 0.27 $\pm$ 0.26 | 10.97 $\pm$ 8.71                                                            | 94.16 $\pm$ 4.44 | 5.84 $\pm$ 4.44 |
| <b>22 Weeks</b>                   |                                                                        |                               |                 |                                                                             |                  |                 |
| DEN+2-AAF+MD<br>(G4)              | 3.91 $\pm$ 1.41                                                        | 3.66 $\pm$ 1.29               | 0.25 $\pm$ 0.21 | 9.23 $\pm$ 4.80                                                             | 94.31 $\pm$ 4.82 | 5.69 $\pm$ 4.82 |
| DEN+2-AAF+EtOH 5%<br>(G5)         | 10.77 $\pm$ 6.78 <sup>a</sup>                                          | 10.12 $\pm$ 5.91 <sup>b</sup> | 0.65 $\pm$ 0.90 | 19.97 $\pm$ 10.23                                                           | 94.86 $\pm$ 3.77 | 5.14 $\pm$ 3.77 |

<sup>1</sup>Values are means  $\pm$  SD; <sup>2</sup>DEN= 200 mg/kg of diethylnitrosamine. 2-AAF= 200 ppm of 2-acethylaminofluorene. MD= maltodextrin solution. EtOH 5%= 5% ethanol (v/v); <sup>3</sup>All = persistent + remodeling PNL; P= persistent PNL; R= remodeling PNL. <sup>4</sup>Percentage of positive for both GST-P and TGF- $\alpha$  immunostaining; <sup>5</sup>Percentage of remodeling or persistent PNL positive for TGF- $\alpha$ .

<sup>a</sup>G4<G5, p<0.001; <sup>b</sup>G4<G5, p<0.001

Table 5- PCNA labeling indices (PCNA LI%) and apoptosis indices (AI%) in PNL of DEN/2AAF-treated groups<sup>1</sup>

| Groups <sup>1</sup><br>Parameters <sup>2</sup> | 12 Weeks                    |                                 |                             | 22 Weeks                   |                                 |                             |
|------------------------------------------------|-----------------------------|---------------------------------|-----------------------------|----------------------------|---------------------------------|-----------------------------|
|                                                | DEN+2-AAF+MD<br>(G4, n= 25) | DEN+2-AAF+EtOH 5%<br>(G5, n=25) | <i>P value</i> <sup>3</sup> | DEN+2-AAF+MD<br>(G4, n=50) | DEN+2-AAF+EtOH 5%<br>(G5, n=50) | <i>P value</i> <sup>3</sup> |
| <b>PCNA LI%</b>                                |                             |                                 |                             |                            |                                 |                             |
| All                                            | 1.55 ± 1.06                 | 2.12 ± 0.93*                    | 0.432                       | 1.64 ± 0.66                | 6.16 ± 2.70*                    | < 0.001                     |
| P                                              | 2.16 ± 1.29                 | 3.28 ± 1.51                     | 0.234                       | 2.48 ± 1.01                | 7.42 ± 2.42*                    | < 0.001                     |
| R                                              | 0.91 ± 0.43                 | 1.03 ± 0.43                     | 0.165                       | 0.81 ± 0.35                | 4.75 ± 2.04*                    | < 0.001                     |
| <i>P value</i> <sup>4</sup>                    | 0.078                       | 0.012                           |                             | 0.002                      | 0.015                           |                             |
| <b>AI %</b>                                    |                             |                                 |                             |                            |                                 |                             |
| All                                            | 0.08 ± 0.07                 | 0.06 ± 0.10                     | 0.534                       | 0.08 ± 0.07                | 0.11 ± 0.06                     | 0.359                       |
| P                                              | 0.15 ± 0.13                 | 0.13 ± 0.20                     | 0.771                       | 0.15 ± 0.14                | 0.17 ± 0.10                     | 0.735                       |
| R                                              | 0.03 ± 0.02                 | 0.02 ± 0.02                     | 0.625                       | 0.01 ± 0.02                | 0.03 ± 0.04                     | 0.359                       |
| <i>P value</i> <sup>4</sup>                    | 0.010                       | 0.017                           |                             | 0.012                      | 0.002                           |                             |

<sup>1</sup> DEN= 200 mg/kg of diethylnitrosamine,, 2-AAF= 200 ppm of 2-acethylaminofluorene, MD= maltodextrin solution, EtOH 5%= 5% ethanol (v/v), n= number of remodeling and persistent PNL/group analysed; <sup>2</sup> PCNA labeling indices (S-phase) and AI%= apoptotic indices;<sup>3</sup> Statistical comparisons between G4 and G5 groups;

<sup>4</sup> Statistical comparisons between G4 or G5 groups to remodeling and persistent PNL.

#### 4. Conclusões Gerais

A administração crônica de etanol exerce efeito promotor seletivo sobre a hepatocarcinogênese química. Os possíveis mecanismos através dos quais o etanol exerce essa atividade poderiam ser:

1. Crescimento seletivo de lesões pré-neoplásicas com fenótipo persistente pelo marcador GST-P e que expressam, concomitantemente, o TGF-  $\alpha$ .
2. Aumento da proliferação celular nas LPN, especialmente as lesões de fenótipo persistente poseria ser mediada por mecanismos autócrinos dependentes de fatores de crescimento, entre eles o TGF-  $\alpha$ .
3. O desenvolvimento de maior número e multiplicidade de adenomas hepáticos, influenciado pelo tratamento crônico com etanol, não envolve a via das gelatinases hepáticas (MMP-2 e -9).

## 5. Referências da Introdução

- Anderson MW, Reynolds SH, You M, Maronpot RM. Role of proto-oncogene activation in carcinogenesis. *Environ Health Perspect*, 1992; 98: 13-24
- Aparicio T, Kermorgant S, Dessirier V, Lewin MJM, Lehy T. Matrix metalloproteinase inhibition prevents colon cancer peritoneal carcinomatosis development and prolongs survival in rats. *Carcinogenesis*, 1999; 20: 1445-52.
- Arthur MJP. Fibrogenesis: metalloproteinases and their inhibitors in liver fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2000; 279: 245-9.
- Aye MM, Cuiling M, Bower K, Wiggins R, Luo J. Ethanol-induced in vitro invasion of breast cancer cells: the contribution of MMP-2 by fibroblasts. *International Journal of Cancer*, 2004; 112: 738-46.
- Bannasch P. Preneoplastic lesions as end-points in carcinogenicity testing I- Hepatic preneoplasia. *Carcinogenesis*, 1986; 7:689-95.
- Bannasch P, klimek F, Mayer D. Early bioenergetic changes in hepatocarcinogenesis: preneoplastic phenotypes mimic responses to insulin and thyroid hormone. *J. Bioenerg. Biomembr*. 1997; 29: 303-13.
- Bannasch P, Enzmann H, Klimek F, Weber E, Zerban H. Significance of sequential cellular changes inside and outside foci altered hepatocytes during hepatocarcinogenesis. *Toxicol Pathol*, 1989; 17: 617-29.
- Bannasch P, Zerban H. Predictive value of hepatic preneoplastic lesions as indicators of carcinogenic response. In: Vainio H, Magee PN, McGregor DB, McMichal AJ, editors. *Mechanism of Carcinogenesis in Risk Identification*. Lyon: IARC Sci Publ, n° 116, 1992: 389- 427.
- Barbisan LF, Spinardi-Barbisan A.L.T, Moreira ELT, Salvadori DMF, Ribeiro LR, da Eira AF, de Camargo JLV. *Agaricus blazei* (Himematsutake) does not alter the development of rat diethylnitrosamine-initiated hepatic preneoplastic foci. *Cancer Science*, 2003; 94: 188-192.

- Beshi K, Fujiwara M, Senoo H, Kondou Y, Ohsugi Y, Hayashi T, Ishidate K. Activation of stellate cells before induction of hepatic fibrosis timing in choline-deficient diet-fed rat model. *Comparative Hepatology*, 2004; 3: S14.
- Bosch FX, Ribes J, Cléries R, Díaz M. Epidemiology of hepatocellular carcinoma. *Clin Liver Dis*, 2005; 9: 191-211.
- Brunaud L, Alberto J M, Ayav A, Gerard P, Namour F, Antunes L, Brau M, Bronowicki J P, Bresler L, Gueant J L. effects of vitamin B12 and folate deficiencies on DNA methylation and carcinogenesis in rat liver. *Clin Chem Lab Med*. 2003; 4: 1012-9.
- Bunout D. Nutritional and metabolic effects of alcoholism: their relationship with alcoholic liver disease. *Nutrition*, 1999; 15: 583-589.
- Burr AW, Toole K, Mathew J, Hines JE, Chapman C, Burt AD. Transforming growth factor- $\alpha$  expression is altered during experimental hepatocarcinogenesis. *J Pathol*, 1996; 179: 276-82.
- Calvisi DF, Thorgeirsson SS. Molecular mechanisms of hepatocarcinogenesis in transgenic mouse models of liver cancer. *Toxicol Pathol*, 2005; 33: 181-84.
- Cho KJ, Jang JJ. Effects of carbon tetrachloride, ethanol and acetaldehyde on diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis in rats. *Cancer Lett*, 1993; 70: 33-9.
- Croager EJ, Smith PG, Yeoh GC. Ethanol interactions with a choline-deficient, ethionine-supplemented feeding regime potentiate pre-neoplastic cellular alterations in rat liver. *Carcinogenesis*, 2002; 23: 1685-93.
- Cui J, Dong BW, Liang P, Yu XL, Yu DJ. Effect of c-myc, ki-67, MMP-2 and VEGF expression on prognosis of hepatocellular carcinoma patients undergoing tumor resection. *World J. Gastroenterol*. 2004; 10: 1533-6.
- De Miglio MR, Simile MM, Muroli MR, Calvisi DF, Virdis P, Asara P, Frau M, Bosinco GM, Seddaiu MA, Daino L, Feo F, Pascale RM. Phenotypic reversion of rat neoplastic liver nodules is under genetic control. *Int J Cancer*, 2003; 105: 70-5.
- Deguchi J, Kawabata T, Kondo A, Okada S. Transforming growth factor- $\alpha$  expression of renal proximal tubules in Wistar rats treated with ferric and aluminum nitrilotriacetate. *Jpn J Cancer Res*, 1993; 84: 649-55.

- Denda A, Kitayama W, Kishida H, Murata N, Tsutsumi M, Tsujiuchi T, Nakae D, Konishi Y. Development of hepatocellular adenomas and carcinomas associated with fibrosis in C57BL/6J male mice given a choline-deficient, L-amino acid-defined diet. *Jpn. J. Cancer Res*, 2002; 93: 125-132.
- Derynck R. Transforming growth factor- $\alpha$ . *Cell*, 1988; 54: 593-5.
- Derynck R. The physiology of transforming growth factor- $\alpha$ . *Adv Cancer Res*, 1992; 58: 27-52.
- Dragan YP, Rizui T, Xu Y-H. An initiation-promotion assay in rat live as a potencial complement to the 2-year carcinogenesis bioassay. *Fund Appl Toxicol*. 1991; 16: 525-47.
- Driver HE, McLean AE. Dose-response relationships for initiation of rat liver tumours by diethylnitrosamine and promotion by phenobarbitone or alcohol. *Food Chem Toxicol*, 1986; 24: 241-5.
- Donohue TM, Osna NA, Clemens DL. Recombinant Hep G2 cells that express alcohol dehydrogenase and cytochrome P450 2E1 as a model of ethanol-elicited cytotoxicity. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 2006; 38: 92-101.
- Duffy MJ, Maguire TM, Hill A, Mcdermott E, O'Higgins N. Metalloproteinases: role in breast carcinogenesis, invasion and metastasis. *Breast Cancer Res*. 2000; 2: 252-7.
- Enomoto K, Farber E. Kynetics of phenotypic maturation of remodeling of hyperplastic nodules during liver carcinogenesis. *Cancer Res*, 1982; 42: 2330-35.
- Enzmann H, Bannasch P. Potential significance of phenotypic heterogeneity of focal lesions at different stages in hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis*, 1987; 8: 1607-12.
- Esfandiari F, Green R, Cotterman R F, Pogribny I P, James S J, Miller J V. Methyl deficiency causes reduction of the methyl-CpG-binding protein MeCP2, in rat liver. *Carcinogenesis* 2003; 24: 1935-40.
- Etique N, Grillier-Vuissoz I, Flament S. Ethanol stimulates the secretion of matrix metalloproteinases 2 and 9 in MCF-7 human breast cancer cells. *Oncol Rep*, 2006; 15: 603-8..
- Evarts RP, Nakatsukasa H, Marsden ER, Hsia CC, Dunsford HA, Thorgeirsson SS. Cellular and molecular changes in the early stages of chemical hepatocarcinogenesis in the rat. *Cancer Res*. 1990; 50: 3439-44.

- Farber E. Cancer development and its natural history. A cancer prevention perspective. *Cancer*, 1988; 62: 1676-79.
- Farber E, Sarma RSD. Biology of disease. Hepatocarcinogenesis: a dynamic cellular perspective. *Lab Invest*. 1987; 56: 4-22.
- Feo F, Pascale RM, Simile MM, De Miglio MR, Muroi MR, Calvisi D. Genetic alterations in liver carcinogenesis: implications for new preventives and therapeutics strategies. *Crit Rev Oncog*, 2000;11: 19-62.
- Feo F, De Miglio MR, Simile MM, Muroi MR, Calvisi DF, Frau M, Pascale RM. Hepatocellular carcinoma as a complex polygenic disease. Interpretive analysis of recent developments on genetic predisposition. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2006; 1765: 126-47.
- Foda HD, Zucker S. Matrix metalloproteinases in cancer invasion, metastasis and angiogenesis. *DDT*. 2001; 6: 478-82.
- Fonseca EM, Chagas CE, Mazzantini RP, Heidor R, Ong TP, Moreno FS. All-trans and 9-cis retinoic acids, retinol and beta-carotene chemopreventive activities during the initial phases of hepatocarcinogenesis involve distinct actions on glutathione S-transferase positive preneoplastic lesions remodeling and DNA damage. *Carcinogenesis*, 2005; 26: 1940-46.
- Franks LM, Teich NM. Introduction to the Cellular and Molecular Biology of Cancer. Oxford University Press, 3. ed, p.426, 1999.
- Fridman R, Toth M, Pena D, Mobashery S. Activation of progelatinase B (MMP-9) by gelatinase A (MMP-2). *Cancer Res*. 1995; 55: 2548-55.
- Friedman SL. Mechanisms of disease: mechanisms of hepatic fibrosis and therapeutic implication. *Nature Clinical Practice Gastroenterology and Hepatology*, 2004; 1: 98-105.
- Gagliano N, Arosio B, Grizzi F, Masson S, Tagliabue J, Dioguardi N, Vergani C, Annoni G. Reduced collagenolytic activity of matrix metalloproteinases and development of liver fibrosis in the aging rat. *Mechanisms of Ageing Development*, 2002; 123: 413-25.
- Garcea R, Daino L, Pascale RM, Simile MM, Puddu M, Frassetto S, Cozzolino P, Seddaiu MA, Gaspa L, Feo F. Inhibition of promotion and persistent nodule growth by S-

- adenosyl-L-methionine in rat liver carcinogenesis: role of remodeling and apoptosis. *Cancer Res*, 1989; 49: 1850-6.
- Gerbracht U, Eigenbrodt E, Simile MM, Pascale RM, Gaspa L, Daino L, Seddaiu MA, de Miglio MR, Nufis A, Feo F. Effect of S-adenosyl-L-methionine on the development of preneoplastic foci and the activity of some carbohydrate metabolizing enzymes in the liver, during experimental hepatocarcinogenesis. *Anticancer Res*, 1993; 13: 1965-72.
- Ghoshal A K and Farber E. The induction of liver cancer by dietary deficiency of choline and methionine without added carcinogens. *Carcinogenesis*, 1986; 5: 1367-1370
- Ghoshal, A K, Rushmore, T H, Farber, E. Initiation of carcinogenesis by a dietary deficiency of choline in the absence of added carcinogens. *Cancer Letters*, 1987; 36: 289-96.
- Ghoshal A K and Farber E. Choline deficiency, lipotrope deficiency and the development of liver disease including liver cancer: a new perspective. *Lab. Invest.* 1993; 68: 255-260.
- Gournay J, Auvigne I, Pichard V, Ligeza C, Bralet MP, Ferry N. In vivo lineage analysis during chemical hepatocarcinogenesis in rats using retroviral-mediated gene transfer: evidence for dedifferentiation of mature hepatocytes. *Laboratory Investigation*. 2002; 82: 781-8.
- Habs M, Schmahl D. Inhibition of the hepatocarcinogenic activity of diethylnitrosamine (DENa) by ethanol in rats. *Hepatogastroenterology*, 1981; 28:242-4.
- Hasegawa R, Ito N. Liver medium-term bioassay in rats for screening of carcinogens and modifying factors in hepatocarcinogenesis. *Fd Chem Toxic*, 1992; 30: 979-92.
- Hoekstra R, Eskens FAIM, Verweij J. Matrix metalloproteinase inhibitors: current developments and future perspectives. *The Oncologist*. 2001; 6:415-27.
- Hsu SM, Raine L, Fanger N. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem*. 1981; 29: 557-80.
- Hufnagl K, Parzefall W, Marian B, Käfer M, Bukowska K, Schulte-Hermann R, Grasl-Kraupp B. Role of transforming growth factor  $\alpha$  and prostaglandins in differential growth of preneoplastic rat hepatócitos. *Carcinogenesis*, 2001; 22: 1247-56.

- Instituto Nacional do Câncer (INCA). Incidência de câncer – estimativa 2006. <http://www.inca.gov.br/estimativa/2006>.
- Iredale JP, Benyon RC, Pickerng J, McCullen M, Northrop M, Pawley S, Hovell C, Arthur MJP. Mechanisms of spontaneous resolution of rat liver fibrosis: hepatic stellate cell apoptosis and reduced hepatic expression of metalloproteinase inhibitors. *J Clin Invest* 1998; 102: 538-49.
- Ishii Y, Nakasato Y, Kobayashi S, Yamazaki Y, Aoki T. A study on angiogenesis-related matrix metalloproteinase net-works in primary hepatocellular carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res* 2003; 22: 461-70.
- Ito N, Tsuda H, Tatematsu M, Inoue T, Tagawa Y, Aoki T, Uwagawa S, Kagawa M, Ogiso T, Masui T, Imaida K, Asamoto M. Enhancing effect of various hepatocarcinogens on induction of preneoplastic glutathione S-transferase placental form positive foci in rats; an approach for a new medium-term bioassay system. *Carcinogenesis*, 1988; 9: 387-94.
- Ito N, Imaida T, Hasegawa R, Tsuda H. Rapid bioassay methods for carcinogens and modifiers of hepatocarcinogenesis. *Crit Rev Toxicol*. 1989; 19: 385- 415.
- Jones JL, Walker R. Control of matrix metalloproteinase activity in cancer. *J Pathol*. 1997; 183: 377-9.
- Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia Básica*. Ed Guanabara Koogan, 1999. 9ª edição, pp. 272-85.
- Kähäri VM, Saarialho-Kere U. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in tumour growth and invasion. *Ann Med*. 1999; 31: 34-45.
- Kaneyoshi T, Nakatsukasa H, Higashi T, Fujiwara K, Naito I, Nouse K, Kariyama K, Kobayashi Y, Uemura M, Nakamura SI, Iwasaki Y, Tsuji T. Actual invasive potential oh human hepatocellular carcinoma revealed by *in situ* gelatin zymography. *Clinical Cancer Res*. 2001; 7: 4027-32.
- Karim MR, Wanibuchi H, Wei M, Morimura K, Salim EI, Fukushima S. Enhancing risks of ethanol on MeIQx-induced rat hepatocarcinogenesis is accompanied with increased levels of cellular proliferation and oxidative stress. *Cancer Letters*, 2003; 192: 37-47.

- Kaufmann WK, Rice JM, Mackenzie SA, Smith GJ, Wenk ML, Devor D, Qaqish BF, Kaufman DG. Proliferation of carcinogen-damaged hepatocytes during cell-cycle-dependent initiation of hepatocarcinogenesis in the rat. *Carcinogenesis*, 1991; 12: 1587-93.
- Kaufmann WK, Zhang Y, Kaufmann DG. Association between expression of transforming growth factor- $\alpha$  and progression of hepatocellular foci to neoplasms. *Carcinogenesis*, 1992; 13: 1481-3.
- Ke Z, Lin H, Fan Z, Cai TQ, Kaplan RA, Ma C, Bower KA, Shi X, Luo J. MMP-2 mediates ethanol-induced invasion of mammary epithelial cells over-expressing ErbB2. *Int J Cancer*, 2006; 199: 8-16.
- Kim TH, Mars WM, Stolz DB, Michalopoulos GK. Expression and activation of pro-MMP-2 and pro-MMP-9 during rat liver regeneration. *Hepatology*, 2000; 31: 75-82.
- Knittel T, Mehde M, Grundmann A, Saile B, Scharf JG, Ramadori G. Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors during hepatic tissue repair in the rat. *Histochemistry and Cell Biology*, 2000; 113: 443-53.
- Koifman S, Koifman RJ. Environment and cancer in Brazil: an overview from a public health perspective. *Mutat Res*, 2003; 544: 305-311.
- Kossakowska AE, Edwards DR, Lee SS, Urbanski LS, Stabbler AL, Zhang CL, Phillipis BW, Zhang Y, Urbanski S. Altered balance between matrix metalloproteinases and their inhibitors in experimental biliary fibrosis. *Am J Pathology*. 1998; 153: 1895-902.
- Kushida, M; Wanibuchi, H; Morimura, K; Kinoshita, A; Kang, JS; Puatanachokchai, R; Wei, M; Fukushima, S. Dose-dependence of promotion of 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5]quinoxaline-induced rat hepatocarcinogenesis: Evidende for a threshold. *Cancer Science*, 2005; 96: 747-757.
- Lee DC, Rose TM, Webb NR, Todaro GJ. Cloning and sequence analysis of a cDNA for rat transforming growth factor- $\alpha$ . *Nature*, 1985; 313: 489-91.
- León MCG, Montfort I, Montes ET, Vancell RL, García AO, Canto AG, Nequiz-Avendaño M, Pérez-Tamayo R. Hepatocyte production of modulators of extracellular liver matrix in normal and cirrotic rat liver. *Experimental and Molecular Pathology*, 2006; 80: 97-108.

- Livingstone JJ, Filipe MI, Wastell C. Expression of transforming growth factor alpha in experimental gastric carcinogenesis. *Gut*, 1994; 35: 604-7.
- Lombardi B, Chandar N, Locker J. Nutritional model of hepatocarcinogenesis: rats fed choline-devoid diet. *Dig Dis Sci*, 1991; 36: 979-984.
- Lopatina N G, Vanyushin B F, Cronin G M, Poirier L A. Elevated expression and altered pattern of activity of DNA methyltransferase in liver the rats fed methyl deficient diets. *Carcinogenesis*, 1998; 19: 1777-1781.
- Määttä M, Soini Y, Liakka A, Autio-Harmainen H. Differential expression of matrix metalloproteinase (MMP)-2, MMP-9, and membrane type 1-MMP in hepatocellular and pancreatic adenocarcinoma: Implications for tumor progression and clinical prognosis. *Clin. Cancer Res.* 2000; 6: 2726-34.
- Marrero, JA. Hepatocellular carcinoma. *Current Opinion in Gastroenterology*, 2005; 21: 308-312.
- Matrisian LM. Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling. *Trends Genet.* 1990; 6: 121-5.
- Meza-Junco J, Montano-Loza A, Aquayo-Gonzalez A. Molecular basis of cancer. *Rev Invest Clin*, 2006; 58: 56-70.
- McKillop IH, Schrum LW. Alcohol and liver cancer. *Alcohol*, 2005; 35: 195-203.
- Misslbeck NG, Campbell TC, Roe DA. Effect of ethanol consumed in combination with high or low fat diets on the postinitiation phase of hepatocarcinogenesis in the rat. *J Nutr*, 1984; 114: 2311-23.
- Moore MA, Hacker J, Bannasch P. Phenotypic instability in focal and nodular lesions induced by a short term system in liver rat. *Carcinogenesis*, 1983; 4: 595-603.
- Moore MA, Nakamura T, Ito, N. Immunohistochemically demonstrated glucose-6-phosphate dehydrogenase,  $\gamma\gamma$ -glutamyl transpeptidase, ornithine decarboxylase and glutathione S-transferase enzymes: absence of direct correlation with cell proliferation in rat liver putative preneoplastic lesions. *Carcinogenesis*, 7: 1419-1424, 1986.
- Moore MA, Kitagawa T. Hepatocarcinogenesis in the rat: the effect of promoters and carcinogens in vivo or in vitro. *Intern Ver Cytol* 1986; 101: 125-73.

- Moser GJ, Wolf DC, Goldsworthy TL Quantitative relationship between transforming growth factor- $\alpha$  and hepatic focal phenotype and progression in female mouse liver. *Toxicol Pathol*, 1997; 25: 275-83.
- Moser GJ, Wolf DC, Wong BA, Goldsworthy TL. Loss of tumor-promoting activity of unleaded gasoline in N-nitrosodiethylamine-initiated ovariectomized B6C3F1 mouse liver. *Carcinogenesis*. 1997; 18: 1075-83.
- Motola-Kuba D, Zamora-Valdés D, Uribe M, Méndez-Sánchez N. Hepatocellular carcinoma. An overview. *Ann Hepatol*, 2006; 5: 16-24.
- Murphy FR, Issa R, Zhou X, Ratnarajah S, Nagase H, Arthur MJ, Benyon C, Iredale JP. Inhibition of apoptosis of activated hepatic stellate cells by tissue inhibitor of metalloproteinase-1 is mediated via effects on matrix metalloproteinase inhibition: implications for reversibility of liver fibrosis. *The Journal of Biological Chemistry*, 2002; 277: 11069-11076.
- Nagase H, Woessner JF. Matrix metalloproteinase. *J. Biol. Chem.* 1999; 274: 21491-4.
- Newberne, P M. The methyl-deficiency model: History characteristics and research directions. *J Nutr Biochem*, 1993; 4: 618-24.
- Nomura K, Miyagawa S, Ayukawa K, Soeda J, Taniguchi, S, Kawasaki S. Inhibition of urokinase-type plasminogen activator delays expression of c-jun, activated transforming growth factor  $\beta$ 1, and matrix metalloproteinase 2 during post hepatectomy liver regeneration in mice. *Journal of Hepatology*, 2002; 36: 637-44.
- Olaso E, Ikeda K, Eng FJ, Xu L, Wang LH, Lin HC, Friedman S. DDR-2 receptor promotes MMP-2-mediated proliferation and invasion by hepatic stellate cells. *J. Clin. Invest.* 2001; 108: 1396-78.
- Petersen, DR. Alcohol, iron-associated oxidative stress, and cancer. *Alcohol*, 2005; 243-249.
- Pinheiro F, Faria RR, de Camargo JL, Spinardi-Barbisan AL, da Eira EF, Barbisan LF. Chemoprevention of preneoplastic liver foci development by dietary mushroom *Agaricus blazei* Murrill in the rat. *Food Chem. Toxicol.* 2003; 41: 1543-50.
- Pitot HC, Dragan YP. Facts and theories concerning the mechanisms of carcinogenesis. *Mechanisms of carcinogenesis. FASEB J*, 1991; 5: 2280-2286.

- Pitot HC. A molecular biology of carcinogenesis. *Cancer Res*, 1993; 72: 962-970, 1993.
- Pitot HC, Dragan YP, Teeguarden J, Hsia S, Campbell H. Quantitation of multistage carcinogenesis in rat liver. *Toxicol Pathol*, 1996; 24:119-28.
- Pitot HC. Pathways of progression in hepatocarcinogenesis. *The Lancet*, 2001; 358: 859-60.
- Pogribny A G, Basnakian B J, Miller B J, Lopatina N G, Poirier L A, James S J. Breaks in genomic DNA and within the p53 gene are associated with hypomethylation in livers of folate/methyl deficient diets. *Cancer Res*. 1995; 55: 1894-1901.
- Pogribny I P, Miller B J, James S J. Alterations in hepatic p53 gene methylation patterns during tumor progression with folate/methyl deficiency in the rat. *Cancer Lett*. 1997; 15: 31-38
- Pogribny I P, James S J, Jernigan S, Pogribna M. Genomic hypomethylation specific for neoplastic liver in folate/methyl deficient rats and does not occur in non-target tissues. *Mutation Research*, 2004; 548: 53-59.
- Pöschl G, Seitz HK. Alcohol and cancer. *Alcohol and Alcoholism*, 2004; 39: 155-165.
- Preaux AM, D'Ortho MP, Bralet MP, Laperche Y, Mavrier P. Apoptosis of human hepatic myofibroblasts promotes activation of matrix metalloproteinase-2. *Hepatology*, 2002; 36: 615-22.
- Radike MJ, Stemmer KL, Bingham E. Effect of ethanol on vinyl chloride carcinogenesis. *Environ Health Perspect*, 1981; 41:59-62.
- Robbins and Cotran, *Patologia - Bases Patológicas das Doenças* - Kumar, Vinay; Fausto, Nelson; Abbas, Abul K. 7ª Ed. 2005. Ed Elsevier.
- Salomon DS, Kim N, Saeki T, Ciardiello F. Transforming growth factor- $\alpha$ : An oncodevelopmental growth factor. *Cancer Cells*, 1990; 2: 389-97.
- Satoh K. Weak electrophile selective characteristics of the rat preneoplastic marker enzyme glutathione S-transferase P-form, GST-P (7-7): a theory of linear free energy relationships for evaluation of the active site hydrophobicity of isoenzymes. *Carcinogenesis*, 1998; 19: 1665-71.

- Satoh K, Hatayama I. Anomalous elevation of glutathione S-transferase P-form (GST-P) in the elementary process of epigenetic initiation of chemical hepatocarcinogenesis in rats. *Carcinogenesis*, 2002; 23: 1193-98.
- Satoh K, Hatayama I, Tsuchida S, Sato K. Biochemical characteristics of a preneoplastic marker enzyme glutathione S-transferase P-form(7-7). *Arch Biochem Biophys*, 1991; 285: 312-6.
- Satoh K, Kitahara A, Soma Y, Inaba Y, Hatayama I, Sato K. Purification, induction, and distribution of placental glutathione transferase: a new marker enzyme for preneoplastic cells in the rat chemical hepatocarcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985; 82: 3964-68.
- Satoh K, Kitahara A, Soma Y, Inaba Y, Hatayama I, Sato K. Purification, induction, and distribution of placental glutathione transferase; a new marker enzyme for preneoplastic cells in the rat chemical hepatocarcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci*. 1985; 82: 3964-8.
- Sawada N, Poirier L, Moran S, Xu Y-H, Pitot H C. The effect of choline and methionine deficiencies on the number and volume percentage of altered liver hepatic foci in the presence of diethylnitrosamine initiation in rat liver. *Carcinogenesis*, 1990; 11: 273-281.
- Schulte-Hermann R, Timmermann-Trosiener I, Barthel G, Bursch W. DNA synthesis, apoptosis, and phenotypic expression as determinants of growth of altered foci in rat liver during Phenobarbital promotion. *Cancer Res*, 1990; 50: 5127-35.
- Schuppan D, Ruehl M, Somasundaram R, Hahn EG. Matrix as a modulator of hepatic fibrogenesis. *Seminars in Liver Disease*, 2001; 21, 351-372.
- Sell S, Dunsford HA. Evidence for the stem cell origin of hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma. *American Journal of Pathology*. 1989; 134: 1347-63.
- Sentíes-Gómez MD, Gálvez-Gastélum FJ, Meza-garcía E, Armendáriz-Borunda J. Fibrosis hepática. El papel de las metaloproteinasas y de TGF- $\beta$ . *Gaceta Médica Mexicana*, 2005; 141: 315-322.
- Solt D, Faber E. New principle for the analysis of chemical carcinogenesis. *Nature*. 1976; 263: 701-3.
- Song KY, Lim IK, Park SC, Lee SO, Park HS, Choi YK, Hyun BH. Effect of nodularin on the expression of glutathione S-transferase placental form and proliferating cell nuclear

- antigen in N-nitrosodiethylamine initiated hepatocarcinogenesis in the male Fischer 344 rat. *Carcinogenesis*, 1999; 20: 1541-48.
- Spandidos DA. Mechanisms of carcinogenesis: the role of oncogenes, transcriptional enhancers and growth factors. *Anticancer Res*, 1985; 5: 485-98.
- Stamenkovic I. Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. *Cancer Biol*. 2000; 10: 415-33.
- Stanley LA. Molecular aspects of chemical carcinogenesis: the roles of oncogenes and tumour suppressor genes. *Toxicology*, 1995; 96: 173-94.
- Stetler-Stevenson WG, Borwn PD, Onisto M, Levy AT, Liotta LA. Tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2) mRNA expression in tumor cell lines and human tumor tissues. *J Biol Chem*. 1990; 265: 13933-8.
- Stickel F, Schuppan D, Hahn EG, Seitz HK. Cocarcinogenic effects of alcohol in hepatocarcinogenesis. *Gut*, 2002; 51: 132-139.
- Sun XM, Dong WG, Yu BP, Luo HS, Yu JP. Detection of type collagenase activity in malignant ascites. *World J. Gastroenterol*. 2003; 9: 2592-5.
- Takada A, Jinichi N, Shujiro T, Matsuda Y. Effects of ethanol on experimental hepatocarcinogenesis. *Hepatology*, 1986; 6: 65-72.
- Tamano S, Merlino GT, Ward JM. Rapid development of hepatic tumors in transforming growth factor alpha transgenic mice associated with increased cell proliferation in precancerous hepatocellular lesions initiated by N-nitrosodiethylamine and promoted by phenobarbital. *Carcinogenesis*, 1994; 15: 1791-98.
- Tanaka T, Hirota Y, Kuriyama M, Nishiguchi S, Otani S. Time course of change in glutathione S-transferase positive foci and ornithine decarboxylase activity after cessation of long-term alcohol administration in rats. *Asian pacific Journal of Cancer Prevention*, 2001; 2: 131-134.
- Tanaka T, Nishikawa A, Iwata H, Mori Y, Hara A, Hirono I, Mori H. Enhancing effect of ethanol on aflatoxin B1-induced hepatocarcinogenesis in male ACI/N rats. *Jpn J Cancer Res*, 1989; 80: 526-30.

- Tatematsu M, Nagamine Y, Farber E. Redifferentiation as a basis for remodeling of carcinogen-induced hepatocyte nodules to normal appearing liver. *Cancer Res*, 1983; 43: 5049-58.
- Tatematsu M, Mera y, Inoue T, Satoh K, Sato K, Ito, N. Stable phenotypic expression of glutathione S transferase placental type and unstable phenotypic expression of  $\gamma$ -glutamyltransferase in rat liver preneoplastic and neoplastic lesions. *Carcinogenesis*, 9: 2115-220, 1988.
- Tatsuta M, Iishi H, Baba M, Yano H, Iseki K, Uehara H, Nakaizumi A. Enhancement by ethyl alcohol of experimental hepatocarcinogenesis induced by N-nitrosomorpholine. *Int J Cancer*, 1997; 71: 1045-48.
- Tee L B, Kirilak Y, Huang W H, Morgan R H, Yeoh G C. Differentiation of oval cells into duct-like cells in preneoplastic liver of rats placed on a choline-deficient diet supplemented with ethionine. *Carcinogenesis* 1994; 15: 2747 –56.
- Teschke R, Minzlaff M, Oldiges H, Frenzel H. Effect of chronic alcohol consumption on tumor incidence due to dimethylnitrosamine administration. *J Cancer Res Clin Oncol*, 1983; 106: 58-64.
- Th  ret N, Musso O, L'Helgoualch  h A, Campion JP, Cl  ment B. Differential expression and origin of membrane-type 1 and 2 matrix metalloproteinases (MT-MMPs) in association with MMP-2 activation in injured human livers. *Am J Pathol*. 2000; 153: 945-54.
- Thomas DM, Nasim MM, Gullick WJ, Alison MR. Immunoreactivity of transforming growth factor alpha in the normal adult gastrointestinal tract. *Gut*, 1992; 33: 628-31, 1992.
- Tiwawech D, Hasegawa R, Kurata Y, Tatematsu M, Shibata MA, Thamavit W. Dose-dependent effects of 2-acetylaminofluorene on hepatic foci development and cell proliferation in rats. *Carcinogenesis*, 1991; 12: 985-90.
- Tsutsumi T, Matsuda Y, Takada A. Role of ethanol-inducible cytochrome P-450 2E1 in the development of hepatocellular carcinoma by the chemical carcinogen, N-Nitrosodimethylamine. *Hepatology*, 1993; 18: 1483-1489.
- Voight MD. Alcohol in hepatocellular cancer. *Clin Liver Dis*, 2005; 9: 151-69.

- Vu TH, Werb Z. Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. *Genes and Dev.* 2000; 14: 2123-33.
- Wang DR, Sato M, Li LN, Miura M, Kojima N, Senoo H. Stimulation of proMMP-2 production and activation by native form of extracellular type I collagen cultured hepatic stellate cells. *Cell Structure and Function.* 2003; 28: 505-13.
- Wang DR, Sato M, Sato T, Kojima N, Higashi N, Senoo H. Regulation of matrix metalloproteinase expression by extracellular matrix components in cultured hepatic stellate cells. *Comparative Hepatology.* 2004; 3: 20-2.
- Wanibuchi H, Wei M, Karim MR, Morimura K, Doi K, Kinoshita A, Fukushima S. Existence of no hepatocarcinogenic effect levels of 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline with or without coadministration with ethanol. *Toxicol Pathol.* 2006; 34: 232-6.
- Watkins LF, Levine AE. Differential role of transforming growth factor- $\alpha$  in two human colon-carcinoma cell lines. *Int J Cancer.* 1991; 47: 455-60.
- Willner IR, Reuben A. Alcohol and the liver. *Current Opinion in Gastroenterology* 2005, 21: 323-330.
- Woessner JF. The family of matrix metalloproteinases. *Ann N. Y. Acad. Sci.* 1994; 732: 11-21.
- Wogan GN, Hecht SS, Felton JS, Conney AH, Loeb LA. Environmental and chemical carcinogenesis. *Semin Cancer Biol.* 2004; 14:473-86.
- Xu GF, Li PT, Wang XY, Jia X, Tian DL, Jiang LD, Yang JX. Dynamic changes in the expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors, TIMPS, during hepatic fibrosis induced by alcohol in rats. *World Journal of Gastroenterology.* 2004; 10: 3621-27.
- Yamagiwa K, Higashi S, Mizumoto R. Effect of alcohol ingestion on carcinogenesis by synthetic estrogen and progestin in the rat liver. *Jpn J Cancer Res.* 1991; 82: 771-78.
- Yamagiwa K, Mizumoto R, Higashi S, Kato H, Tomida T, Uehara S, Tanigawa K, Tanaka M, Ishida N. Alcohol ingestion enhances hepatocarcinogenesis induced by synthetic estrogen and progestin in the rat. *Cancer Detect Prev.* 1994; 18: 103-14.

- Yamasaki H, Mironov N. Genomic instability in multistage carcinogenesis. *Toxicol Lett*, 2000; 15: 112-113: 251-6.
- Yu M, Yuan JM. Environmental factors and risk for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, 2004; 127: S72-S78.
- Zar JH. *Biostatistical Analysis*. 2<sup>nd</sup> ed. Englewood Cliffs: Prentice Hall 1984.
- Zeng ZS, Cohen AM, Guillem JG. Loss of basement membrane type IV collagen is associated with increased expression of metalloproteinases 2 and 9 (MMP-2 and MMP-9) during human colorectal tumorigenesis. *Carcinogenesis*, 1999; 20: 749-55.