TÂNIA CRISTINA LIMA PORTELA

**ASPECTOS MORFOLÓGICOS E MOLECULARES DO
MODELO EXPERIMENTAL DA TIOACETAMIDA NO
ESTUDO DA HEPATOCARCINOGENESE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Biologia Celular e Tecidual do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do
título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2014

TÂNIA CRISTINA LIMA PORTELA

**ASPECTOS MORFOLÓGICOS E MOLECULARES DO
MODELO EXPERIMENTAL DA TIOACETAMIDA NO
ESTUDO DA HEPATOCARCINOGENESE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Biologia Celular e Tecidual do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do
título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Machado Cunha da Silva

Versão original

São Paulo
2014

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Portela, Tânia Cristina Lima.

Aspectos morfológicos e moleculares do modelo experimental da tioacetamida no estudo da hepatocarcinogênese / Tânia Cristina Lima Portela. -- São Paulo, 2014.

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Machado Cunha da Silva.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento. Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual. Linha de pesquisa: Carcinogênese hepática.

Versão do título para o inglês: Morphological and molecular aspects of the experimental model of thioacetamide in the study of hepatocarcinogenesis.

1. Hepatocarcinogênese 2. Cirrose hepática 3. Tioacetamida 4. Modelo experimental 5. Lesões pré-neoplásicas 6. Ratos I. Silva, Prof. Dr. José Roberto Machado Cunha da II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual III. Título.

ICB/SBIB0210/2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Tânia Cristina Lima Portela.

Título da Tese: Aspectos morfológicos e moleculares do modelo experimental da tioacetamida no estudo da hepatocarcinogênese.

Orientador(a): Prof. Dr. José Roberto Machado Cunha da Silva.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 - telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **100** nas fls. **75** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) José Roberto Machado Cunha da Silva, Coordenador(a) da Linha de pesquisa **Caracterização de modelo de hepatocarcinogênese pela tioacetamida em ratos** do qual participou(aram) o(s) alunos **Tânia Cristina Lima e o pesquisador Francisco Javier Hernandez Blazquez**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA)** em **03.09.09**, com validade de 3 anos.

São Paulo, 03 de setembro de 2009.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEEA - ICB/USP

Profa. Dra. PATRÍCIA GAMA
Secretária
CEEA - ICB/USP

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 e-mail: cep@icb.usp.br

Of.CEUA.077.12

WTL/mcgn

São Paulo, 25 de setembro de 2012.

REF.: Protocolo nº 100/09.

"Caracterização de modelo de hepatocarcinogênese pela tioacetamida em ratos"

Prezado Professor,

Informo que a sua licença para uso de animais em experimentação, constante no protocolo em epígrafe, **foi prorrogada até 25.08.2015.**

Reitero que havendo alteração de metodologia e inserção de novos alunos ao projeto de pesquisa vinculado à referida licença a CEUA/ICB deverá ser informada.

Cordialmente,

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador- CEUA-ICB/ /USP

Ilmo.Sr.

Prof. Dr. **José Roberto Machado Cunha da Silva**

Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento - ICB/USP

A Deus,

Por todas as dádivas que me concedeu durante a vida,
pela fortaleza e esperança nos momentos mais difíceis,
pela fé que se renova a cada dia e me mantém firme nessa jornada.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Aos meus pais, Jesus Barreira Lima e Ivani Ferreira do Nascimento Lima

Pelo amor e pelo apoio dedicado em todos os momentos da minha vida, pela confiança que depositaram em mim até quando eu mesma não acreditei que seria capaz, por serem o meu exemplo de trabalho, honestidade, caráter e união. Por vocês, busco a cada dia ser uma pessoa melhor.

Ao meu marido, Carlos Portela

Por estar ao meu lado ao longo desses 8 anos sendo meu namorado, meu colega de trabalho, meu amigo, meu professor e, às vezes, até o meu carrasco, mas sei que é por querer o melhor para mim; obrigada por seu amor, sua paciência e seu incentivo, por ser o meu porto seguro e pela família linda que hoje nós somos.

Ao meu filho, Antonio Carlos Lima Portela

Que se tornou a razão de tudo isso, por compreender meu empenho neste trabalho e minhas ausências, por abater os meus momentos de desânimo apenas com seu sorriso inocente. Que Deus me dê forças para continuar nesta batalha, pois as conquistas serão sempre suas.

Aos animais que possibilitaram este trabalho, todo o meu respeito e gratidão por essas criaturas de Deus que colaboram com o desenvolvimento do Homem.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao Prof. Dr. José Roberto Machado Cunha da Silva,

Pelo acolhimento, presteza e amizade com que me recebeu, pela confiança no meu trabalho e na capacidade que eu não sabia que tinha, pela compreensão nos momentos de dificuldade e por ter mudado a minha visão da vida profissional.

Ao Prof. Dr. Francisco Javier Hernandez Blazquez,

Por todos os ensinamentos que trago comigo desde o mestrado, pelo exemplo de pessoa e de profissional.

À Profa. Dra. Maria Lúcia Zaidan Dagli,

Pela grande colaboração prestada no decorrer deste trabalho, por ter aberto as portas do seu laboratório sempre que precisamos.

Ao Prof. Dr. Bruno Cogliati,

Pela ajuda inestimável desde a concepção deste projeto, por sua paciência, compreensão e prestatividade em todos os momentos; pelo exemplo de perseverança e objetividade na vida profissional, pois me orgulho de que tenhamos começado essa colaboração como colegas de pós-graduação e hoje possa te agradecer entre os professores que compõem esse grupo de trabalho.

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

- Ao Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (USP), onde foi desenvolvido este curso de Pós-Graduação.
- Ao Instituto de Ciências Biomédicas, em cujos laboratórios e demais dependências foi desenvolvida esta pesquisa.
- À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP) onde foram realizadas algumas das técnicas constantes neste trabalho.
- Aos funcionários da biblioteca do ICB, por toda a colaboração nas buscas, pesquisas, empréstimos, normatização e demais serviços.
- Aos funcionários dos diversos setores do ICB/USP: em especial a Emília Ribeiro do Laboratório de Histofisiologia Evolutiva, sempre disposta a ajudar, colaborando com sua experiência, e aos funcionários da unidade, entre eles: Sr. Peninha, Claudio, Fernando, Marley e Brás pelo apoio e disposição.
- À empresa Inopat, representada pelas funcionárias Margareth e Izabella, que contribuíram para as técnicas de imuno-histoquímica apresentando novos produtos e metodologias que foram de grande valia.
- À empresa Biogen pela grande ajuda na padronização das técnicas de imuno-histoquímica e pelo apoio em diversas etapas deste trabalho. Obrigada Elisabeth, pelo empenho pessoal quando precisei do suporte técnico da empresa; Marcos Parmesan, pela prestatividade com que sempre atendeu aos pedidos; Marcos Begnami, pela disponibilidade e paciência na análise das lâminas digitalizadas.
- Meus agradecimentos ao apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) - Proc. no 2010/51686-1; 2010/51719-7.

AGRADECIMENTOS PESSOAIS

- Aos Professores e Pesquisadores do Departamento de Patologia da FMVZ, em especial a Dra. Tereza Cristina da Silva e Dra. Elisangela dos Anjos Silva, pela amizade e pela ajuda nas técnicas de RT-PCR.
- À atual mestranda, mas minha sempre querida IC, Cintia Maria Monteiro de Araújo, por sua amizade, seu companheirismo e seu bom humor; por sua valiosa ajuda em todas as etapas desse trabalho.
- Aos Professores, em especial Heidge Fukumasu, Vanessa Moraes Freitas e Gláucia Maria Machado-Santelli pelas grandes contribuições oferecidas no exame de qualificação.
- Ao Professor Dr. Venâncio Avancini, da FMUSP, por compartilhar seus conhecimentos sobre o fígado.
- Aos secretários do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento do ICB: Regina Cássia Valbom, Celiana Marchiori, Paulo Vinicius Galvão Ambrosio, Virginia Miguel Gonçalves, Eloise Piva Cícero de Sá e Ana Lúcia Teixeira de Lima Mota, pela atenção e ajuda nos trâmites e burocracias quando precisei.
- A todos os colegas do Laboratório de Histofisiologia Evolutiva, pelo carinho e apoio: Alfonso Braga Bartolini Salibeni Vivai, Aline Diniz, Debora Alves Leite Figueiredo, Douglas Amaral dos Santos, Gabriel Neto, Joana Mona e Pinto, Karina Fernandes Oliveira Rezende, Ligia Maria Salvo, Luciana Dzik, Paola Cristina Branco, Renan Evaristo, Renata Stecca Iunes, Andrews Krupinski Emerenciano, Leandro Nogueira Pressinotti, Ricardo Moraes Borges e João Carlos Shimada Borges e demais colegas do laboratório.
- Aos amigos da Pós-graduação pela troca de experiências e pela agradável companhia: Eloiza Rezende, Fabio Feitosa, Felipe da Costa Souza, Pollyana Stevanato, Fernanda Serachi, Lazaro Oliveira, Carla Bandeira, Maraysa Melo, Tatiane Kanno e Tatiani Donato.
- A amigos muitos especiais, fora do trabalho: Luciana, Gilberto e Darlan (desde a infância); Ana Lúcia e Marcos (desde a graduação); Fábio Silveira, Terezinha, Ronaldo, Adriana, Alexandre, Sérgio, Ana Lúcia, Fábio Santana e Ricardo (amigos que ganhei em São Paulo) e, em especial, Carlos e Vanessa, pelo apoio, companhia e diversão de sempre.
- À minha madrinha de casamento, vizinha, colega de trabalho, colaboradora, conselheira e sempre amiga, Ana Paula da Silva, pelo carinho e dedicação ao me ajudar neste trabalho e em tantas etapas da minha vida, pelo seu exemplo de força e persistência.

RESUMO

LIMA-PORTELA, T. C. **Aspectos morfológicos e moleculares do modelo experimental da tioacetamida no estudo da hepatocarcinogênese.** 2014. 163 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Tecidual) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

O carcinoma hepatocelular (CHC) é a principal causa de morte em pacientes com cirrose hepática. O prognóstico para o CHC é muito pobre; trata-se de um tumor agressivo que progride rapidamente e, portanto, o diagnóstico precoce é o único meio de aumentar a sobrevida dos pacientes. O presente estudo sugere a tioacetamida (TAA) como modelo experimental de carcinogênese no microambiente cirrótico e busca identificar os mecanismos iniciais do desenvolvimento tumoral durante a cirrose. Neste trabalho, ratos Wistar machos foram injetados com TAA i.p. 3 vezes/semana por 14, 21 e 35 semanas. Foram examinados os efeitos sobre a função hepática, morfologia, desenvolvimento e características de lesões pré-neoplásicas (LPNs), bem como expressão tecidual e gênica dos marcadores tumorais mais comuns no CHC. O tratamento com TAA promoveu alterações que compreenderam a deposição de tecido cicatricial com desenvolvimento de cirrose hepática, inflamação, aumento da proliferação celular e da apoptose, desenvolvimento de LPNs e modificações na expressão dos marcadores tumorais. As alterações celulares e estruturais do tecido hepático resultaram em redução do ganho de peso dos animais e aumento do peso e do volume do fígado, proporcional ao tempo de tratamento. O índice de atividade histológica foi maior no fígado cirrótico e alcançou maior valor após 35 semanas de tratamento. Marcadores sanguíneos de lesão hepática aumentaram nos animais tratados ao passo que os marcadores de função mostraram melhora com o passar do tempo. Os níveis de alfa-fetoproteína foram maiores após 14 semanas de tratamento. A administração de TAA por 21 semanas resultou em maior número de LPNs, com predomínio de lesões persistentes sobre remodelantes em número e tamanho. A proliferação celular foi exacerbada nos fígados cirróticos sendo mais elevada em 14 semanas e apresentando redução significativa após 35 semanas. O número de corpúsculos apoptóticos foi maior no tecido cirrótico e a apoptose foi mais pronunciada em 21 semanas. O painel imuno-histoquímico composto por GPC3, HSP70 e GS demonstrou maior positividade para a combinação HSP70+GS, uma vez que a expressão de GPC3 foi baixa em todos os grupos. A análise dos marcadores moleculares GPC3, survivina e LYVE1 concordou com os resultados das LPNs. A expressão gênica de survivina foi maior em 14 semanas, quando foi observada também maior proliferação, e diminuiu ao longo do tratamento. A expressão de LYVE1 diminuiu nos grupos de 14 e 21 semanas, porém, foi significativamente elevada em 35 semanas. A partir desses resultados, concluímos que o modelo da TAA foi adequado para a indução de cirrose e para o desencadeamento da hepatocarcinogênese. As fases de iniciação e promoção foram identificadas em todos os períodos avaliados, entretanto, a TAA mostrou-se uma importante ferramenta para a fase de promoção aumentando a proliferação celular e o tamanho das LPNs. O tratamento por 21 semanas foi o mais eficaz em aliar a iniciação e promoção da hepatocarcinogênese, como mostrado pelo número e pelo tamanho das lesões. Contudo, nenhum grupo desenvolveu CHC indicando que a TAA, provavelmente, necessita ser associada com outras substâncias tendo em vista seu principal efeito como agente promotor.

Palavras-chave: Hepatocarcinogênese. Cirrose hepática. Tioacetamida. Modelo experimental. Lesões pré-neoplásicas. Ratos.

ABSTRACT

LIMA-PORTELA, T. C. **Morphological and molecular aspects of the experimental model of thioacetamide in the study of hepatocarcinogenesis**. 2014. 163 p. Ph. D. thesis (Cell and Tissue Biology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the main cause of death in patients with liver cirrhosis. The prognosis for HCC is very poor; it is an aggressive tumor that progresses rapidly and therefore early diagnosis is the only way to increase the survival of these patients. This study suggests the thioacetamide (TAA) as experimental model of carcinogenesis in cirrhotic microenvironment and seeks to identify the initial mechanisms of tumor development during cirrhosis. In this study, male Wistar rats were injected ip with TAA 3 times / week for 14, 21 to 35 weeks. We examined the effects on liver function, morphology, characteristics and development of preneoplastic lesions (PNLs), as well as tissue gene expression and the most common tumor markers in HCC. Treatment with TAA made changes that comprised the deposition of scar tissue in the liver cirrhosis, inflammation, increased cell proliferation and apoptosis, PNLs development and changes in the expression of tumor markers. The cellular and structural changes of the liver tissue resulted in reduced weight gain of the animals and an increase in liver weight and volume proportional to the treatment time. The histological activity index was higher in cirrhotic liver and achieved greater value after 35 weeks of treatment. Blood markers of liver damage in the treated animals increased while the function markers showed improvement over time. The alpha-fetoprotein levels were higher after 14 weeks of treatment. The administration of TAA for 21 weeks resulted in a greater number of PNLs, with a predominance of persistent lesions over remodeling lesions in number and size. Cell proliferation was exacerbated in cirrhotic livers and was higher in 14 weeks with a significant reduction after 35 weeks. The number of apoptotic corpuscles was higher in cirrhotic tissue and apoptosis was more pronounced in 21 weeks. Immunohistochemical panel of GPC3, HSP70 and GS showed higher rates of HSP70 + GS combination, since GPC3 expression was low in all groups. The analysis of molecular markers GPC3, surviving, and LYVE1 agreed with the results obtained in the PNLs. Survivin gene expression was higher in 14 weeks, when it was observed also increased proliferation and decreased during treatment. The expression of LYVE1 decreased in groups of 14 and 21 weeks, however, was significantly higher in 35 weeks. From the results obtained, we conclude that the TAA model was suitable for induction of cirrhosis and the onset of hepatocarcinogenesis. The stages of initiation and promotion were identified in all periods, however, the TAA proved to be an important tool for the promotion phase increasing cell proliferation and size of PNLs. Treatment for 21 weeks was more effective in combining the initiation and promotion of hepatocarcinogenesis, as shown by the number and size of the lesions. However, no group has developed HCC indicating that the TAA probably needs to be associated with other substances because its primary effect is like promoting agent.

Keywords: Hepatocarcinogenesis. Liver Cirrhosis. Thioacetamide. Experimental Model. Preneoplastic lesions. Rats.

LISTA DAS ILUSTRAÇÕES

- Quadro 1** - Estadiamento das alterações estruturais relacionadas à hepatite crônica (Ishak et al., 1995)..... 79
- Quadro 2** - Índice de atividade histológica (IAH) relacionado à graduação da hepatite crônica (Ishak et al., 1995). *Não inclui infiltrado inflamatório sinusoidal difuso..... 79
- Figura 1** - Identificação dos núcleos Ki-67 positivos para quantificação automática. Esquerda: LPN com células em proliferação marcadas em cinza chumbo. Direita: MISP desenhado sobre a lesão utilizado para identificar (em vermelho) e quantificar as células em proliferação 84
- Quadro 3** - Assays utilizados para análise da expressão gênica dos marcadores tumorais por RT-PCR em tempo real..... 87
- Figura 2** - Ganho de peso dos animais durante o experimento. T14: 14 semanas de TAA; C14: controle; T21: 21 semanas de TAA; C21: controle; T35: 35 semanas de TAA; C35: controle..... 90
- Figura 3** - Curva de sobrevivência dos grupos experimentais. T14: 14 semanas de TAA; T21: 21 semanas de TAA; T35: 35 semanas de TAA 91
- Figura 4** - Parâmetros biométricos e índices relativos à massa hepática, corporal e visceral dos grupos ($p < 0,05$). (*) representa diferença estatística Controle x TAA..... 93
- Figura 5** - Fotografia apresentando aspectos macroscópicos do fígado. (A) Grupo controle. (B) Grupo T14: superfície relativamente regular com nódulos pequenos e esparsos. (C) Grupo T21: intensa nodulação. (D) e (E) Grupo T35: nódulos regenerativos de diferentes tamanhos cobrem toda a superfície. Seta preta: nódulo regenerativo; seta azul: vaso sanguíneo; cabeça de seta: manchas de sangue; seta branca: massa tumoral em região necrosada do lobo hepático. Barras de escala: 1,5 cm..... 95
- Figura 6** - Índice de atividade histológica (IAH) dos grupos controle e grupos tratados com TAA ($p < 0,05$). (*) representa diferença estatística Controle x TAA 96
- Figura 7** - Fotomicrografias do tecido hepático: deposição de colágeno. (A) Grupo controle: espaços porta (seta superior) dispostos ao redor de uma veia central (seta inferior). (B) Grupo T14: espaços porta (setas estreitas) em nódulos regenerativos (N) circundados por septos fibrosos (seta larga); fibrose portal (asterisco). (C) Grupo T21: nódulos delimitados por septos (seta); fibrose portal formando pontes (asterisco). (D) Grupo T35: fibrose em ponte (seta) com expressiva deposição de colágeno. (E) Parênquima hepático normal: fibras colágenas adjacentes aos sinusóides (setas); à direita, há um espaço porta. (F) Ausência de fibras colágenas no parênquima do nódulo; no centro observa-se um septo fibroso. Coloração: Picrosírius. Barras de escala: A – D: 300 μ m; E e F: 50 μ m..... 98

- Figura 8** - Fotomicrografias do tecido hepático: arquitetura do fígado normal. (A) Formato aproximado de um conjunto de lóbulos hepáticos. (B) Tríade portal: ramo da veia porta (asterisco), ramo da artéria hepática (seta larga) e ducto biliar (seta estreita). Coloração HE. Barras de escala: A (300 µm) e B (200 µm)..... 99
- Figura 9** - Fotomicrografias do tecido hepático: alterações do fígado cirrótico. (A) Hepatite de interface em fase inicial. (B) Hepatite de interface em estágio avançado. (C) Fibrose portal e septos com grande quantidade de células. (D) Septo fibroso com grande quantidade de células inflamatórias difusas e um infiltrado inflamatório focal (seta). (E) Necrose do tecido hepático. (F) Área de necrose (à direita) mostrando a interface com o parênquima íntegro. Coloração HE. Barras de escala: A, B e F (100 µm); C (300 µm); D e E (200 µm)..... 100
- Figura 10** -Fotomicrografias do tecido hepático: alterações do fígado cirrótico. (A) Infiltrado inflamatório focal (setas). (B) Infiltrado inflamatório mononuclear (linfocitário). (C) Infiltrado inflamatório polimorfonuclear com predomínio de neutrófilos (setas). (D) Área com esteatose no centro da imagem e infiltrado inflamatório focal (seta) no canto superior direito. (E) Hepatócitos contendo gotículas de gordura no citoplasma. (F) Células ovais (setas). Coloração HE. Barras de escala: A e D (200 µm); B, C e F (30 µm); E (100 µm)..... 102
- Figura 11** -Fotomicrografias do tecido hepático: alterações do fígado cirrótico. (A) Grupo de hepatócitos com esteatose (seta) ao lado de uma área de hepatócitos balonizados (cabeças de seta). (B) Área de hepatócitos balonizados (setas) em maior aumento. (C) Corpúsculo apoptótico (seta). (D) Proliferação de ductos biliares. (E) Proliferação de ductos biliares com dilatação da luz. (F) Pseudoglandulas ou rosetas (setas). Coloração HE. Barras de escala: A e F (100 µm); B e C (50 µm); D e E (200 µm)..... 104
- Figura 12** -Fotomicrografias do tecido hepático: distribuição das fibras reticulares no fígado. (A) Fibras reticulares (coradas em negro) no fígado sadio. (B) Fígado sadio exibindo a rede de fibras reticulares do parênquima hepático. (C) Fígado cirrótico: fibras reticulares presentes nos septos fibrosos. (D) Parênquima de fígado cirrótico: as fibras se tornaram escassas. (E) Fígado de porco utilizado como controle positivo da reação. Coloração: impregnação por prata (reticulina). Barras de escala: 20 µm..... 106
- Figura 13** -Lesões pré-neoplásicas no fígado cirrótico. (A) Lesão persistente. (B) Lesão remodelante. Imuno-histoquímica dupla para GST-P (citoplasmática) e Ki-67 (nuclear). Barras de escala: A (100 µm) e B (200 µm). 111
- Figura 14** -Número de lesões pré-neoplásicas (LPNs) no fígado cirrótico ($p<0,05$) 112
- Figura 15** -Área das lesões pré-neoplásicas (LPNs) no fígado cirrótico ($p<0,05$) 112

- Figura 16** -Fotomicrografias do tecido hepático: imuno-histoquímica de dupla marcação para LPNs (anti-GST-P: citoplasmática) e proliferação celular (anti-Ki-67: nuclear). (A) Fígado sadio. (B) Fígado cirrótico: parênquima de LPN. (C) Fígado cirrótico evidenciando LPN, ao centro, e o tecido adjacente GST-P negativo. (D) Diferente padrão de positividade à GST-P das lesões persistentes (LPNp) e remodelantes (LPNr). Barras de escala: A e C: 200 µm; B: 100 µm; D: 500 µm..... 113
- Figura 17** -Proliferação celular nas lesões pré-neoplásicas (LPN) e no tecido adjacente no fígado cirrótico ($p<0,0002$)..... 114
- Figura 18** -Proliferação celular nas diferentes regiões do fígado cirrótico: lesões pré-neoplásicas persistentes (LPNp), remodelantes (LPNr) e tecido adjacente ($p<0,05$) 114
- Figura 19** -Porcentagem de células positivas ao TUNEL no fígado dos grupos controle e tratados com TAA ($p<0,01$) 115
- Figura 20** -Porcentagem de células positivas ao TUNEL nas lesões pré-neoplásicas e no tecido adjacente dos grupos ($p<0,05$) 115
- Figura 21** -Fotomicrografias do tecido hepático: dupla marcação para detecção de apoptose (TUNEL: nuclear) e de lesões pré-neoplásicas (GST-P: citoplasmática). (A) Fígado sadio. (B) Fígado cirrótico mostrando lesão pré-neoplásica. (C) Núcleos marcados no parênquima pré-neoplásico – GST-P positivo. (D) Núcleos marcados no parênquima adjacente – GST-P negativo. (E) Controle positivo da reação de TUNEL. (F) Controle negativo da reação de TUNEL. Barras de escala: 20 µm 116
- Figura 22** -Proporção de corpúsculos apoptóticos. (A) Comparação da apoptose em cada região do tecido hepático dos grupos ($p<0,01$). (B) Comparação da apoptose na mesma região entre os grupos ($p<0,05$) 117
- Figura 23** -Fotomicrografias do tecido hepático mostrando apoptose em cada região analisada. (A) Fígado sadio. (B) Tecido adjacente à LPN. (C) Lesão persistente. (D) Lesão remodelante. Setas indicam corpúsculos apoptóticos. Imuno-histoquímica para GST-P seguida por HE. Barras de escala: 20 µm 118
- Figura 24** -Teste ELISA para AFP dos grupos controle e dos grupos tratados com TAA..... 119
- Figura 25** -Fotomicrografias do tecido hepático: imuno-histoquímica anti-β-catenina. (A) Fígado sadio apresentando marcação na membrana. (B) Grupo T14: a intensidade da marcação é próxima à do grupo controle. (C) Grupo T21: β-catenina ligeiramente reduzida na membrana. (D) Grupo T35: diminuição da intensidade da marcação na membrana. (E) e (F) Fígado cirrótico com estruturas semelhantes a corpúsculos apoptóticos fortemente positivas para β-catenina. Barras de escala: 20 µm 120

Figura 26 -Fotomicrografias do tecido hepático: imuno-histoquímica anti-HSP70. (A) Controle negativo da reação. (B) Fígado sadio sem expressão de HSP70. (C) Fígado cirrótico: região com expressão de HSP70 (marrom). (D) Grupo T14: interface de uma área positiva para HSP70 (acima) e uma área negativa (abaixo). (E) Grupo T21: observar menor expressão de HSP70, no nódulo à direita, comparado com 14 semanas. (F) Grupo T35: HSP70 expressa difusamente pelo tecido. Barras de escala: A (20 µm); B – F (100 µm)..... 123

Figura 27 -Fotomicrografias do tecido hepático: imuno-histoquímica anti-GPC3. (A) Controle negativo da reação. (B) Fígado sadio: GPC3 em hepatócitos próximos a uma veia centrolobular. (C) Grupo T14: GPC3 nas células arranjadas em cordões. (D) e (E) Grupo T21: GPC3 em células próximas a vasos sanguíneos; observar a disposição canalicular da proteína. (F) Grupo T35: baixa expressão de GPC3. Barras de escala: A (100 µm); B – F (20 µm)... 124

Figura 28 -Fotomicrografias do tecido hepático: imuno-histoquímica dupla anti-GS e anti-GST-P. (A) Fígado sadio: localização da GS nos hepatócitos de zona 3. (B) Fígado cirrótico com marcação de GS na periferia dos nódulos regenerativos. (C), (D) e (E) Fígado cirrótico com dupla marcação imuno-histoquímica para GS e GST-P: as LPNs também apresentam marcação de GS nos hepatócitos periféricos. (F) Área de necrose no fígado cirrótico apresentando células simultaneamente positivas para ambos os marcadores. Barras de escala: (100 µm) 125

Figura 29 -Expressão gênica de GPC3 relativa ao grupo controle nos diferentes períodos de tratamento. (A) Comparação entre o grupo experimental e o grupo controle. (B) Comparação entre os grupos experimentais (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).. 126

Figura 30 -Expressão gênica de survivina relativa ao grupo controle nos diferentes períodos de tratamento. (A) Comparação entre o grupo experimental e o grupo controle. (B) Comparação entre os grupos experimentais (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) 126

Figura 31 -Expressão gênica de LYVE1 relativa ao grupo controle nos diferentes períodos de tratamento. (A) Comparação entre o grupo experimental e o grupo controle. (B) Comparação entre os grupos experimentais (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$)..... 127

LISTA DAS TABELAS

Tabela 1 -	Delineamento experimental do modelo de hepatocarcinogênese pela TAA	77
Tabela 2 -	Anticorpos e métodos utilizados para a marcação imuno-histoquímica	82
Tabela 3 -	Parâmetros avaliados para análise do índice de atividade histológica (IAH) segundo critérios estabelecidos por Ishak et al. (1995).....	97
Tabela 4 -	Níveis plasmáticos dos marcadores sanguíneos de função e lesão hepática em 14 semanas de tratamento.....	107
Tabela 5 -	Níveis plasmáticos dos marcadores sanguíneos de função e lesão hepática em 21 semanas de tratamento.....	108
Tabela 6 -	Níveis plasmáticos dos marcadores sanguíneos de função e lesão hepática em 35 semanas de tratamento.....	108
Tabela 7 -	Níveis plasmáticos dos marcadores sanguíneos de função e lesão hepática nos grupos controle	109
Tabela 8 -	Níveis plasmáticos dos marcadores sanguíneos de função e lesão hepática nos grupos tratados com TAA	110
Tabela 9 -	Porcentagem da área total do tecido hepático ocupada por lesões pré-neoplásicas persistentes (LPNp) e remodelantes (LPNr)	111
Tabela 10 -	Proliferação celular total no fígado: contagem de células Ki-67 positivas (núcleos/mm ²).....	113
Tabela 11 -	Apoptose das células hepáticas: corpúsculos apoptóticos/1000 células	117
Tabela 12 -	Expressão dos marcadores tumorais do painel imuno-histoquímico: porcentagem de cortes positivos	122

LISTA DE SIGLAS DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

C14 - Grupo **Controle** injetado com solução salina por 14 semanas.

C21 - Grupo **Controle** injetado com solução salina por 21 semanas.

C35 - Grupo **Controle** injetado com solução salina por 35 semanas.

T14 - Grupo Experimental injetado com **Tioacetamida** por 14 semanas.

T21 - Grupo Experimental injetado com **Tioacetamida** por 21 semanas.

T35 - Grupo Experimental injetado com **Tioacetamida** por 35 semanas.

LISTA DE SIGLAS

- 2-AAF:** 2-acetilaminofluoreno
- ADH:** álcool desidrogenase
- AF:** aflatoxina
- AFP:** alfa-fetoproteína
- AH:** adenoma hepatocelular
- ALB:** albumina
- ALKP:** fosfatase alcalina (do inglês *alkaline phosphatase*)
- ALT:** alanina aminotransferase
- AST:** aspartato aminotransferase
- CCl₄:** tetracloreto de carbono
- CES:** células endoteliais sinusoidais
- CHC:** carcinoma hepatocelular
- CK:** células de Kupffer
- CPH:** células progenitoras hepáticas
- CYP2E1:** citocromo P450 2E1
- DAB:** 3'3-diaminobenzidina
- DEN:** dietilnitrosamina
- DNA:** ácido desoxirribonucleico
- EASL:** European Association for the Study of the Liver
- ELISA:** *enzyme-linked immunosorbent assay*
- EORTC:** European Organisation for Research and Treatment of Cancer
- GGT:** gama-glutamyltranspeptidase
- GLOB:** globulina
- GPC3:** glypican-3
- GS:** glutamina sintetase
- GST-P:** glutathione S-transferase forma placentar
- HE:** hematoxilina-eosina
- HIV:** *human immunodeficiency virus*
- HNF:** hiperplasia nodular focal
- HSC:** células estreladas hepáticas (do inglês *hepatic stellate cells*)
- HSP70:** *heat shock protein 70*

IAH: índice de atividade histológica

LPN: lesão pré-neoplásica

LPS: lipopolissacarídeo

LYVE1: *lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor*

MEC: matriz extracelular

MMPs: metaloproteinases de matriz

NAFLD: doença hepática gordurosa não alcoólica (inglês: *non-alcoholic fatty liver disease*)

NASH: esteato-hepatite não alcoólica (do inglês *non-alcoholic steatohepatitis*)

ND: nódulo displásico

NF- κ B: *nuclear factor kappa B*

PBS: *phosphate buffered saline*

PBST: *phosphate buffered saline and Tween 20*

RT-PCR: transcriptase reversa seguida de reação em cadeia da polimerase

PDGF: fator de crescimento derivado de plaquetas (do inglês *platelet-derived growth factor*)

RNA: ácido ribonucleico

ROS: espécies reativas de oxigênio (do inglês *reactive oxygen species*)

TAA: tioacetamida

TBIL: bilirrubina total

TdT: terminal deoxynucleotidyl transferase

TGF- β : fator de crescimento transformador beta

TMB: tetrametilbenzidina

TNF α : fator de necrose tumoral alfa

TP: proteína total

TUNEL: *terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*

VEGF: fator de crescimento do endotélio vascular (inglês: *vascular endothelial growth factor*)

VHB: vírus da hepatite B

VHC: vírus da hepatite C

VLDL: lipoproteína de muito baixa densidade

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	24
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	29
2.1 O FÍGADO	30
2.1.1 Anatomia	30
2.1.2 Função	30
2.1.3 Estrutura.....	31
2.1.4 Circulação.....	32
2.1.5 Histologia.....	33
2.1.5.1 <i>Hepatócitos</i>	33
2.1.5.2 <i>Células endoteliais sinusoidais</i>	34
2.1.5.3 <i>Células de Kupffer</i>	35
2.1.5.4 <i>Células estreladas</i>	36
2.1.5.5 <i>Células progenitoras</i>	38
2.2 DOENÇAS HEPÁTICAS CRÔNICAS	39
2.2.1 Hepatite B	39
2.2.2 Hepatite C	42
2.2.3 Esteato-hepatite não alcoólica	46
2.2.4 Doença hepática alcoólica	49
2.2.5 Aflatoxicose	51
2.3 FIBROSE E CIRROSE	54
2.4 LESÕES PRÉ-NEOPLÁSICAS.....	56
2.4.1 Macronódulo regenerativo.....	57
2.4.2 Hiperplasia nodular focal.....	57
2.4.3 Adenoma hepatocelular	58
2.4.4 Nódulo displásico	59
2.5 CARCINOMA HEPATOCELULAR.....	60
2.5.1 Hepatocarcinogênese	61
2.5.2 Microambiente.....	62
2.5.3 Biomarcadores	63
2.5.4 Modelos experimentais.....	66
2.5.4.1 <i>Dietilnitrosamina</i>	67

2.5.4.2 Tetracloreto de carbono	68
2.5.4.3 Aflatoxina.....	69
2.5.4.4 Álcool.....	70
2.5.4.5 Tioacetamida	71
3 OBJETIVOS	73
3.1 OBJETIVO GERAL.....	74
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	74
4 MATERIAIS E MÉTODOS	75
4.1 ANIMAIS	76
4.2 MODELO EXPERIMENTAL	76
4.3 ABATE	77
4.4 COLHEITA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS.....	77
4.5 PARÂMETROS BIOMÉTRICOS	77
4.6 MICROSCOPIA DE LUZ.....	78
4.6.1 Colorações	78
4.6.2 Avaliação histopatológica.....	78
4.7 ANÁLISE BIOQUÍMICA.....	80
4.8 ELISA PARA AFP	80
4.9 CARACTERIZAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA.....	80
4.10 DUPLA MARCAÇÃO DE TUNEL E GST-P	82
4.11 CLASSIFICAÇÃO E MORFOMETRIA DAS LESÕES PRÉ-NEOPLÁSICAS	83
4.12 ANÁLISE DA PROLIFERAÇÃO CELULAR.....	84
4.13 QUANTIFICAÇÃO DA APOPTOSE – TUNEL	85
4.14 QUANTIFICAÇÃO DA APOPTOSE – CORPÚSCULOS APOPTÓTICOS	85
4.15 ANÁLISE DO PAINEL IMUNO-HISTOQUÍMICO	85
4.16 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA POR RT-PCR EM TEMPO REAL.....	86
4.16.1 Extração do RNA.....	86
4.16.2 Determinação da integridade e quantificação do RNA total	86
4.16.3 Obtenção do DNA complementar (cDNA)	86
4.16.4 Quantificação da expressão gênica por PCR em tempo real	87
4.17 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	88
5 RESULTADOS	89
5.1 GANHO DE PESO.....	90
5.2 MORTALIDADE	90

5.3 PARÂMETROS BIOMÉTRICOS	91
5.4 AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA	94
5.5 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA	96
5.5.1 Análise quantitativa	96
5.5.2 Análise qualitativa	97
5.6. ANÁLISE BIOQUÍMICA.....	107
5.7 MORFOMETRIA DAS LESÕES PRÉ-NEOPLÁSICAS	110
5.8 PROLIFERAÇÃO CELULAR.....	112
5.9 APOPTOSE	115
5.9.1 Marcação por TUNEL.....	115
5.9.2 Contagem de corpúsculos apoptóticos	117
5.10 MARCADORES TUMORAIS.....	118
5.10.1 Marcador sorológico: AFP	118
5.10.2 Marcadores teciduais	119
5.10.2.1 <i>β-catenina</i>	119
5.10.2.2 <i>HSP70</i>	121
5.10.2.3 <i>GPC3</i>	121
5.10.2.4 <i>GS</i>	121
5.10.2.5 <i>Painel imuno-histoquímico: dois marcadores positivos</i>	122
5.10.3 Marcadores moleculares	126
6 DISCUSSÃO	128
7 CONCLUSÕES.....	145
REFERÊNCIAS.....	147

1 INTRODUÇÃO

O câncer é uma das principais causas de morte no mundo. Em 2012, foi responsável por 8,2 milhões de mortes e estima-se que, em 2020, sua incidência ultrapasse 17 milhões de novos casos. Nesta data, mais de 10 milhões de óbitos serão atribuídos a esta doença (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014). Além disso, há poucos anos, o câncer de fígado constava como a terceira causa de morte por câncer. Entretanto, dados do levantamento GLOBOCAN 2012 registraram cerca de 746.000 mortes (9,1% do total), somente naquele ano, classificando-o em segundo lugar.

O carcinoma hepatocelular (CHC) é o tipo mais comum de câncer primário no fígado. Esta neoplasia corresponde a mais de 80% dos casos de câncer hepático (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2014). Em homens, é o quinto câncer mais comum e o nono, em mulheres. A previsão da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer é que no ano de 2015 a incidência do CHC seja de 846.582 casos com 806.854 mortes e, dentro de 5 anos, incidência e mortalidade atinjam 953.741 e 909.720 casos, respectivamente (IARC, 2014).

A incidência do CHC é maior nos países menos desenvolvidos (83% dos casos) e altas taxas são verificadas na Ásia e na África: até 31,9/100 mil habitantes. O grande número de mortes registrado nestes locais pode ser atribuído à alta prevalência dos fatores de risco na população, à incapacidade em reconhecer sujeitos em risco, falta de boa formação dos profissionais da saúde ou de recursos para o diagnóstico precoce e indisponibilidade de tratamento eficaz após o diagnóstico. Nessas regiões, a infecção pelo vírus da hepatite B (VHB) é endêmica e se constitui na principal causa do CHC. Já nos Estados Unidos (EUA), na América Latina e na Europa, a taxa de incidência é intermediária (>10/100 mil habitantes) e a infecção por vírus da hepatite C (VHC) é a maior responsável por esta neoplasia (FERENCI et al., 2010; GOMES et al., 2013; WHO, 2014).

Os principais fatores de risco para o CHC incluem: infecções por VHB e VHC, consumo abusivo do álcool, esteato-hepatite não alcoólica e exposição à aflatoxina (AF). Em menor escala, hemocromatose, cirrose biliar primária, deficiência de α 1-antitripsina, hepatite autoimune, tirosinose, tabaco e diabetes (relacionada com a síndrome metabólica) também podem levar ao desenvolvimento de CHC. Apesar das infecções virais serem as maiores causas deste tumor, ele está associado à doença hepática seja qual for a sua causa específica (FERENCI et al., 2010; GOMES et al., 2013). A maioria dos pacientes com doença hepática crônica acaba evoluindo, ao longo de décadas, para um quadro de fibrose avançada e cirrose, levando a complicações que incluem encefalopatia, ascite, sangramento por varizes, disfunção da capacidade de síntese hepática e CHC (WALLACE; FRIEDMAN, 2014).

A cirrose hepática, independente da sua etiologia, é o principal fator de risco. Mais de 90% dos casos progridem para CHC, o qual se constitui na principal causa de morte em pacientes com cirrose (BRUIX; GORES; MAZZAFERRO, 2014). Dados da WHO revelaram altas taxas de mortalidade por cirrose em 2012, principalmente em homens, na Ásia, África e América Latina (20 – 99,3/100 mil habitantes). Segundo esta entidade, a mortalidade por cirrose está associada, sobretudo, ao consumo de álcool que pode ser responsável por 20 – 50% dos casos em alguns países. De fato, a taxa de mortalidade tem sido usada, tradicionalmente, como um indicador válido para a detecção de consequências do abuso de álcool para a saúde. No entanto, as infecções virais também são fatores determinantes da cirrose e sua contribuição para os dados epidemiológicos desta doença deve ser considerada com atenção (EUROPEAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF THE LIVER, 2013). Além disso, as infecções virais podem exercer efeito sinérgico sobre outros fatores de risco elevando a incidência do CHC (FORNER; LLOVET; BRUIX, 2012).

Embora no Brasil o CHC não conste entre os 10 tipos de câncer com maior mortalidade, o estudo desta neoplasia é muito importante tanto pela alta incidência quanto pela baixa expectativa de vida. O prognóstico para o CHC é muito pobre fazendo com que as taxas de incidência e de mortalidade sejam semelhantes. É um tumor agressivo, a progressão é rápida e a sobrevida pode ser inferior a um mês, se for detectado apenas na fase sintomática (GOMES et al., 2013). O diagnóstico tardio comumente acontece pela ausência de vigilância e pelo desenvolvimento silencioso da doença que se manifesta por sintomas relacionados com falha hepática. Em estágio avançado não há cura, o tratamento é caro e a sobrevida extremamente curta, pois mesmo uma terapia de prolongamento de vida pode ser impraticável devido ao comprometimento do fígado (FERENCI et al., 2010; SHERMAN, 2010). O único meio de alcançar maior sobrevivência é o diagnóstico numa fase inicial assintomática, quando tratamentos potencialmente curativos são viáveis (TREMOSINI et al., 2012).

Em virtude do grave problema de saúde mundial que as hepatopatias representam, um grande número de trabalhos de pesquisa é realizado pelo mundo todo. Esses estudos têm por finalidade entender os mecanismos fisiológicos, celulares e moleculares dessas doenças que permitam detectá-las precocemente e desenvolver tratamentos em busca da cura ou, pelo menos, do seu melhor manejo aumentando a sobrevida dos pacientes em tempo e qualidade.

A utilização de material humano oferece limitações tanto temporais quanto éticas. A ocorrência e a progressão das doenças hepáticas requerem um longo período – décadas – para o surgimento do tumor. Por outro lado, existem considerações éticas na administração de medicamentos e na colheita de tecidos dos pacientes. À vista disso, os modelos experimentais

constituem valiosas ferramentas para reproduzir as características fenotípicas, biológicas e moleculares do desenvolvimento tumoral. Tais modelos fornecem informações cruciais para elucidar a patogênese da doença e para examinar efeitos terapêuticos de vários agentes. Para tanto, os modelos devem refletir ao máximo a histopatologia e a fisiopatologia da doença humana (NEWELL et al., 2008; TAKAHASHI; SOEJIMA; FUKUSATO, 2012).

Desenvolver modelos experimentais que reproduzam os contextos biológicos e/ou clínicos elementares do CHC é fundamental, face ao crescente reconhecimento da interação complexa entre os vários tipos celulares no microambiente fisiológico hepático (HOSHIDA; FUCHS; TANABE, 2012). A literatura mais recente destaca o *cross-talk* entre células tumorais e o microambiente circundante, o qual desempenha um papel crítico na modulação dos processos de fibrogênese, hepatocarcinogênese, transição epitélio-mesenquimal, invasão tumoral e metástase (YANG; NAKAMURA; ROBERTS, 2011). A compreensão dos mecanismos que levam ao CHC e, especialmente, a influência sistêmica e metabólica sobre eles é essencial para estudos básicos e translacionais. Sem esse conhecimento, o desenvolvimento eficiente de contramedidas preventivas, diagnósticas e terapêuticas estaria fadado ao fracasso (BAKIRI; WAGNER, 2013).

Nenhum modelo animal, no entanto, é ideal para todos os fins. Assim, é necessária uma seleção criteriosa dos modelos disponíveis ou a criação de novos modelos que sejam adequados aos objetivos do estudo (LI; TANG; HOU, 2012). Um modelo animal deve ser reprodutível, confiável, simples e tecnicamente acessível (KUCERA; CERVINKOVA, 2014). Atualmente, os roedores são o *gold standard* para a investigação do câncer devido ao ciclo de vida curto, à capacidade de reprodução, às semelhanças com seres humanos e a quantidade de opções disponibilizadas pela engenharia genética, no caso dos camundongos (De MINICIS et al., 2013). Além disso, os métodos de análise da injúria hepática são semelhantes, e às vezes idênticos, em humanos e animais como testes de sangue, biópsia e exames de imagem não invasivos (LIEDTKE et al., 2013).

Contudo, a maioria dos modelos utilizados na indução da hepatocarcinogênese não reproduz o quadro crônico de cirrose que, geralmente, antecede o CHC em humanos. O microambiente tumoral é um instrumento fundamental no estudo da oncogênese, especialmente para o CHC, no qual a cirrose hepática é a característica histopatológica mais comum e um importante mecanismo da hepatocarcinogênese. A história natural do seu desenvolvimento sublinha a necessidade de um modelo em que o CHC desenvolva-se no microambiente cirrótico, reproduzindo o processo gradual desta doença (FARAZI; DEPINHO, 2006; UEHARA et al., 2013).

A administração de compostos hepatotóxicos oferece um modelo estável de doença hepática e vários agentes químicos podem ser utilizados para este fim. A tioacetamida (TAA) é utilizada rotineiramente para a indução experimental de fibrose e cirrose hepática devido a sua alta toxicidade. O modelo foi originalmente criado em ratos e é bem padronizado para estes animais (LIEDTKE et al., 2013; INGAWALE; MANDLIK; NAIK, 2014). Nos modelos de cirrose, a fibrose hepática e os nódulos regenerativos são mais proeminentes, demonstrando expressiva semelhança com o padrão histológico humano, lembrando as características observadas na cirrose por hepatite viral (AKHTAR; SHEIKH, 2013; KAWAI et al., 2012; LI; BENJAMIN; ALEXANDER, 2002). Apesar de seu potencial carcinogênico ser conhecido (HAJOVSKY et al., 2012), a TAA é pouco utilizada em modelos experimentais de CHC e seu uso é mais comum como agente promotor, sendo administrada em associação com outros elementos (PARK et al., 2001; LIM, 2002).

A desvantagem apontada para a utilização da TAA é o longo tempo de administração, alcançando 50 – 70 semanas (De MINICIS et al., 2013) ou até 2 anos (UEHARA et al., 2013) para o desenvolvimento de tumores. Entretanto, em nosso estudo anterior (LIMA et al., 2008) verificamos que a administração de TAA - por 14 semanas - foi suficiente para produzir lesões pré-neoplásicas (LPNs), indicando que nosso modelo de administração desta substância seria adequado para o estudo da carcinogênese hepática no microambiente da cirrose.

Assim, este trabalho propõe o uso da TAA como modelo experimental de hepatocarcinogênese, promovendo o desenvolvimento de LPNs em microambiente cirrótico e sua transição para o CHC, simulando a origem natural deste tumor em humanos. Espera-se que o modelo permita a identificação de características iniciais do desenvolvimento tumoral, assim como evidências preditivas ainda na cirrose. A caracterização de um modelo que reproduza a patogênese do CHC a partir da cirrose poderá fornecer suporte para novos estudos intervencionistas e desenvolvimento de procedimentos terapêuticos baseados em um diagnóstico mais precoce e preciso.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 O FÍGADO

2.1.1 Anatomia

O fígado é o segundo maior órgão do corpo, superado apenas pela pele (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). Está localizado na porção superior direita da cavidade abdominal, logo abaixo do diafragma, e apresenta quatro lobos. Os dois lobos principais, direito e esquerdo, são separados pelo ligamento falciforme que prende o fígado à parede abdominal ventral e à superfície inferior do diafragma. Os outros dois lobos, quadrado e caudado, são menores e estão situados na porção inferior do lobo direito, onde se encontra também a vesícula biliar (GAYOTTO; ALVES, 2001; HERLIHY; MAEBIUS, 2002). Porém, o número de lobos varia entre as espécies animais.

O fígado do rato apresenta uma aparência mais lobulada do que o do homem com três dos seus quatro lobos possuindo subdivisões. Contudo, os lobos hepáticos são equivalentes entre as duas espécies, pois ambas pertencem à Classe Mammalia e, portanto, apresentam desenvolvimento embriológico semelhante. Os ratos possuem no fígado um lobo esquerdo (único), um lobo direito (dividido em dois sublobos), um lobo médio (dividido em porções esquerda e direita) e um lobo caudado (dividido em lobo de Spiegel e porção paracaval) (KOGURE et al., 1999). O rato não possui vesícula biliar (MARTINS; NEUHAUS, 2007).

2.1.2 Função

Depois do cérebro, o fígado é considerado o segundo órgão mais complexo do corpo. O fígado é um órgão vital responsável pela manutenção de funções metabólicas e pela desintoxicação de agentes endógenos e exógenos (INGAWALE; MANDLIK; NAIK, 2014; MALARKEY et al., 2005). A posição ocupada pelo fígado no sistema circulatório favorece a captura, transformação e acúmulo de metabólitos, assim como neutralização e eliminação de substâncias tóxicas (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

Esse órgão desempenha importantes funções para o organismo, tais como: síntese (proteínas plasmáticas e açúcares), armazenamento (lipídios, glicogênio, vitaminas e minerais), metabolismo (aminoácidos, lipídios e carboidratos), biotransformação (substâncias tóxicas, drogas e hormônios), remoção de micro-organismos e toxinas do sangue esplâncnico a caminho da circulação sistêmica, desintoxicação e excreção na bile de resíduos de produtos endógenos e xenobióticos (BANKS, 1992; CRAWFORD, 2005).

2.1.3 Estrutura

A unidade estrutural e funcional do fígado é o lóbulo hepático (KIERSENBAUM; TRES, 2012). Os lóbulos apresentam um formato poliédrico em cujos vértices estão os espaços porta contendo ductos biliares, vasos sanguíneos, vasos linfáticos e nervos envoltos por uma bainha de tecido conjuntivo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). No espaço porta encontra-se a tríade portal formada por um ramo da veia porta, um ramo da artéria hepática e um ducto biliar. Embora a tríade portal seja definida por estas três estruturas, mais de um ducto biliar ou uma artéria podem estar presentes (MALARKEY et al., 2005).

O lóbulo hepático é constituído por hepatócitos dispostos em placas que se anastomosam e são orientadas radialmente, da periferia para o centro do lóbulo, onde está a veia centrolobular. Essas placas celulares são separadas por capilares sinusóides, os quais são sustentados por uma bainha de fibras reticulares e revestidos por uma camada descontínua de células endoteliais fenestradas. Entre os hepatócitos e o endotélio sinusoidal existe uma lâmina basal descontínua e um espaço subendotelial – o espaço de Disse – contendo microvilosidades dos hepatócitos, que aumentam a superfície de contato celular. As fenestrações do endotélio hepático permitem que fluidos percolem rapidamente dos sinusóides para o espaço de Disse facilitando a troca de macromoléculas na membrana dos hepatócitos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). A linfa resultante dessa percolação é drenada pelos vasos linfáticos presentes nos espaços porta e flui na mesma direção que a bile (GAYOTTO; ALVES, 2001).

A membrana plasmática de hepatócitos adjacentes delimita o canalículo biliar e projeta microvilos em seu interior, para a secreção da bile. Os canalículos biliares se anastomosam ao longo das placas de hepatócitos, formando os canais de Hering, as menores ramificações da árvore biliar intra-hepática. Estas estruturas estão localizadas próximas da região portal e são revestidas parcialmente por hepatócitos e parcialmente por colangiócitos, representando a ligação anatômica e fisiológica entre o sistema canalicular intralobular e a árvore biliar. A bile é conduzida em direção ao espaço porta (na direção contrária do sangue) até os ductos biliares. Estes últimos se fundem gradualmente até formarem o ducto hepático que, por sua vez, leva a bile até a vesícula biliar (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013; KRUITWAGEN; SPEE; SCHOTANUS, 2014; ROSKAMS, 2008).

A arquitetura do parênquima hepático baseada na estrutura do lóbulo é o conceito clássico. Entretanto, há outras interpretações com relação à unidade funcional do fígado.

O conceito do lóbulo portal considera a via de condução da bile a partir do parênquima adjacente para o mesmo ducto biliar. A tríade portal é o eixo central desse lóbulo com os vasos portais suprindo-o centralmente e a veia centrolobular drenando-o na periferia. Outro conceito, o ácino hepático, é baseado no gradiente de distribuição de oxigênio ao longo dos sinusóides de lóbulos adjacentes gerando zonas de hepatócitos entre veias centrolobulares. Esta definição se destacou por representar uma unidade funcional e estrutural que permitiu a explicação de lesões como as pontes de necrose e fibrose. Já o conceito do lóbulo primário é o mais amplamente aceito como a unidade funcional do fígado porque é baseado na arquitetura vascular do sistema venoso portal e inclui o lóbulo clássico como uma característica secundária. A forma tridimensional dos lóbulos não seria cilíndrica ou prismática, mas tortuosa e bifurcada, e o fígado tenderia a crescer por divisão do lóbulo clássico (KIERSENBAUM; TRES, 2012; MALARKEY et al., 2005).

Apesar desses conceitos terem um maior significado fisiológico, a terminologia do fígado permanece fundamentada na estrutura do lóbulo hepático.

2.1.4 Circulação

O fígado recebe 25% do débito de sangue cardíaco, embora constitua apenas 2,5% do peso corporal. Ele representa um importante reservatório e tem um papel crucial na resposta à perda de sangue ou de volume do fluido. É o órgão mais intensamente perfundido do corpo recebendo dois suprimentos de sangue diferentes. O parênquima hepático é suprido pela veia porta com 75% do volume do sangue aferente vindo do baço, do pâncreas e do intestino, trazendo os nutrientes absorvidos. O restante do suprimento sanguíneo é fornecido pela artéria hepática proporcionando aos hepatócitos o oxigênio necessário para exercer suas funções (LAUTT, 2009; LE COUTEUR et al., 2008).

A veia porta entra no fígado e se divide repetidamente enviando ramos aos espaços porta, os quais compõem a tríade portal. Estas vênulas portais se ramificam em vênulas portais terminais desembocando nos sinusóides hepáticos. A artéria hepática ramifica-se do mesmo modo terminando nos sinusóides também (LE COUTEUR et al., 2008). Assim, há uma mistura de sangue arterial e venoso nesses capilares. O sangue dos sinusóides flui para a veia centrolobular. Ao longo do seu percurso, a veia centrolobular recebe vários sinusóides e, ao deixar o lóbulo hepático, ela funde-se com a veia sublobular. As veias sublobulares convergem e se fundem formando as veias hepáticas que desembocam na veia cava inferior (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

Todo o aporte sanguíneo do fígado chega pelo espaço porta e flui para o centro do lóbulo de modo que as substâncias presentes no sangue atingem primeiro as células periportais. Esta característica determina o conceito do ácino hepático, descrito no item anterior, em cujo centro encontra-se o espaço porta e, na extremidade, a veia centrolobular. Dessa forma, o parênquima acinar é dividido em 3 regiões: zona 1 (região periportal); zona 2 (região intermediária) e zona 3 (região pericentral) (FAUSTO; CAMPBELL, 2009).

O ácino hepático é a unidade microvascular do fígado. Todas as entradas para o ácino ocorrem na região periportal, ao passo que todas as saídas ocorrem na periferia produzindo, assim, gradientes de oxigênio e de outras substâncias que são adicionadas ou removidas do sangue à medida que ele percorre o ácino. A zona 1 tem o maior grau de oxigenação e maior atividade das enzimas respiratórias. A zona 3 é suprida pelo sangue menos oxigenado que já circulou pelo parênquima das zonas 1 e 2 e é rica em enzimas microssomais. Este arranjo unidirecional do fluxo sanguíneo impede que substâncias se difundam do sangue venoso para a artéria hepática (LAUTT, 2009).

2.1.5 Histologia

O fígado é composto por pelo menos 15 tipos de células, incluindo aquelas que compõem os elementos estruturais, como células epiteliais e musculares dos vasos sanguíneos, fibroblastos, etc (MALARKEY et al., 2005). O tecido hepático é constituído por um tipo de células parenquimais, os hepatócitos, e vários tipos de células não-parenquimais: colangiócitos, células endoteliais sinusoidais, células de Kupffer, células estreladas, células progenitoras, células dendríticas, *pit cells*, células *natural killer* e células *natural killer T* (GUICCIARDI et al., 2013; NAKATANI, 2004). Nesta seção serão descritas as principais células envolvidas na patogênese das doenças hepáticas.

2.1.5.1 Hepatócitos

Os hepatócitos correspondem a 60% do número total de células e 80% do volume do fígado (MALARKEY et al., 2005). Talvez sejam as células mais versáteis do organismo desempenhando funções endócrinas e exócrinas. Eles acumulam, detoxificam e transportam diversas substâncias, além de sintetizar proteínas para si próprios e para exportação. Os hepatócitos são poliédricos com 20-30 µm de diâmetro, possuem um ou dois núcleos com um ou dois nucléolos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). Com o avanço da idade, os núcleos

podem variar em tamanho, número e ploidia. Uma fração significativa de células binucleadas e cariótipos até octaplóides podem ser observados. O número de hepatócitos diminui, bem como a capacidade de metabolização microsomal de drogas, porém os lisossomos e o retículo endoplasmático liso aumentam e as células hipertrofiam. As mitocôndrias e os peroxissomos não se alteram com a idade (CRAWFORD, 2005; MALARKEY et al., 2005).

Mitocôndrias, peroxissomos, complexos de Golgi e retículo endoplasmático, tanto liso quanto rugoso, são abundantes nos hepatócitos. O retículo endoplasmático rugoso forma agregados dispersos pelo citoplasma, denominados corpos basofílicos, onde são sintetizadas proteínas plasmáticas. O retículo endoplasmático liso é difuso e está associado à síntese e metabolização de glicogênio e lipídios, produção de sais biliares e detoxificação de drogas lipossolúveis. Nele acontecem os processos de oxidação, metilação e conjugação de compostos, fundamentais para a inativação e eliminação de substâncias. O complexo de Golgi contribui para a glicosilação das proteínas de secreção e das enzimas lisossomais. Os lisossomos degradam glicoproteínas plasmáticas envelhecidas, renovam as organelas celulares e armazenam ferro (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013; KIERSZENBAUM; TRES, 2012).

Os hepatócitos sintetizam muitas substâncias de exportação como albumina, protrombina, fibrinogênio, α e β globulinas, lipoproteínas e colesterol (BANKS, 1992). Xenobióticos e endobióticos são metabolizados e secretados para a bile. Todavia, as muitas especializações funcionais e o seu papel central no metabolismo também lhe conferem riscos. Por exemplo, as células podem ser danificadas pela síntese e acúmulo de proteínas mutantes (alfa-1 antitripsina), por distúrbios nutricionais (esteato-hepatite não-alcoólica), pelo acúmulo de ácidos biliares (colestase), por infecção viral (hepatites), pela metabolização e desintoxicação de álcool e fármacos (lesão hepática crônica) (GUICCIARDI et al., 2013).

2.1.5.2 Células endoteliais sinusoidais

As células endoteliais sinusoidais (CES) são únicas, morfológica e funcionalmente. São células especializadas pequenas, com cerca de 6,5 μ m de diâmetro, que revestem os sinusóides hepáticos formando uma camada muito delgada. Essas células podem se sobrepor, mas não têm junções intercelulares. Sua característica marcante é a presença de fenestrações agrupadas em placas que ocupam até 10% da superfície celular. O tamanho e o número de janelas diferem entre as regiões periportal, intermediária e pericentral, sendo mais amplas nos sinusóides periportais e mais numerosas nos sinusóides pericentrais. As fenestrações variam não apenas pelo gradiente ao longo do lóbulo, mas também em resposta a fatores

químicos ambientais e injúria. As CES são as únicas células endoteliais de mamífero que combinam fenestras não diafragmáticas com a ausência de membrana basal. As CES e os hepatócitos justapostos aos sinusóides são separados somente pelo espaço de Disse, onde são encontradas fibras reticulares. A pouca espessura dessas células e a ausência da lâmina basal contribuem para reduzir as barreiras de permeabilidade à difusão de substâncias entre o sangue e os hepatócitos (DeLEVE, 2013; BRUNT et al., 2014; KNOLLE; GERKEN, 2000).

A elevada atividade de endocitose concede às CES grande capacidade e eficácia em retirar colóides e macromoléculas solúveis residuais vindos da circulação o que faz delas alvos iniciais de lesão para toxinas e algumas drogas hepatotóxicas (DeLEVE, 2013).

2.1.5.3 Células de Kupffer

As células de Kupffer (CK) são macrófagos residentes localizados no lúmen dos sinusóides, aderidos às CES, responsáveis pela atividade fagocítica do fígado (BERTRAND; LEROUX, 2012). Elas compõem a maior população de macrófagos residentes do corpo correspondendo a cerca de 15% das células hepáticas. Podem proliferar localmente e são as principais produtoras de citocinas como mediadores da inflamação, além de interagirem com outras células (LE COUTER et al., 2008; MALARKEY et al., 2005).

Assim como hepatócitos e CES, CK também possuem gradientes de atividade gênica e proteica que variam da região periportal para a centrolobular determinando diferenças morfológicas e fisiológicas. As CK periportais são mais numerosas, maiores e mais ativas fagociticamente, além de apresentarem maior atividade enzimática lisossomal, pois compõem a linha inicial de defesa (BILZER; ROGGEL; GERBES, 2006; BRUNT et al., 2014).

A capacidade fagocítica das CK está ligada à remoção de eritrócitos velhos, células apoptóticas e detritos provenientes da atividade tecidual. Entretanto, elas são componentes importantes da imunidade inata somadas às células *natural killer*, células dendríticas e compostos como fatores do complemento e proteínas de fase aguda. As CK constituem 80-90% dos macrófagos teciduais presentes no corpo e são a primeira população de macrófagos a entrar em contato com agentes patogênicos que adentram o fígado através da veia porta. A sua localização e a sua abundância sugerem um papel central do fígado tanto na defesa sistêmica quanto local. Ao lado das CES, as CK configuram a primeira barreira para patógenos e substâncias nocivas que precisam ser eliminados da circulação (BILZER; ROGGEL; GERBES, 2006; BOLTJES et al., 2014). Outra característica das CK é que elas podem atuar como células apresentadoras de antígeno. Elas pertencem ao Sistema Mononuclear

Fagocitário, anteriormente chamado de sistema retículo-endotelial. Todavia, o nome tornou-se inadequado quando se descobriu que as células endoteliais não são macrófagos eliminadores de patógenos (BERTRAND; LEROUX, 2012; ROBERTS et al., 2007).

As CK desempenham um papel importante na fisiologia e na homeostase do fígado e, por esta razão, estão envolvidas na patogênese de várias doenças hepáticas. A ativação dessas células resulta na liberação de uma série de mediadores inflamatórios e fatores de crescimento, bem como espécies reativas de oxigênio, podendo modular as lesões hepáticas, incluindo o câncer (ROBERTS et al., 2007; ZHOU; ZHANG; QIAO, 2014).

2.1.5.4 Células estreladas

Desde a sua descoberta em 1876, pelo anatomista alemão Carl von Kupffer, as células estreladas hepáticas (HSC - do inglês *hepatic stellate cells*) receberam vários nomes: célula perissinusoidal, pericito, lipócitos, células intersticiais, células armazenadoras de gordura, células armazenadoras de vitamina A e células de Ito. A padronização da nomenclatura como "células estreladas hepáticas" ocorreu apenas em 1996 (FRIEDMAN, 2008; HELLERBRAND, 2013).

As HSC são consideradas pericitos específicos do fígado residentes no espaço de Disse, entre as CES e os hepatócitos, compreendendo de 5% a 8% das células hepáticas (FORBES; PAROLA, 2011; YIN et al., 2013). Essas células exibem uma morfologia dendrítica com corpo celular fusiforme e núcleo oval ou alongado. O retículo endoplasmático rugoso é moderadamente desenvolvido e o complexo de Golgi é pequeno e justanuclear. Processos citoplasmáticos dendríticos subendoteliais se estendem em torno dos sinusóides e uma única HSC pode envolver mais de dois sinusóides próximos. Em cada processo há numerosas microprojeções espinhosas estabelecendo contato físico com as CES e com os hepatócitos. Este contato íntimo entre as células favorece o transporte intercelular de substâncias. As microprojeções das HSC têm um papel fundamental na detecção de sinais quimiotáticos e na sua transmissão ao aparato mecânico de contração celular. Devido ao seu papel na regulação do tônus microvascular, agora são consideradas as principais células envolvidas na regulação do fluxo sanguíneo sinusoidal. Além disso, as HSC estão situadas adjacentes a terminações nervosas, localizadas principalmente nos espaços de Disse, e são capazes de produzir respostas neuro-humorais (FRIEDMAN, 2008; GRESSNER; GAO, 2014; HELLERBRAND, 2013).

No fígado saudável, as HSC são quiescentes e contêm numerosas gotículas ricas em triglicérides, nas quais a vitamina A (retinóides) está dissolvida e armazenada, constituindo o maior reservatório desta vitamina no organismo (WANG et al., 2013; YIN et al., 2013). Esta é a característica mais marcante dessas células, visto que cerca de 85% da vitamina A do corpo é encontrada nas HSC como ésteres de retinil. O número de gotículas lipídicas varia com as espécies animais e com a abundância dos estoques de vitamina A no organismo. O padrão exibido é heterogêneo, com volume de gotículas diferentes, dependendo da posição intralobular das células. O número de gotículas é maior nas células das regiões periportais do que das regiões pericentrais (FRIEDMAN, 2008; GRESSNER; GAO, 2014).

As HSC também têm a função de modular a arquitetura hepática secretando moléculas da matriz extracelular (MEC) acompanhadas pela secreção das enzimas degradantes (metaloproteinases de matriz – MMPs) e dos inibidores teciduais das MMPs (TIMPs) (HELLERBRAND, 2013). Ainda, fagocitam corpúsculos apoptóticos e secretam fatores de crescimento. Características adicionais das HSCs são suas propriedades imunológicas, como a regulação da tolerância hepática e a atuação como células apresentadoras de antígenos (GRESSNER; GAO, 2014; WANG et al., 2013).

As HSC contribuem significativamente para o desenvolvimento, regeneração e reparação do fígado (FORBES; PAROLA, 2011). Agindo como células progenitoras, têm capacidade de se diferenciar em células endoteliais e em hepatócitos. Elas também auxiliam a regeneração do fígado promovendo a proliferação de hepatócitos, regulando a angiogênese e o remodelamento vascular. Algumas destas funções não são expressas no estado quiescente da célula, mas são consequências da sua ativação desencadeadas por mediadores inflamatórios quando ocorrem danos nas células hepáticas (GRESSNER; GAO, 2014).

As HSC exercem um papel importante na fibrogênese hepática e na cirrose. Quando ativadas, elas proliferam e se diferenciam em miofibroblastos produtores de colágeno que, normalmente, expressam desmina e actina do músculo liso. HSC ativas perdem as gotículas lipídicas e, conseqüentemente, ocorre uma diminuição de retinóides, porém, a contratilidade e a secreção de componentes da MEC aumentam fortemente. Os miofibroblastos derivados de HSC têm potencialidade não apenas para a síntese de MEC, mas também para a expressão e a secreção de diversas citocinas pró e anti-inflamatórias e fatores de crescimento. O seu fenótipo altamente sintético é caracterizado por um retículo endoplasmático rugoso hipertrófico contendo ribossomos necessários para a síntese de proteínas de exportação (CRAWFORD, 2005; MALARKEY et al., 2005; GRESSNER; GAO, 2014).

2.1.5.5 Células progenitoras

O fígado contém diferentes tipos de células com propriedades de células tronco: hepatócitos, HSC e células progenitoras (ROSKAMS, 2008).

A célula tronco é uma célula indiferenciada capaz de renovar-se e também de gerar células diferenciadas. Células tronco totipotentes são encontradas no embrião, enquanto que em estágios mais avançados do desenvolvimento, no feto e no adulto, as células tronco são multipotentes. Aquelas mais próximas da diferenciação final, residentes no tecido, são chamadas células progenitoras, comprometidas ou transitórias (ROSKAMS; KATOONIZADEH; KOMUTA, 2010). A célula progenitora pode proliferar originando tanto células amplificadoras transitórias, destinadas à diferenciação, quanto células não comprometidas que retêm capacidade de autorrenovação (GAUDIO et al., 2009).

As células progenitoras hepáticas (CPH), nos roedores chamadas de células ovais, são pequenas células epiteliais (8-18 μm) com um grande núcleo oval e citoplasma escasso (ROSKAMS; KATOONIZADEH; KOMUTA, 2010); estão presentes no fígado adulto saudável e podem ser encontradas em pequeno número nos canais de Hering, na interface entre o sistema canalicular dos hepatócitos e a árvore biliar. Elas constituem uma população de células tronco bipotenciais com a capacidade de se proliferar clonogenicamente, bem como de se diferenciar em hepatócitos e colangiócitos (KRUITWAGEN; SPEE; SCHOTANUS, 2014; THAN; NEWSOME, 2014; WILLIAMS; CLOUSTON; FORBES, 2014).

As CPH são ativadas na maioria das doenças hepáticas crônicas (ROSKAMS, 2011). A diferenciação em hepatócitos ou colangiócitos depende de qual tipo celular está mais prejudicado. Quando ativadas, as CPH proliferam e se diferenciam. Esta diferenciação é caracterizada pelo aparecimento de células com fenótipos intermediários compondo uma população de células amplificadoras transitórias. Durante a diferenciação em hepatócitos, as CPH originam células poligonais com um tamanho intermediário entre CPH e hepatócitos maduros. Por outro lado, a diferenciação em colangiócitos determina o aparecimento de colangiócitos imaturos diferenciando em pequenos e, em seguida, grandes colangiócitos, e formando estruturas ductulares tortuosas (pseudoductos), que partem da zona portal expandindo-se para o parênquima (GAUDIO et al., 2009; KATOONIZADEH; POUSTCHI; MALEKZADEH, 2014; ROSKAMS; KATOONIZADEH; KOMUTA, 2010).

O consenso atual é que as CPHs formam um compartimento de reserva no fígado, que contribui para a regeneração quando os hepatócitos não replicam o suficiente para restaurar a massa e a função hepática (KRUITWAGEN; SPEE; SCHOTANUS, 2014).

O grau de ativação das CPH aumenta de acordo com a gravidade da doença. O número dessas células está estreitamente relacionado com a severidade das lesões hepáticas, reforçando o seu possível papel em auxiliar a regeneração do fígado (ROSKAMS, 2008; THAN; NEWSOME, 2014). Entre outras propriedades, estas células podem expressar proteínas multirresistentes, incluindo a Proteína Relacionada ao Câncer de Mama (BCRP), a qual confere resistência a várias condições de sobrevivência desvantajosas, incluindo drogas tóxicas (ROSKAMS, 2011).

2.2 DOENÇAS HEPÁTICAS CRÔNICAS

Tendo em vista que a maioria dos casos de CHC se desenvolve em um cenário estabelecido de doença hepática crônica, esta seção abordará as doenças decorrentes dos fatores de risco mais comuns que resultam em cirrose e, conseqüentemente, favorecem o surgimento do câncer hepático.

2.2.1 Hepatite B

A infecção pelo VHB é uma das infecções crônicas mais comuns no mundo representando um grave problema de saúde pública em muitos países. Mais de 45% da população mundial vive em regiões endêmicas e estima-se que mais de 2 bilhões de pessoas já foram infectadas por esse vírus. Aproximadamente 360 milhões de indivíduos são portadores crônicos da infecção, dos quais cerca de 500 mil morrem anualmente de doenças hepáticas relacionadas com o VHB, principalmente cirrose e CHC (DUDDEMPUDI; BERNSTEIN, 2014; FONSECA, 2007; WHO, 2009).

O VHB é transmitido através do contato com fluidos corporais infectados. Apesar do sangue ser o veículo mais importante, outros fluidos, como a saliva, o sêmen e o fluido vaginal, são meios de transmissão. O vírus também pode ser encontrado no sangue menstrual, suor, leite materno, lágrimas e urina de indivíduos infectados (GUIDO; MANGIA; FAA, 2011). Atualmente, três vias de transmissão são reconhecidas: vertical (perinatal), parenteral (percutâneo) e sexual. Não há evidências de transmissão pelo ar e as fezes não são fonte de contaminação. O VHB não é transmitido por alimentos ou água contaminados, insetos ou outros vetores. Acredita-se que outras formas de transmissão, tais como a horizontal, através do contato íntimo, mas não sexual, contribua para a manutenção de altas taxas de infecção em algumas populações (ALVARADO-MORA; PINHO, 2013; HOU; LIU; GU, 2005). O vírus é

altamente infectivo e uma só partícula viral é capaz de infectar o ser humano. Além do mais, é capaz de sobreviver até uma semana fora do organismo (FONSECA, 2007).

A transmissão vertical e a horizontal, na primeira infância, são mais comuns em áreas de alta prevalência, como o Sudeste Asiático e a China. Já nas demais áreas do mundo, especialmente de baixa endemicidade, como a América do Norte e a Europa Ocidental, a transmissão sexual e parenteral são as principais fontes de infecção. A hepatite B é considerada uma doença sexualmente transmissível. Já a transmissão parenteral inclui o uso de drogas injetáveis, transfusões, diálise, acupuntura, tatuagens e contato em ambientes hospitalares e domésticos (DUDEMPUDI; BERNSTEIN, 2014; HOU; LIU; GU, 2005).

O VHB é classificado em 10 genótipos (A – J) (ALVARADO-MORA; PINHO, 2013). Os genótipos I e J foram descritos recentemente por Olinger et al. (2008) e Tatematsu et al. (2009). A prevalência de cada um deles varia geograficamente (DUDEMPUDI; BERNSTEIN, 2014). Este vírus pertence à família Hepadnaviridae, é envelopado, constituído de ácido desoxirribonucleico (DNA) e se replica nos hepatócitos (WHO, 2009). O seu hospedeiro natural é o ser humano, mas vírus similares foram isolados em outros animais (FONSECA, 2007). São características marcantes do VHB a sua alta especificidade de espécie e de tecido e um mecanismo singular de replicação e organização genômica. O genoma viral é organizado em uma fita de DNA circular frouxo, parcialmente em cadeia dupla, de cerca de 3200 nucleotídeos, ligado com uma polimerase, que é responsável pela síntese de DNA viral nas células infectadas (DANDRI; LOCARNINI, 2012; GANEM; PRINCE, 2004). Este genoma apresenta quatro fases abertas de leitura que codificam sete proteínas (NISHIKAWA; OSAKI, 2013).

O genoma do VHB produz quatro antígenos: antígeno de superfície (HBsAg), antígeno “e” (HBeAg), antígeno de capsídeo (core) (HBcAg) e antígeno “x” (HBxAg) (FONSECA, 2007). O HBsAg corresponde às lipoproteínas constituintes do envelope viral – pequena, média e grande – que envolvem o nucleocapsídeo, formado pela proteína do core (HBcAg) (ALVARADO-MORA; PINHO, 2013; DANDRI; LOCARNINI, 2012).

A história natural da infecção pelo VHB compreende três fases, conforme descritas por Fonseca (2007), Dandri e Locarnini (2012) e McMahon (2014):

1. fase de imunotolerância: ocorre após a transmissão perinatal, podendo durar décadas. O sistema imune não reconhece o vírus como um organismo estranho, o que resulta em altas cargas virais sem elevação de alanina aminotransferase (ALT) ou inflamação do fígado. Caracteriza-se pela positividade para o HBeAg e perfil

- histológico normal. Esta fase não é observada em infectados na fase adulta e implica em baixo risco de progressão para cirrose hepática e hepatocarcinoma;
2. fase imunoativa: ocorre após a transmissão horizontal, mas também pode ocorrer em indivíduos infectados por transmissão vertical, após a fase de imunotolerância. O sistema imune reconhece o vírus e monta uma resposta, resultando na redução da carga viral com elevação dos níveis de ALT e desenvolvimento de anticorpos anti-HBe. São observados baixos níveis de HBsAg e poucos danos histológicos;
 3. fase não replicativa: portador inativo do VHB. Ao longo do tempo, uma forte resposta imune é montada suprimindo o DNA viral. A normalização dos níveis de ALT, geralmente, é permanente. Nesta fase, embora haja presença do HBsAg, a carga viral é baixa ou indetectável e a lesão histológica é mínima. O curso é assintomático e de bom prognóstico.

Dos portadores inativos, 10-20% anteriormente negativos para o HBeAg, sofrem um fenômeno de reversão com o reaparecimento deste antígeno. Este evento pode ser identificado como uma quarta fase, denominada imuno escape. Invariavelmente, estes pacientes evoluem para cirrose hepática, pois a reativação do VHB provoca o retorno da atividade necroinflamatória do fígado com aumento de ALT e, conseqüentemente, maiores danos histológicos (DANDRI; LOCARNINI, 2012; FONSECA, 2007).

A infecção oculta é outro modo de propagação do vírus. Em alguns indivíduos, o DNA viral é detectável no soro e/ou no fígado mesmo na ausência de HBsAg circulante. A infecção oculta pelo VHB é definida pela presença do seu DNA no tecido hepático de indivíduos negativos para HBsAg, independentemente da detecção do DNA viral no soro. As implicações da infecção oculta envolvem: (1) risco potencial de transmissão através de hemodiálise, transfusão de sangue e transplante de órgãos; (2) doença hepática criptogênica; (3) progressão da doença hepática ou mesmo CHC; (4) prejuízo da resposta à terapia antiviral em pacientes com hepatite C crônica. Assim, a infecção oculta como causa de doença hepática crônica em pacientes HBsAg-negativo está se tornando uma instância importante da patologia hepática. Apesar da sua potencial importância clínica, o conhecimento do efeito da infecção oculta em pacientes com doença crônica do fígado é limitado, porque a detecção de DNA viral pode necessitar de tecido e biópsias hepáticas não são realizadas rotineiramente na maioria desses pacientes por causa das condições clínicas (NISHIKAWA; OSAKI, 2013).

O HBsAg é o marcador sorológico para a infecção e a sua presença no soro do paciente, por mais de 6 meses, define a hepatite B crônica (DUDDEMPUDI; BERNSTEIN, 2014). O vírus se replica nos hepatócitos, mas não é diretamente citopático. A lesão

hepatocelular é induzida pela resposta imune do hospedeiro, com células T específicas contra o VHB (FIEL, 2010).

Histologicamente, a hepatite B caracteriza-se pela presença de desarranjo lobular, balonização celular, corpúsculos apoptóticos e inflamação portal e lobular (FIEL, 2010). A inflamação é a base patogênica que pode levar a fibrose nodular, cirrose e, eventualmente, CHC. A lesão infligida aos hepatócitos promove a regeneração celular, aumentando o risco de transformação maligna (AUGUSTINE; FONG, 2014; TAN et al., 2008).

A hepatite B crônica é um processo necroinflamatório, cuja característica marcante é a inflamação portal, constituída principalmente de linfócitos. A inflamação portal pode estar associada com dano aos hepatócitos e com hepatite de interface ou periportal, distinguida por infiltração de linfócitos na fronteira entre o trato portal e o parênquima adjacente. Alterações lobulares incluindo necrose focal e confluyente, apoptose e hepatócitos em vidro fosco compõem o quadro das alterações necroinflamatórias. Hepatócitos em vidro fosco são característicos da hepatite B. Eles apresentam um citoplasma vítreo eosinofílico e granular, que corresponde a uma proliferação do retículo endoplasmático liso contendo HBsAg. A fibrose geralmente se inicia no trato portal e prossegue com a formação de septos fibrosos que pode conduzir ao aparecimento de cirrose (GUIDO; MANGIA; FAA, 2011).

A hepatite B ainda não tem cura por duas razões: o vírus persiste nas células durante anos, na forma de um DNA circular fechado, e também integra partes do seu genoma ao DNA da célula hospedeira, aumentando a suscetibilidade à transformação carcinogênica. Assim, o CHC pode ocorrer em fígados não cirróticos de pacientes infectados (McMAHON, 2014). A infecção crônica por VHB compreende três mecanismos distintos na mediação da hepatocarcinogênese. O primeiro envolve a integração do DNA viral ao genoma do hospedeiro, induzindo instabilidade cromossômica. O segundo diz respeito a mutações gênicas resultando na inserção do genoma viral em locais específicos que podem ativar genes endógenos. O terceiro inclui a modulação da proliferação celular pela expressão de proteínas virais, em particular a proteína “x” (HBx) (GOMES et al., 2013).

2.2.2 Hepatite C

A hepatite C tornou-se uma importante causa de doença hepática crônica em todo o mundo. Estima-se que o número de infectados varie de 170 a 200 milhões de pessoas, o que corresponde a 3% da população mundial. A maior prevalência é encontrada no Egito: 15 – 20% (FIEL, 2010; GUIDO; MANGIA; FAA, 2011). Nos EUA, a infecção por VHC é a

principal causa de transplantes de fígado e de mortes por doença hepática. A previsão é de que a mortalidade relacionada à hepatite C continuará aumentando até o final da década de 2020 (DUDDEMPUDI; BERNSTEIN, 2014; GHANY et al., 2008).

As infecções pelos vírus da hepatite B e C espalharam-se após a Segunda Guerra Mundial. No Japão, o VHC começou a circular por causa do abuso da anfetamina intravenosa. Somado a isto, a presença do vírus no fornecimento nacional de sangue, em diversos países, aumentou ainda mais a sua propagação. Todavia, a incidência do vírus diminuiu consideravelmente com o advento do teste de triagem, a partir de 1992. Como resultado das infecções iniciais, as taxas de CHC começaram a aumentar em meados dos anos 1970. Em áreas de baixa taxa, o pico de incidência de CHC relacionado com VHC ocorreu por volta de 2010, porém, a incidência global desse vírus deverá atingir o seu pico por volta de 2015 (AUGUSTINE; FONG, 2014).

O VHC infecta apenas humanos e chimpanzés. É transmitido através do uso de drogas injetáveis e outros tipos de contato direto com sangue (FIEL, 2010). Além disso, o contato com fluidos corporais de pessoas infectadas, instrumentos esterilizados inadequadamente utilizados em procedimentos médicos, tatuagem e piercing são considerados fatores de risco para a infecção (GUIDO; MANGIA; FAA, 2011). Outras fontes potenciais de transmissão incluem a exposição a um parceiro sexual infectado e a exposição entre os profissionais de saúde a sangue e seus derivados contaminados com o vírus (GHANY et al., 2008).

O VHC é um vírus de RNA (ácido ribonucleico) pertencente à família Flaviviridae, identificado pela primeira vez em 1989 (GUIDO; MANGIA; FAA, 2011). Seu genoma consiste de uma molécula de RNA de 9,6 quilobases (FIEL, 2010). Há regiões não traduzidas, altamente conservadas, que flanqueiam uma única fase aberta de leitura de aproximadamente 9000 nucleotídeos. Esta região codifica uma grande poliproteína, de cerca de 3000 aminoácidos, a qual sofre processamento pós-traducional por enzimas do vírus e do hospedeiro para formar as proteínas estruturais e não estruturais e enzimas do vírus. A enzima RNA polimerase do vírus não possui a capacidade de correção, o que contribui para a grande diversidade característica deste vírus. Esta heterogeneidade é extremamente importante no diagnóstico da infecção, na patogênese da doença e na resposta ao tratamento (TAN et al., 2008).

O grau de diversidade do VHC lhe permitiu evoluir para vários genótipos diferentes com homologia de mais de 80% entre eles (TAN et al., 2008). A prevalência de cada um varia geograficamente (FIEL, 2010). Onze genótipos do VHC (1 – 11), com vários subtipos, foram identificados em todo o mundo. Estas linhagens não diferem significativamente em sua

virulência ou patogenicidade, mas variam na sensibilidade à terapia. Essa heterogeneidade também dificulta o desenvolvimento de vacinas e a infecção por VHC mantém-se como um grande problema de saúde mundial. Apesar de terapias eficazes já estarem disponíveis, o estágio final da doença hepática relacionada ao VHC ainda é a indicação mais frequente de transplante de fígado em pacientes adultos (GUIDO; MANGIA; FAA, 2011).

A história natural da hepatite C é bastante variada e difícil de ser caracterizada, seja pela impossibilidade de se determinar o momento exato da infecção, pela ausência de sintomas da infecção primária ou pela lenta progressão da doença. O aparecimento dos sintomas ocorre de 3-12 semanas após a exposição e pode incluir mal-estar, fraqueza, anorexia e icterícia. A elevação dos níveis de ALT ocorre de 2-8 semanas após a exposição podendo superar os limites normais em até dez vezes (SARIN; KUMAR, 2012). Poucos dias depois da infecção, os títulos de RNA do VHC aumentam, no entanto, o diagnóstico costuma ser feito somente após o aumento das transaminases (FIEL, 2010).

A hepatite C crônica é marcada pela persistência do RNA viral no sangue durante, pelo menos, 6 meses após o início da infecção aguda. A taxa de desenvolvimento da infecção crônica é afetada por muitos fatores, tais como idade no momento da infecção, gênero, etnia e o desenvolvimento de icterícia durante a infecção aguda. A infecção crônica pelo VHC pode se desenvolver com ou sem aumento de ALT e com ou sem inflamação crônica e fibrose no fígado. O fator mais relevante por contribuir para a progressão do dano hepático é a inflamação persistente (FIEL, 2010; SARIN; KUMAR, 2012).

Ao contrário de outras hepatites virais que podem ser suprimidas, o VHC estabelece uma infecção persistente, resultando em doença crônica. A diversidade genética deste vírus possibilita sua evasão da resposta imune do hospedeiro e quase 80% dos casos progridem para infecção crônica. Dentre a população infectada cronicamente, cerca de 20% evolui para cirrose (FIEL, 2010; KEW, 2014).

Três características histológicas, embora não patognomônicas, foram descritas para a hepatite C crônica: (1) danos ao epitélio biliar, (2) formação de agregados linfóides e, às vezes, folículos linfóides com centros germinativos em espaços porta e, (3) esteatose. Esta tríade raramente é vista na hepatite B crônica ou hepatite auto-imune e, portanto, sugere fortemente o diagnóstico de hepatite C crônica. A hiperplasia de células de Kupffer também tem sido relatada como característica da infecção por VHC. A reação ductular e um aumento do número de células progenitoras hepáticas estão associados com maior grau de fibrose. A lesão hepatocelular é variável, mas a maioria dos casos apresenta apenas alterações inflamatórias leves. Corpos apoptóticos são frequentemente identificáveis. Degeração e

necrose irregular de hepatócitos e infiltração de células inflamatórias mistas no parênquima e nos tratos portais são encontrados, semelhante a outros tipos de hepatite crônica. A hepatite de interface pode ter focos pequenos ou ser severa, circundando todo o trato portal (FIEL, 2010). Moderada deposição de ferro também pode ser detectada e pode ter implicações clínicas (GUIDO; MANGIA; FAA, 2011).

O curso da infecção crônica por VHC promovendo inflamação, fibrose e cirrose é um fator de risco significativo para o desenvolvimento de CHC. Vários fatores de risco estão relacionados com a progressão para cirrose, os quais incluem idade avançada, idade avançada no momento da infecção, sexo masculino, ingestão de álcool em excesso, diabetes, obesidade, e coinfeção por HIV (*human immunodeficiency virus*) ou VHB (AUGUSTINE; FONG, 2014). A coexistência do VHC é estimada em 10 – 15% dos pacientes com VHB, os quais apresentam um risco muito maior de desenvolverem CHC (McMAHON, 2014). A maioria dos pacientes coinfectados tem RNA do VHC detectável no soro, mas os níveis de DNA do VHB são muito baixos ou indetectáveis. Isto indica que o VHC é a causa predominante da doença hepática nestes doentes que é, geralmente, mais grave do que em pacientes infectados somente por um dos vírus (DUDDEMPUDI; BERNSTEIN, 2014).

Em contraste com a infecção pelo VHB, em pacientes com hepatite C o CHC ocorre quase exclusivamente em indivíduos com cirrose sugerindo que esta seja o principal fator de risco (SARIN; KUMAR, 2012). Diferente do VHB, o VHC não se integra ao genoma do hospedeiro e, assim, a mutagênese por inserção não está envolvida na transformação maligna (AUGUSTINE; FONG, 2014).

O VHC pode induzir a hepatocarcinogênese através de dois mecanismos. O primeiro envolve a inflamação decorrente da infecção crônica levando a subsequente regeneração, fibrose e cirrose; o CHC desenvolve-se, possivelmente, a partir de nódulos adenomatosos displásicos ou hiperplásicos. A transformação maligna dos hepatócitos, neste caso, é resultante do aumento da renovação celular e da regeneração, no contexto de dano oxidativo ao DNA e inflamação crônica. Este microambiente facilita a ocorrência de alterações genéticas e epigenéticas que, ao longo dos anos, pode levar ao desenvolvimento de cirrose e, finalmente, CHC. No segundo mecanismo, proteínas virais atuam sobre os genes celulares, resultando no fenótipo maligno. Alterações induzidas por proteínas do capsídeo, do envelope e proteínas não estruturais são fundamentais para o efeito hepatocarcinogênico do VHC. Estas alterações incluem interromper vias reguladoras de proliferação e apoptose e supressão da resposta imune do hospedeiro. A proteína core do VHC tem uma vasta gama de funções, algumas das quais podem ser relevantes para o potencial carcinogênico do vírus. Ela liga-se e

inativa proteínas supressoras de tumor e também é capaz de modular a expressão e regular a atividade de proteínas envolvidas no controle do ciclo celular e na formação de tumores (AUGUSTINE; FONG, 2014; KEW, 2014).

2.2.3 Esteato-hepatite não alcoólica

A esteato-hepatite não alcoólica, chamada de NASH (sigla em inglês para *non-alcoholic steatohepatitis*) é um estágio avançado da doença hepática gordurosa não alcoólica conhecida como NAFLD (sigla em inglês para *non-alcoholic fatty liver disease*) ou simplesmente esteatose hepática.

NAFLD foi descrita pela primeira vez em 1980 por Ludwig et al. Atualmente, é uma das doenças hepáticas mais prevalentes tanto em países desenvolvidos quanto em desenvolvimento. Esta é a doença hepática crônica mais comum no Ocidente, onde atinge cerca de 20 – 30% da população. Nos EUA, estima-se que um terço da população tenha NAFLD e 2 – 5% tenham NASH. Na região Ásia-Pacífico, um quarto da população pode ser portadora de NAFLD. A menor prevalência foi relatada em populações americanas indígenas e nativos do Alasca variando de 0,4 – 2% (BETTERMANN; HOHENSEE; HAYBAECK, 2014; DUSEJA; CHALASANI, 2013; KUCERA; CERVINKOVA, 2014).

A prevalência dessa doença exhibe variações regionais dentro do mesmo país, com uma clara distinção entre a zona rural e a urbana. Na China, a prevalência de NAFLD nas áreas urbanas é quase o dobro (20,3%) comparada com as áreas rurais (11,1%). O mesmo se repete na Índia com diferenças ainda maiores. Esses dados sugerem o possível papel protetor do estilo de vida oriental, que ainda predomina nas regiões rurais da Ásia, comparado ao estilo de vida ocidental das regiões urbanas (DUSEJA; CHALASANI, 2013).

A patogênese da NAFLD está intimamente relacionada à síndrome. Muitos autores consideram-na a manifestação hepática desta síndrome que é caracterizada pela presença de hipertensão, dislipidemia e resistência à insulina em pacientes obesos (CARPINO et al., 2013; FIELDING; ANGULO, 2014; KUCERA; CERVINKOVA, 2014). Por causa dessa associação, a doença ocorre comumente em pacientes com obesidade, diabetes tipo 2 e hiperlipidemia. A probabilidade de um indivíduo desenvolver NAFLD é diretamente proporcional ao seu peso corporal o que eleva a prevalência de NASH na população de obesos para 10 – 56%. Esta relação é preocupante visto que, nos últimos 25 anos, a prevalência de obesidade na América do Norte mais do que dobrou e continua em ascensão. Na União Européia, mais de 50% dos adultos estão com sobrepeso ou obesos. Assim, a prevalência de

NAFLD deve continuar aumentando à medida que a epidemia de obesidade avança (EASL, 2013; FIELDING; ANGULO, 2014; LIM; KIM, 2008). Em breve, esta doença pode atingir proporções epidêmicas em todo o mundo e se tornará a principal causa de transplante de fígado nos EUA até 2025. A cirrose relacionada com NASH é atualmente a terceira indicação mais comum para transplantes, mas deve superar a doença hepática alcoólica e a hepatite C na próxima década (DUSEJA; CHALASANI, 2013; FIELDING; ANGULO, 2014).

NAFLD se desenvolve ao longo de anos, com o acúmulo de diferentes fatores de risco aliado a graus variáveis de susceptibilidade genética. Hábitos alimentares, quantidade e composição da dieta, sedentarismo, estresse crônico e estilo de vida são os principais fatores que determinam a manifestação e a severidade da doença. Em contraste com a esteatose simples, pacientes com NASH têm maior risco de morte por doenças cardiovasculares e relacionadas com o fígado (KUCERA; CERVINKOVA, 2014). O fígado gorduroso pode atuar como um cofator na doença hepática aguda ou crônica e aumenta a vulnerabilidade dos hepatócitos a danos secundários através da diminuição da capacidade antioxidante e aumento da ativação de vias de sinalização favoráveis à injúria (SCHATTENBERG; GALLE, 2010).

NAFLD é definida pela presença de gordura no fígado superior a 5% dos hepatócitos na ausência de ingestão significativa de álcool ou qualquer outra etiologia específica de doença hepática. Esta doença abrange um espectro histológico que varia de esteatose simples à NASH, a qual é caracterizada por esteatose mais necroinflamação. NASH pode se apresentar com diferentes graus de fibrose que vão desde ausente até cirrose (EASL, 2013). Em NASH, esteatose, inflamação intralobular e portal e balonização hepatocelular estão presentes acompanhadas de fibrose progressiva. A balonização dos hepatócitos é uma forma de lesão reconhecida como um inchaço dos hepatócitos, com um citoplasma rarefeito. A balonização está ligada a uma alteração dos filamentos intermediários do citoesqueleto e a sua presença é a característica chave para o diagnóstico de NASH (BETTERMANN; HOHENSEE; HAYBAECK, 2014; KUCERA; CERVINKOVA, 2014; TAKAHASHI; SOEJIMA; FUKUSATO, 2012). A distinção entre NAFLD e NASH é importante porque são doenças bastante distintas, em termos de prognóstico. Acredita-se que a primeira tenha um curso benigno e não afeta a taxa de mortalidade, enquanto que a segunda pode evoluir para cirrose, insuficiência hepática e CHC, aumentando a mortalidade entre os pacientes (BETTERMANN; HOHENSEE; HAYBAECK, 2014; FIELDING; ANGULO, 2014; LIM; KIM, 2008).

A hipótese de dois "*hits*", proposta por Day e James (1998), é amplamente aceita como a patogênese de NAFLD/NASH. O primeiro *hit* causa o acúmulo de gordura nos hepatócitos,

e o segundo é uma fonte de estresse oxidativo capaz de iniciar a peroxidação lipídica provocando inflamação e fibrose (TAKAHASHI; SOEJIMA; FUKUSATO, 2012).

O acúmulo de lipídios (primeiro *hit*) está associado com transtornos metabólicos relacionados com obesidade e resistência à insulina e pode ser causado por 4 mecanismos: (1) aumento da oferta e absorção de ácidos graxos devido ao excesso de ingestão dietética ou maior lipólise no tecido adiposo; (2) aumento da síntese hepática de novo de ácidos graxos e triglicerídeos; (3) diminuição da síntese ou secreção hepática de lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL) e da exportação de triglicerídeos; (4) falha na eliminação de ácidos graxos devido ao comprometimento da β -oxidação mitocondrial hepática (TILG; MOSCHEN, 2010). O desenvolvimento de esteatose sensibiliza o fígado aumentando a susceptibilidade e vulnerabilidade aos segundos *hits*. A resposta inflamatória pode ser desencadeada por vários estímulos (segundo *hit*) tais como: estresse oxidativo a partir de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, citocinas pró-inflamatórias, lipólise alterada, lipotoxicidade, colesterol intra-hepático anormal, hiperinsulinemia, desregulação da sinalização das adipocinas (hiperleptinemia e hipoadiponectinemia) e morte celular (apoptose e necrose) (SCHATTENBERG; GALLE, 2010; TAKAHASHI; SOEJIMA; FUKUSATO, 2012).

A principal diferença entre NAFLD e NASH está no grau de lesão do hepatócito e na apoptose, que é frequentemente observada em NASH e se correlaciona com a gravidade da doença. Alguns autores consideram o aumento da apoptose como o terceiro *hit*, levando à fibrose e cirrose pela ativação de HSCs (KUCERA; CERVINKOVA, 2014).

Apesar de bem estabelecida, a teoria do duplo *hit* foi questionada com base na interação entre resistência à insulina, inflamação do tecido adiposo e adipocinas bem como no fato de que muitos pacientes nunca progridem da esteatose simples para NASH. Assim, surgiu a hipótese dos "múltiplos *hits* paralelos", proposta por Tilg e Moschen (2010), na qual os *hits* são caracterizados por eventos paralelos que envolvem uma interação complexa entre os fatores ambientais, a genética do hospedeiro e a microflora intestinal (lipopolissacarídeo [LPS]: uma endotoxina, um componente chave de bactérias da nossa microbiota). Essa interação pode promover esteatose isolada, ativação imune inata, inflamação, morte celular ou lesão hepática progressiva. O primeiro *hit* consiste na resistência à insulina em combinação com muitas disfunções metabólicas associadas gerando esteatose e expondo o fígado ao risco de outros *hits* que resultarão em NASH e fibrose hepática. Ambas as hipóteses têm em comum que a esteatose simples é a base para o desenvolvimento de NASH (BETTERMANN; HOHENSEE; HAYBAECK, 2014; WREE et al., 2013).

Os ácidos graxos livres e o colesterol, especialmente quando acumulados nas mitocôndrias, são considerados lipídios agressivos que causam danos mediados pelo fator de necrose tumoral alfa (TNF α) e formação de espécies reativas de oxigênio. Esses lipídios podem estar presentes na esteatose hepática e atuar na inflamação inicial levando a todo o espectro de NAFLD. Entretanto, em muitos casos a inflamação resulta em uma resposta de estresse dos hepatócitos podendo levar ao acúmulo de lipídios e, portanto, a inflamação poderia preceder a esteatose em NASH. Uma série de diversos processos paralelos pode contribuir para o desenvolvimento da inflamação hepática. A hipótese dos "múltiplos hits" sugere que mediadores inflamatórios derivados de vários tecidos, mas especialmente do tecido adiposo e do intestino poderiam desempenhar um papel central na cascata de inflamação, fibrose e desenvolvimento tumoral (TILG; MOSCHEN, 2010).

NAFLD é cada vez mais reconhecida como um fator de risco para CHC assim como a obesidade. Portanto, o CHC é parte do espectro de NAFLD. Na maioria dos casos, o CHC ocorre em NASH através da via fibrose-cirrose-CHC (LIM; KIM, 2008). NASH é uma condição potencialmente grave com 10 – 25% dos pacientes podendo progredir para cirrose (WREE et al., 2013). Porém, a ocorrência de CHC em pacientes com esteatose hepática tem sido observada mesmo na ausência de cirrose e especula-se que a resistência à insulina pode ser um fator agravante que promove a proliferação celular no contexto da hepatocarcinogênese (SCHATTENBERG; GALLE, 2010).

2.2.4 Doença hepática alcoólica

Embora o consumo de álcool pelos humanos seja milenar, a produção e a popularização dos efeitos tóxicos da substância alcançaram projeção mundial após 1512, com a publicação da obra “*Liber de arte distillandi de simplicibus. Das buch der rechten kunst zu distillieren die eintzige ding*” [O livro da arte da destilação] (BRUNSCHWIG, 1512).

Dados atuais dão conta de que, mundialmente, o álcool figura em terceiro lugar dentre as substâncias tóxicas consumidas (WHO, 2011) e é a terceira causa principal das mortes evitáveis nos EUA (Center for Disease Control and Prevention, 2012).

A despeito das consequências tóxicas do uso do álcool, comprometendo funções renais (EPSTEIN, 1997), cardiovasculares (HVIDTFELDT; FREDERIKSEN et al., 2008; LUCAS; BROWN et al., 2005), gastrintestinais e pancreáticas (BODE; BODE, 2000), além de desencadear desordens psiquiátricas (HAYCOCK, 2009; JORDAAN; EMSLEY, 2014), o fígado é o órgão mais acometido pelo consumo dessa substância elevando a prevalência de

hepatite e cirrose alcoólicas (SCHWARTZ; REINUS, 2012). De fato, em países cujas tradições religiosas coíbem severamente o consumo de bebidas alcoólicas verifica-se menor incidência das doenças hepáticas típicas de usuários de álcool (WHO, 2011).

Além disso, observou-se que o risco do desenvolvimento de doenças e câncer hepáticos pode ser dose-dependente, ou seja, está correlacionado com as concentrações de etanol existentes nas bebidas (DONATO et al., 2002). De fato, a incidência de hepatite e cirrose alcoólicas é maior em indivíduos que consomem de 80 – 160 g diárias de álcool (GALAMBOS et al., 1985). O maior consumo de bebidas e os maiores índices de doenças hepáticas associadas ao uso de etanol são verificados no sexo masculino (BELLENTANI et al., 1997). Todavia, segundo Becker et al. (1996), a susceptibilidade aos efeitos hepatotóxicos do álcool é maior entre as mulheres. A esse respeito, estudo comparando o mesmo consumo entre ambos os sexos sugerem que a vulnerabilidade maior das mulheres possa ser explicada, em parte, pela farmacocinética pelo fato de que as mulheres possuem menor quantidade da enzima álcool desidrogenase (ADH), maior quantidade de gordura corporal e também devido a atividade de estrógenos (FREZZA et al., 1990; GAO; BATALLER, 2011).

Estudos sobre a farmacocinética do etanol indicam que, após a ingestão da bebida alcoólica, a absorção etílica inicia-se no estômago (20%) e o restante no duodeno e intestino delgado. Na corrente sanguínea o álcool alcança o fígado e é metabolizado pela enzima ADH existente no citoplasma dos hepatócitos (ZAKHARI, 2006). Consequentemente, ocorre oxidação do álcool formando acetaldeídos (ERIKSSON, 2001). Os acetaldeídos são, então, oxidados pelas mitocôndrias formando acetato, através da aldeído desidrogenase. O acetato resultante deste processo é incorporado a acetilcoenzima A e é oxidado no ciclo de Krebs (CRABB; LIANGPUNSAKUL, 2007; DEITRICH; PETERSEN; VASILIOU, 2007).

Em termos de classificação, as injúrias hepáticas decorrentes do uso de álcool podem ser agrupadas em três estágios histológicos: fígado gorduroso ou esteatose simples, hepatite alcoólica e hepatite crônica com fibrose ou cirrose (CRAWFORD, 2012; McCULLOUGH; O'SHEA; DASARATHY, 2011). O comprometimento das funções hepáticas devido ao uso do álcool inclui esteatose macrovesicular na zona 3 (MACSWEEN; BURT, 1986) e esteatose microvesicular, típica do alcoolismo (UCHIDA et al., 1983). Entretanto, a esteatose hepática alcólica diminui rapidamente quando se cessa o consumo de álcool (LANE; LIEBER, 1966). A esteatose macrovesicular está associada com hepatomegalia assintomática e enfermidades digestivas inespecíficas. A degeneração espumosa alcoólica está relacionada com icterícia e níveis elevados de ALT, não condizente com a esteato-hepatite alcoólica (UCHIDA et al., 1983). Neste caso, a esteatose é considerada uma anormalidade histológica benigna

reversível. Todavia, os pacientes com este quadro e que mantêm o consumo de álcool desenvolvem fibrose e mesmo cirrose sem apresentar a esteato-hepatite clínica primeiro (TELI et al., 1995).

O consumo de álcool em pacientes com hepatite C acelera o desenvolvimento de fibrose, visto que, na exposição crônica ao álcool, os hepatócitos geram espécies reativas de oxigênio (ROS) em excesso pelas mitocôndrias e pela indução do citocromo P450 2E1 (CYP2E1), uma das enzimas do complexo enzimático citocromo P450. O resultado é o aumento da produção de colágeno com subsequente remodelação da MEC por HSCs e fibroblastos periportais (ZHU et al., 2012). Assim sendo, o citocromo P450 também exerce um importante papel na carcinogênese hepática. A esse respeito, ressalta-se que o consumo crônico de álcool acarreta um aumento na conversão de vários pró-carcinógenos, tais como nitrosaminas e compostos azo, em derivados carcinogênicos, mediante metabolismo dependente de CYP2E1 (KONISHI; ISHII, 2007; LU; CEDERBAUM, 2008).

Além das alterações pró-fibróticas apontadas acima, a geração excessiva de ROS acarreta danos ao DNA, às mitocôndrias, inflamação mediada por NF- κ B (*nuclear factor kappa B*) elevado e redução das defesas antioxidantes, as quais amplificam as injúrias, a fibrose e a propensão ao desenvolvimento do CHC na esteatohepatite (SEITZ; STICKEL, 2006; ZHU et al., 2012).

Estudos sobre a hepatocarcinogenicidade em função da geração de ROS demonstraram que as mesmas não decorrem apenas da indução de mutações no DNA, mas também devido a promoção de angiogênese pela elevação de prostaglandinas e pela sinalização do VEGF (fator de crescimento do endotélio vascular) e, por último, pela redução da efetividade dos sistemas de reparo de DNA (ARZUMANYAN; REIS; FEITELSON, 2013; IVANOV; BARTOSCH et al., 2013).

2.2.5 Aflatoxicose

As AFs foram descobertas no final da década de 1950, quando foram identificadas como agentes causadores da doença “X” do peru. A epidemia promoveu a morte de várias aves (perus, patos e pintos) alimentadas com rações contendo farelo de amendoim originário da América do Sul. As investigações revelaram que a toxicidade estava associada com a presença do fungo *Aspergillus flavus* e o nome “aflatoxina” (*A. flavus* toxina) foi atribuído aos agentes tóxicos (KENSLER et al., 2011).

A AF é uma micotoxina produzida pelos fungos das espécies *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, que são comuns na natureza. Eles crescem em alimentos como milho, arroz, sorgo, oleaginosas, frutas secas, legumes, café, cacau e amendoim quando armazenados em condições de calor e umidade (BOSETTI; TURATI; LA VECCHIA, 2014; MOUDGIL et al., 2013; SAAD-HUSSEIN, 2014). As micotoxinas são metabólitos secundários dos fungos que podem ser prejudiciais aos vertebrados após ingestão, inalação ou contato com a pele. Instituições do setor de agricultura estimam que aproximadamente 25% dos cereais produzidos no mundo estejam contaminados por micotoxinas (MARIN et al., 2013). Várias delas foram classificadas como cancerígenas pela IARC (MATSUDA et al., 2013).

A estabilidade química das AFs lhes confere alta resistência aos processos de torrefação, extrusão, cocção, congelamento e digestão. Por esse motivo, elas são um problema em alimentos processados, como castanhas torradas e produtos de padaria, embora esses procedimentos contribuam para algum grau de inativação da toxina (MARIN et al., 2013).

Cerca de 4,5 bilhões de pessoas no mundo estão expostas a AFs na dieta. A exposição é mais elevada em regiões tropicais e subtropicais, onde as condições de armazenamento de alimentos estão abaixo do ideal (LIU et al., 2012). Entretanto, a contaminação por fungos pode ocorrer também durante o crescimento e a colheita. Somado a isto, as estimativas de exposição com base nos níveis de AFs são imprecisas por causa da variação entre as amostras de um mesmo lote. Apenas uma única semente pode conter AF, mas o seu nível pode ser de até várias centenas de microgramas sendo que, para produtos destinados ao consumo humano, o nível tolerado é de 20 ppb ($1 \mu\text{g/kg} = 1 \text{ ppb}$). Consequentemente, um carregamento inteiro pode ser contaminado com níveis acima do regulamentar quando o produto é misturado e processado (KENSLER et al., 2011).

A toxicidade crônica é a forma mais comum de aflatoxicose e é causada pelo consumo de quantidades pequenas destes compostos tóxicos durante um período prolongado. Os efeitos tóxicos dependem de fatores como idade, espécie, gênero, estado nutricional, dose e tempo de exposição. Em seres humanos, o consumo crônico de alimentos contaminados tem sido associado a várias doenças: 1) câncer de fígado: infecções virais podem ser sinérgicas na etiologia do CHC; 2) reprodução: desenvolvimento testicular atrasado, degeneração testicular, diminuição do potencial reprodutivo, alterações morfológicas entre outras; 3) sistema imune: diminuição da resistência às infecções secundárias; 4) encefalopatia: AFs acarretam degeneração gordurosa do fígado e dos rins; 5) fibrose intersticial pulmonar: de exposição ocupacional através do trato respiratório (MARIN et al., 2013).

A. flavus produzem AF do tipo B e *A. parasiticus* produzem os tipos B e G (MARIN et al., 2013). Quatro tipos de AFs ocorrem naturalmente: B1 e B2 foram assim chamadas por causa de sua forte fluorescência azul (*blue*) sob luz ultravioleta, enquanto G1 e G2 têm fluorescência verde (*green*) ou amarelo-esverdeada. Estas propriedades facilitaram o rápido desenvolvimento de métodos de controle de produtos alimentares para a presença das toxinas no início da década de 1960 (KENSLER et al., 2011).

Um estudo realizado na União Européia, em 2007, revelou que castanhas do Brasil, pistaches e temperos representavam a maior porcentagem de amostras positivas para AFB1 (MARIN et al., 2013). A AFB1 é um dos mais potentes carcinógenos conhecidos na dieta humana demonstrando poderosa ação hepatocarcinogênica em várias espécies animais e tem sido implicada na etiologia do CHC (GROSS-STEINMEYER; EATON, 2012).

A contaminação de alimentos por AFs é um importante fator de risco para o desenvolvimento do CHC. Estudos epidemiológicos têm mostrado que esta substância contribui em grande parte para as altas taxas desse carcinoma (SAAD-HUSSEIN, 2014). Ela é a segunda causa do CHC na China, atrás apenas das infecções virais, e é provável que o seu controle seja responsável pela recente queda registrada nas taxas de incidência (BOSETTI; TURATI; LA VECCHIA, 2014). Liu et al. (2012) estimaram que 5 – 28% dos casos anuais de CHC em todo o mundo poderiam ser atribuídos à exposição à AF. A maioria deles ocorre na África sub-Saariana, Sudeste da Ásia e China, onde as populações sofrem também a elevada prevalência de VHB (KENSLER et al., 2011). Acredita-se que ambos os fatores interajam em sinergia (GROSS-STEINMEYER; EATON, 2012).

As AFs exibem ação tóxica, mutagênica, carcinogênica e teratogênica comprovada em diferentes espécies animais (MOUDGIL et al., 2013). As manifestações clínicas da aflatoxicose incluem vômitos, dor abdominal, edema pulmonar, infiltração gordurosa e necrose do fígado. O exame histopatológico revelou extensa proliferação de ductos biliares, uma lesão frequentemente observada em animais experimentais após a exposição aguda à AF (KENSLER et al., 2011).

A AF é um composto genotóxico. Após a ingestão, a AFB1 é metabolizada pelo fígado, seu alvo primário, em um subproduto ativo intermediário: exo-AFB-8,9-epóxido (AFBO). AFBO é altamente reativo e pode se ligar covalentemente a macromoléculas celulares. Ele forma adutos de lisina com albumina sérica e adutos pró-mutagênicos com DNA. A principal lesão do DNA é o aduto AFB-N⁷-guanina, que é quimicamente instável e sofre depurinação. Tais adutos causam danos como a mutação no gene supressor de tumor p53, na sequência rica em GC, observada em 50% dos casos de CHC. Se eles não forem

removidos por enzimas de reparo do DNA, podem gerar alterações somáticas caso estejam localizados em regiões transcricionalmente ativas. Embora reaja facilmente com nucleófilos celulares, o AFBO ainda pode ser inativado pela glutathione S-transferase (GST) na segunda fase da biotransformação, evitando assim a formação dos adutos (BOSETTI; TURATI; LA VECCHIA, 2014; GROSS-STEINMEYER; EATON, 2012; MARIN et al., 2013).

Adutos de AFB1-DNA favorecem mutações, prejudicam a função celular e estão associados com a presença de LPNs, caracterizadas como focos positivos para glutathione S-transferase forma placentar (GST-P), conferindo uma ligação direta entre o dano ao DNA, a mutagênese e a carcinogênese. A AF também forma adutos de RNA e de proteínas causando redução da biossíntese desses componentes. A interação com proteínas altera a sua conformação e, assim, pode afetar a sua função. AFB1 ainda provoca degranulação do retículo endoplasmático inibindo a tradução por polirribossomos nos hepatócitos. Doses elevadas da toxina podem inibir cada passo da síntese proteica (MOUDGIL et al., 2013).

2.3 FIBROSE E CIRROSE

A prevalência da cirrose, estimada a partir de estudos de autópsia, varia de 4,5 – 9,5% da população, o que representaria centenas de milhões de pessoas em todo o mundo. No entanto, é difícil determinar a incidência exata por causa do desenvolvimento silencioso da doença. Até 40% dos pacientes com cirrose são assintomáticos e podem permanecer assim por mais de uma década (LIM; KIM 2008).

A fibrose hepática antecede o quadro patológico da cirrose e decorre de uma série de doenças inflamatórias crônicas como as hepatites (virais, alcoólica, não-alcoólica e autoimune), injúrias tóxicas entre outras. Os estímulos inflamatórios promovem a ativação das HSC que se transformam em miofibroblastos secretores de colágeno. A produção de colágeno e outras moléculas da MEC excedem, em muito, a sua degradação pelas MMPs (TRABER et al., 2013). Desse modo, a fibrose é um processo fundamental na evolução de todas as doenças hepáticas crônicas até o estágio de cirrose (ZHOU; ZHANG; QIAO, 2014).

O processo de ativação das HSC consiste em duas fases principais: iniciação (ou fase pré-inflamatória) e perpetuação. Se a lesão for interrompida, segue-se uma terceira fase, a resolução. A iniciação refere-se a alterações na expressão gênica e no fenótipo que ocorrem logo após a lesão e tornam as células responsivas a citocinas e a outros estímulos. A estimulação parácrina inicial – exposição a peróxidos lipídicos, produtos de hepatócitos danificados e sinais de CK e CES – conduz à ativação das HSC, bem como modificações na

MEC. Uma vez que a célula está ativada, a fase de perpetuação resulta dos efeitos desses estímulos sobre a manutenção do fenótipo ativado. A ativação sustentada envolve pelo menos sete alterações no comportamento celular: proliferação, quimiotaxia, fibrogênese, contratilidade, degradação da matriz, perda de retinóide e liberação de citocinas. Durante esta fase, há liberação de estímulos pró-inflamatórios, pró-fibrogênicos e pró-mitóticos que atuam de forma autócrina e parácrina. A fase de resolução da fibrose refere-se às vias que causam apoptose, senescência ou quiescência das HSC (LEE; FRIEDMAN, 2011).

A fibrose hepática é uma resposta de cicatrização a qualquer lesão celular aguda ou crônica. Embora possa ser causada por vários estímulos, os mecanismos moleculares subjacentes à fibrose são basicamente os mesmos. Após a lesão hepática, ocorre um conjunto orquestrado de alterações celulares e moleculares. Durante a lesão aguda, as mudanças na arquitetura hepática são transitórias e reversíveis. Entretanto, se a lesão é sustentada, a inflamação crônica e o acúmulo de MEC persistem levando à substituição progressiva do parênquima hepático normal por tecido cicatricial (LEE; FRIEDMAN, 2011; LIEDTKE et al., 2013). As células fibrogênicas produzem quantidades excessivas de MEC em resposta a uma lesão inicial com o intuito de proteger as células parenquimais e manter a função do órgão. Todavia, na lesão crônica a função hepática é prejudicada devido à perda do parênquima (WALLACE; FRIEDMAN, 2014).

O resultado final do processo fibrótico é o acúmulo de MEC e a substituição do colágeno tipo IV, de baixa densidade, pelo colágeno tipo I, de alta densidade, no espaço de Disse (ALBANIS; FRIEDMAN, 2006). Com injúria permanente, a fibrose se inicia em torno de tratos portais ou veias centrais, eventualmente formando pontes de fibrose com a formação de nódulos regenerativos circundados por septos espessos de tecido fibroso, determinando a cirrose (TRABER et al., 2013). Mesmo sob injúria constante, o fígado possui uma capacidade regenerativa notável fazendo com que os pacientes progridam lentamente para cirrose ao longo de décadas (LEE; FRIEDMAN, 2011). Esta capacidade de regeneração singular permite à fibrose persistir durante anos mantendo a função normal, enquanto que em tecidos como o pulmão a fibrose idiopática leva à falha pulmonar em curto intervalo de tempo (WALLACE; FRIEDMAN, 2014).

A cirrose hepática é um processo de inflamação, necrose e regeneração grave e irreversível (WHO, 2014). Embora suas causas sejam multifatoriais, algumas características patológicas são comuns a todos os casos, como degeneração e necrose dos hepatócitos, substituição do parênquima por tecido fibroso, formação de nódulos regenerativos e perda de função hepática. A arquitetura distorcida do fígado cirrótico interfere no fluxo sanguíneo e

resulta em hipertensão portal, insuficiência hepática pela redução da função hepatocelular, icterícia, ascite e risco de CHC (TRABER et al., 2013; ZHOU; ZHANG; QIAO, 2014).

A hepatocarcinogênese no fígado cirrótico é favorecida por um microambiente suscetível combinado com respostas teciduais simultâneas, incluindo angiogênese, inflamação crônica, estresse oxidativo, entre outras. Além disso, a regeneração sustentada dos hepatócitos e a expansão de CPH no cenário da lesão crônica também podem acarretar a ativação de oncogenes nos hepatócitos promovendo, assim, o desenvolvimento tumoral (WALLACE; FRIEDMAN, 2014).

Em até 90% dos pacientes o CHC se desenvolve no fígado cirrótico, porém os mecanismos pelos quais a cirrose contribui para a transformação maligna ainda não foram elucidados. Uma possível explicação é que a própria cirrose seja uma condição pré-maligna, ou seja, na presença de fatores adicionais (carcinógenos químicos ou virais) a hiperplasia dos hepatócitos propicia o surgimento do tumor. Um outro mecanismo possível de tumorigênese no fígado cirrótico é que o indivíduo se torna mais suscetível aos agentes cancerígenos ambientais. O aumento da taxa de renovação de hepatócitos age como promotor tumoral, pois as células em mitose são mais propensas a danos ao DNA. Além disso, a rápida renovação celular interfere no processo de reparo do DNA, resultando em alterações que são transmitidas para as células filhas e, assim, fixadas na progênie (KEW, 2014).

A resposta regenerativa é, na realidade, uma “faca de dois gumes”: enquanto a regeneração contínua é fundamental para a manutenção da função hepática, os hepatócitos estão proliferando em um cenário de inflamação crônica e estresse oxidativo, na presença de agentes capazes de causar danos genotóxicos e na presença de cirrose em curso. Algumas das células em divisão nos nódulos regenerativos acumularão alterações genéticas ou epigenéticas suficientes para marcar o início da transformação neoplásica. Esta proliferação celular em um microambiente adverso parece ser a condução da tumorigênese na maioria dos pacientes com lesões hepáticas crônicas (NEJAK-BOWEN; MONGA, 2011).

2.4 LESÕES PRÉ-NEOPLÁSICAS

Comparando-se as características histomorfológicas das lesões hepáticas de ratos e de humanos, é evidente que existem grandes semelhanças quanto a aspectos diagnósticos, padrões de crescimento e de comportamento em ambas as espécies. O estudo das lesões pré-neoplásicas (LPNs) em modelos experimentais ajuda a definir melhor o seu papel na

progressão para malignidade e no fornecimento de uma base para a utilização de respostas do fígado exposto a xenobióticos (THOOLEN et al., 2012).

O CHC está associado com várias LPNs morfológicamente distintas. Contudo, o fato de uma lesão estar relacionada com o desenvolvimento e a presença de CHC não significa que seja necessariamente uma lesão precursora do tumor. O termo “lesão pré-neoplásica” costuma ser empregado para todas as lesões que estão associadas com CHC, independente da sua relação precursora (LIBBRECHT; DESMET; ROSKAMS, 2005).

2.4.1 Macronódulo regenerativo

Os grandes nódulos regenerativos, ou macronódulos, são muito maiores do que os nódulos regenerativos cirróticos ao redor, com um diâmetro mínimo de 5 mm no fígado humano. Este tipo de nódulo não mostra atipia citológica ou arquitetural. Eles estão localizados principalmente ao lado de grandes tratos portais e a fibrose hepática mais branda nesses locais contribui para o seu maior tamanho. Há evidências de que os grandes nódulos regenerativos não sejam lesões precursoras de CHC. No nível molecular, eles são semelhantes aos nódulos regenerativos comuns, o que está de acordo com as suas características morfológicas. A simples constatação de uma proporção considerável de nódulos displásicos e CHCs menores do que 5 mm ilustra que os macronódulos não são um passo obrigatório para o desenvolvimento do CHC (LIBBRECHT; DESMET; ROSKAMS, 2005).

Embora o macronódulo não seja considerado uma lesão precursora de CHC, existe uma forte associação entre ambos, reforçando a sua natureza pré-neoplásica. Os fatos que demonstram o papel efetivo dos macronódulos na hepatocarcinogênese incluem: a presença simultânea de macronódulos e CHC, a ocorrência de focos de displasia ou de CHC no macronódulo e a sua progressão para CHC. A vigilância dos pacientes com macronódulos mostra que cerca de metade deles evoluem para CHC no prazo de 5 anos, sendo a presença de displasia uma condição preditiva de transformação maligna (VELOSA, 2011).

2.4.2 Hiperplasia nodular focal

A hiperplasia nodular focal (HNF) resulta da resposta de crescimento alterada secundária ao fluxo sanguíneo anormal. As características histológicas típicas de HNF incluem arquitetura nodular, cicatriz central estrelada, septos fibrosos radiados compostos por estruturas biliares rodeadas por células inflamatórias, CK e vasos malformados, como

arteríolas de paredes espessas. As placas de hepatócitos são de 1 a 2 células de espessura, mas focalmente placas espessas podem ser vistas na periferia. A HNF também pode apresentar telangiectasia (dilatação sinusoidal) (SHAFIZADEH; KAKAR, 2011; TEIXEIRA et al., 2007).

A HNF é um crescimento tumoral hiperplásico dos hepatócitos que ocorre no fígado cirrótico e não-cirrótico. O fígado afetado pode apresentar múltiplas lesões e a própria HNF pode ser incidental sobre outras lesões, como o adenoma hepatocelular (BELLAMY, 2011). Ambas são nódulos benignos, porém a HNF é mais comum e não tem potencial para transformação maligna. O diagnóstico diferencial destas lesões é uma tarefa difícil, mas a distinção entre elas é crucial, pois o adenoma normalmente merece ressecção cirúrgica devido ao risco de sangramento e, principalmente, de malignização enquanto que a HNF não requer este tipo de intervenção (LO; NG, 2011; SHAFIZADEH; KAKAR, 2011; TEIXEIRA et al., 2007).

2.4.3 Adenoma hepatocelular

O adenoma hepatocelular (AH) é uma neoplasia benigna que surge no fígado não cirrótico. A lesão geralmente é única, mas o fígado pode abrigar múltiplos adenomas, configurando um quadro de adenomatose quando mais de 10 estão presentes. A quantidade de lesões não tem valor clínico na categorização dos pacientes; os aspectos realmente importantes são o gênero do paciente e o tamanho da lesão. O AH varia de alguns milímetros a vários centímetros, tendo-se registro de nódulos com até 30 cm de diâmetro. Em adição, mulheres em idade reprodutiva (cerca de 90%) são mais afetadas por causa do uso de contraceptivos orais (BELLAMY, 2011; CURRY; AFDHAL, 2014).

O AH também pode estar associado a doenças específicas, incluindo doenças hereditárias, armazenamento de glicogênio, diabetes, exposição a estrogênios não contraceptivos e anabolizantes. Nestes casos, os homens apresentam maior incidência. O diagnóstico, muitas vezes, é por acaso. As lesões são encontradas incidentalmente em pacientes submetidos à ultrassonografia, tomografia computadorizada ou ressonância magnética por causa de sintomas não relacionados ou inespecíficos. Esses pacientes podem apresentar dor ou desconforto abdominal e uma crise aguda pode ser causada por hemorragia intraperitoneal (BELLAMY, 2011; CURRY; AFDHAL, 2014).

O AH é macio e liso com coloração castanha. Vasos sanguíneos proeminentes estão presentes na superfície e no interior do tumor com áreas de hemorragia e necrose.

Microscopicamente, é constituído por grandes placas de hepatócitos, os quais são maiores do que os normais e contêm glicogénio e lipídios em abundância. Os núcleos são pequenos e regulares e mitoses raramente são vistas. Há modificação da arquitetura hepática normal e as células estão dispostas em trabéculas normais ou espessadas intercaladas com artérias proeminentes e vasos sanguíneos e sinusóides de paredes finas. A maioria dos AHs não mostra arquitetura nodular ou reação ductular, mas estas características podem ocorrer no AH do tipo inflamatório, no qual se observa também típica telangiectasia, lembrando a HNF. Todavia, a ausência de septos regulares, tratos portais e ductos biliares ajuda a distinguir o AH tanto da HNF quanto do tecido não-neoplásico. CK podem estar presentes em pequeno número (CURRY; AFDHAL, 2014; SHAFIZADEH; KAKAR, 2011).

O AH tem sido associado com transformação maligna, hemorragia espontânea, e ruptura. A transformação maligna ocorre em cerca de 10% dos casos e o risco de progressão para o CHC é maior em lesões grandes e naquelas que mostram β -catenina ativada. Além disso, a progressão maligna é mais provável em homens (43%) e adenomas de qualquer tamanho podem ser considerados de risco. Uma possível explicação para a maior incidência de malignização no sexo masculino pode residir na convergência e sinergismo de diferentes fatores etiológicos implicados no desenvolvimento de CHC (BELLAMY, 2011; VELOSA, 2011).

2.4.4 Nódulo displásico

O nódulo displásico (ND) é um nódulo benigno de hepatócitos neoplásicos no fígado cirrótico com grande potencial para desenvolver CHC. Estes nódulos geralmente tem 1 – 2 cm de diâmetro e, assim com o AH, são encontrados casualmente em amostras de ressecção ou em exames imagiológicos. Eles são distintos dos nódulos regenerativos benignos associados à cirrose em virtude do elevado índice proliferativo e da clonalidade. Os NDs podem mostrar áreas de infiltração gordurosa e são caracterizados por uma população ligeiramente atípica de hepatócitos compactos, ainda com espaços porta residuais presentes, mas com início de neovascularização (novas arteríolas) em lesões mais avançadas. Ocasionalmente, um subnódulo está presente mostrando progressão para o CHC bem diferenciado, caso em que, obviamente, já não é adequado diagnosticá-lo como lesão benigna. Cerca de um terço dos NDs progridem para CHC (BELLAMY, 2011; GOMES et al., 2013).

O ND corresponde à expansão de um clone de células geneticamente alteradas que, numa fase inicial, se organizam em um foco hiperplásico – atualmente designado por

displasia de pequenas ou grandes células – e que posteriormente evolui para CHC inicial. Os focos displásicos de pequenas células são constituídos por hepatócitos monoclonais com relação núcleo/citoplasma moderadamente aumentada. Eles apresentam elevado índice proliferativo, baixa taxa de apoptose e mutações genéticas colaboram para aquisição de autonomia proliferativa. Nos focos displásicos de grandes células os hepatócitos são atípicos com núcleo grande, pleomórfico e nucléolo proeminente, mas a relação núcleo/citoplasma é normal. Esta lesão não é considerada precursora de CHC porque seriam células senescentes com pouca ou nenhuma capacidade proliferativa. Nas situações de intensa renovação celular, como no processo regenerativo, as células vão perdendo gradualmente a capacidade de se dividir devido ao progressivo encurtamento do telômero (VELOSA, 2011).

Dentre os critérios patológicos para distinguir NDs de alto grau (NDAG) de CHC precoce foi introduzido também o conceito do ND de baixo grau (NDBG): lesão ligeiramente nodular com cicatriz fibrosa periférica, aumento discreto da celularidade sem atipia citológica, trabéculas espessadas, pseudoglândulas ou mitoses também estão ausentes; a displasia é leve e não expressa qualquer relação com as neoplasias. Já os NDAGs mostram atipia arquitetural e/ou citológica com aumento da densidade celular (alteração de pequenas células), trabéculas mais espessas, pseudoglândulas e formações características do tipo nódulo em nódulo, assemelhando-se ao CHC bem diferenciado (GOMES et al., 2013; LO; NG, 2011).

2.5 CARCINOMA HEPATOCELULAR

O CHC é diagnosticado por uma combinação de exames imagiológicos e verificação de níveis séricos de alfa-fetoproteína (AFP). A implementação de programas de vigilância em pacientes de alto risco levou a um aumento no diagnóstico de CHC inicial em estágios assintomáticos. Se o tumor é detectado nesta fase, as intervenções cirúrgicas (ressecção ou transplante) são tratamentos curativos eficazes. Nestes casos, a taxa média de sobrevida em 5 anos é de aproximadamente 70% (TU et al., 2014).

O CHC se desenvolve mais frequentemente em fígado cirrótico, podendo ser único ou múltiplo e acompanhado ou não de nódulos displásicos. As células malignas se assemelham aos hepatócitos normais, mas estão dispostas em placas de espessura aberrante ou outras arquiteturas diferentes do fígado não neoplásico. Carcinomas pequenos normalmente são bem ou moderadamente diferenciados, mas à medida que o tumor aumenta tais áreas se tornam menos diferenciadas. Tumores iniciais contêm células geralmente muito compactas, enquanto que nos mais avançados as células são maiores e mais atípicas. Alguns tratamentos residuais

podem ser vistos nos CHCs iniciais que ainda não são neovascularizados. No entanto, os tratos portais não são mais evidentes nos carcinomas mais progredidos nos quais extensa neovascularização por arteríolas de alimentação torna a lesão hipervascularizada (BELLAMY, 2011).

2.5.1 Hepatocarcinogênese

A carcinogênese hepática é um processo de várias etapas e de longo prazo caracterizado pela presença de fatores de risco específicos que promovem danos genéticos e conduzem a uma cascata de desregulações celulares e moleculares. O acúmulo progressivo e a interação dessas alterações resultam na transformação maligna dos hepatócitos seguida de crescimento anormal, invasão vascular e metástase (LI; TANG; HOU, 2012; LIBBRECHT; DESMET; ROSKAMS, 2005).

A hepatocarcinogênese compreende 3 fases: iniciação, promoção e progressão. A iniciação pode ocorrer em uma única célula e resulta de uma mutação simples ou alteração epigenética em genes relacionados que estejam envolvidos em vias regulatórias da célula, alterando o seu fenótipo. A promoção (pré-neoplasia) é a alteração reversível das vias de transdução de sinal na célula iniciada, levando a um aumento seletivo da replicação celular e uma inibição seletiva da apoptose. Já a fase de progressão (neoplasia) tem por base a instabilidade genômica acompanhada por aumento da taxa de crescimento, invasividade, metástase e alterações bioquímicas (PITOT, 2007; PITOT; DRAGAN, 1991).

Visto que as alterações moleculares podem ser consequência da lesão genotóxica decorrente dos agentes iniciadores, qualquer condição relacionada ao desenvolvimento de fibrose e cirrose tem sido também associada com o CHC (NEJAK-BOWEN; MONGA, 2011). Independentemente da etiologia, a cirrose hepática constitui um microambiente que promove a iniciação e promoção da carcinogênese, facilitando alterações genéticas e epigenéticas que propiciam a transformação celular, o que é frequentemente referido como “campo de cancerização” ou “efeito de campo”. Esse processo pode levar várias décadas (20 – 40 anos) antes do estabelecimento da cirrose, refletindo a resistência do fígado a erros de replicação (HOSHIDA; FUCHS; TANABE, 2012).

O fígado é único em sua resposta à lesão subsistindo, simultaneamente, a regeneração e fibrose. À medida que as células fibrogênicas primárias do fígado (HSCs ativadas e miofibroblastos) conduzem fibrinogênese e angiogênese, as alterações que proporcionam a sobrevivência de hepatócitos pré-neoplásicos e HSCs ativadas podem sustentar diretamente a

tumorigênese. Além disso, as alterações fibróticas modulam a atividade das células inflamatórias no fígado, reduzindo a atividade de células *natural killer* e *natural killer T* que normalmente contribuem para a vigilância de tumores. Da mesma forma, miofibroblastos hepáticos podem contribuir para o crescimento e migração de hepatócitos malignos através de mecanismos mediados por PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas) e TGF- β (fator de crescimento transformador beta). Ainda, as HSCs ativadas secretam angiopoietina1, favorecendo um ambiente angiogênico que suporta o crescimento tumoral. Essas vias funcionam em sinergia com sinais inflamatórios, incluindo a reativação da telomerase e liberação de ROS, e podem contribuir para a transformação maligna (KEW, 2014).

As doenças hepáticas crônicas geram uma contínua morte dos hepatócitos com uma excessiva proliferação compensatória. Estima-se que 1 – 3% dos hepatócitos morram diariamente em contraste com 0,01% no fígado saudável. A morte celular exacerbada, obviamente, exige uma extensa proliferação para manter a massa hepática estável (ARAVALLI et al., 2009). Assim, a regeneração é uma faca de dois gumes nas doenças crônicas, pois ao mesmo tempo em que é fundamental para a manutenção da função hepática em meio à lesão (viral, metabólica ou tóxica), inflamação e cirrose, também é fonte de displasia quando os hepatócitos proliferam em um meio adverso. Uma vez que a iniciação tenha ocorrido, o tumor ainda pode se utilizar das vias mitogênicas da regeneração para a proliferação das células tumorais. A neoplasia pode ser auto-sustentável, pois ela própria pode produzir muitas substâncias, tais como os fatores de crescimento angiogênicos e colaboram para o crescimento tumoral (NEJAK-BOWEN; MONGA, 2011; VELOSA, 2011).

2.5.2 Microambiente

Até pouco tempo atrás, acreditava-se que o CHC decorresse apenas da transformação dos hepatócitos. No entanto, a multiplicidade de subtipos e fenótipos encontrados sugere que o tumor pode ser originário de outros tipos de células. São crescentes as evidências de que a iniciação do CHC não se deve somente às alterações moleculares nos hepatócitos, mas também seja influenciada por uma variedade de mediadores no microambiente hepático, como células estromais, microflora intestinal e microvesículas. O microambiente deve ser considerado em todas as etapas da hepatocarcinogênese. Estudos demonstram que as células tumorais circulantes não se limitam a crescer em qualquer local do corpo onde alcancem, mas o seu destino (metástase ou quiescência) é determinado pelo microambiente do tecido “semeado”, hipótese chamada “a semente e o solo” (TU et al., 2014).

Vários fatores microambientais podem induzir diretamente as alterações do DNA que estão associadas com a progressão gradual do CHC. A inflamação crônica é um dos principais contribuintes para o seu desenvolvimento e precede-o em praticamente todos os casos. A morte celular associada com infecções crônicas pode provocar a produção de ROS, incluindo peróxido de hidrogênio e radicais hidroxila e superóxido por macrófagos, neutrófilos e linfócitos T citotóxicos resultando em estresse oxidativo. Além disso, espécies reativas de nitrogênio são produzidas por hepatócitos em hipóxia, pelo aumento oxidativo do infiltrado inflamatório e pelas células endoteliais que respondem ao fluxo sanguíneo alterado. Outra característica da inflamação crônica é a remodelação do tecido, que se manifesta como fibrose e cirrose. A inflamação também pode levar a tolerância ou a exaustão da imunidade celular. A evasão tumoral da resposta imune pode também ser facilitada pelo microambiente tolerogênico intrínseco do fígado causado, em parte, pelas CKs (TU et al., 2014).

Componentes do microambiente estromal podem ser divididos em três subclasses: células angiogênicas, células do sistema imunológico e células fibrogênicas associadas ao câncer. Há uma crescente evidência da contribuição das células estromais para as características do câncer, como: sustentar a sinalização proliferativa, escapar dos supressores de crescimento, resistir à morte celular, permitir a imortalidade replicativa, induzir a angiogênese, ativar invasão e metástase, reprogramar o metabolismo energético e evadir do sistema imune. Estes aspectos destacam o profundo envolvimento de uma rede dinâmica de células não tumorais, moléculas e fatores solúveis na geração de um ambiente favorável à iniciação e progressão do CHC. O ambiente pré-neoplásico de doença hepática crônica é caracterizado por neoangiogênese (arterialização e capilarização sinusoidal), inflamação e fibrose. Estes processos biológicos tornam-se mais pronunciados com a progressão da insuficiência hepática, na qual a incidência de câncer aumenta exponencialmente (HERNANDEZ-GEA et al., 2013).

A caracterização dos mecanismos desses novos fatores tem motivado a busca de novas terapias para tratar não apenas o tumor em si, mas também o microambiente hepático para prevenir a recorrência e a resistência associada com o tratamento (TU et al., 2014).

2.5.3 Biomarcadores

O CHC é uma das principais complicações da cirrose e a identificação de marcadores de detecção precoce que o discriminem do tecido cirrótico poderia reduzir significativamente a sua morbidade e mortalidade (HANNIVOORT; HERNANDEZ-GEA; FRIEDMAN, 2012).

As vias que participam do desenvolvimento do CHC geralmente apresentam hiperregulação de genes envolvidos na progressão do ciclo celular, proliferação e evasão da apoptose. Isto não só permite uma maior rapidez no crescimento tumoral e escape de alguns mecanismos de reparo do DNA, como é particularmente importante para a progressão do CHC no microambiente hepático, onde a replicação é fortemente regulada (TU et al., 2014).

A AFP é uma glicoproteína normalmente produzida pelo fígado fetal e saco vitelínico que pode estar elevada com o desenvolvimento do CHC (GOMES et al., 2013). Apesar da sensibilidade bastante baixa na fase inicial do tumor, a AFP tem sido o marcador sorológico mais usado para rastrear e diagnosticar o CHC (VELOSA, 2011). Em tumores que secretam AFP, a concentração está relacionada com o tamanho do tumor, portanto, nos CHCs iniciais é improvável um diagnóstico de AFP alta (SHERMAN, 2010).

A hepatocarcinogênese é um processo complexo em que muitas cascatas de sinalização são alteradas, levando a um perfil molecular heterogêneo. As principais mutações incluem o gene supressor de tumor p53 (presente em 25 – 40% dos casos, dependendo do estágio tumoral) e o gene da β -catenina (cerca de 25%, predominantemente relacionado com o VHC) (FORNER; LLOVET; BRUIX, 2012). A ativação da via Wnt/ β -catenina é um dos eventos mais frequentes associados com transformação maligna das células hepáticas, sendo observada em 10% dos AHs, mas não na HNF (CAPURRO et al., 2005; SHAFIZADEH; KAKAR, 2011). A ativação desta via tem sido relatada em até 90% dos CHCs e pode atuar em conjunto com p53 (TU et al., 2014).

A via Wnt é muito conservada ao longo da evolução e está envolvida na homeostase, diferenciação, motilidade, proliferação e apoptose (ARAVALLI; STEER; CRESSMAN, 2008). A β -catenina é um componente essencial dessa via, desempenhando funções de adesão celular, transdução de sinal e transcrição gênica (KIM; SILLS; HOULE, 2005). A β -catenina é uma proteína estrutural no sistema de adesão célula-célula, junto com a E-caderina, além de atuar como reguladora na diferenciação e reparo dos tecidos (SHAFIZADEH; KAKAR, 2011). A cascata de sinalização se inicia quando proteínas Wnts estimulam o receptor Frizzled e provocam a dissociação do complexo β -catenina/E-caderina na membrana plasmática. O aumento da biodisponibilidade de β -catenina no citoplasma promove a sua estabilização e translocação para o núcleo, onde atua como coativador de fatores de transcrição, regulando a expressão de genes associados à proliferação, apoptose, metabolismo e remodelação de MEC, tais como c-myc, c-jun, ciclina D1, GSK3 β , MMP, survivina e VEGF (TOVAR; VILLANUEVA; LLOVET, 2007; TU et al., 2014).

Distinguir nódulos displásicos de tumores iniciais é uma tarefa difícil, porém crucial para a escolha do tratamento. Assim, vários marcadores têm sido propostos e, sobretudo a combinação entre eles, aliando sensibilidade e especificidade, é considerada para a sua validação. Di Tommaso et al. (2007) compuseram um painel imuno-histoquímico de marcadores que aumentam a acurácia no diagnóstico diferencial entre lesões malignas iniciais e nódulos displásicos em tecido cirrótico. O painel é constituído pelas proteínas glypican-3 (GPC3), *heat shock protein 70* (HSP70) e glutamina sintetase (GS).

A GPC3 é uma proteoglicana heparan-sulfato ancorada à membrana plasmática por meio de um glicosilfosfatidilinositol. Ela é capaz de modular a atividade de crescimento, diferenciação e migração celular. A expressão aumentada no CHC comparada à LPN e ao tecido cirrótico sugere sua atuação na transformação maligna de nódulos displásicos (LIBBRECHT et al., 2006; LLOVET et al., 2006). Além disso, a GPC3 promove o crescimento do CHC por formar complexos com Wnts e facilitar a ligação com seus receptores estimulando a sinalização nessa via (CAPURRO et al., 2005). Esta proteína chamou a atenção como possível marcador ao se observar que sua expressão gênica e proteica era elevada em até 90% dos pacientes com CHC negativos para AFP (LO; NG, 2011).

A HSP70 é uma proteína fisiologicamente essencial, conservada em procariotos e eucariotos, que realiza funções intracelulares vitais (CHUMA et al., 2003). É um potente antiapoptótico cujo aumento permite a sobrevivência das células em condições adversas (SHAFIZADEH; KAKAR, 2011). Ínjúrias de qualquer natureza resultam na aquisição de proteção contra o agente e o aumento de HSPs confere resistência ao estresse celular, contribuindo para o crescimento das lesões (LINDEMAN; SKARPEN; HUITFELDT, 1998). O aumento de HSP70 é observado em vários tumores, sugerindo seu envolvimento na transformação ou na progressão dos carcinomas, bem como na malignidade e resistência à terapia (MAYER; BUKAU, 2005). A HSP70 pode ser um marcador diferencial entre LPN e CHC inicial por não ser expressa em lesões benignas como AH e HNF (SAKAMOTO, 2009).

A GS é uma enzima fundamental no metabolismo do nitrogênio catalizando a síntese de glutamina a partir de glutamato e amônia. A glutamina é a maior fonte de energia das células tumorais e, assim, a expressão de GS aumenta gradualmente da LPN para o CHC. Esta enzima tem sido considerada alvo de sinalização da β -catenina. O aumento de GS pode refletir a ativação dessa via com uma forte expressão em tecidos que apresentam β -catenina nuclear (DI TOMMASO et al., 2009; SAKAMOTO, 2009; SHAFIZADEH; KAKAR, 2011). Além do painel imuno-histoquímico, a análise de três genes é utilizada como uma assinatura molecular no estudo do CHC. Este conjunto de genes é constituído por survivina, LYVE1

(*lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor*) e GPC3, descrito anteriormente. Eles foram propostos como marcadores do CHC inicial diferenciando-o de nódulos displásicos em fígados cirróticos (LLOVET et al., 2006).

A survivina é um inibidor de apoptose envolvido na progressão tumoral por favorecer a proliferação celular e estar relacionado com alto risco de recorrência e prognose pobre (FABREGAT, 2009). Tumores que expressam survivina apresentam comportamento tumoral mais agressivo, associação com marcadores desfavoráveis de progressão da doença, menor sobrevida, taxa de recorrência acelerada e maior resistência à terapia. A survivina está significativamente relacionada com níveis de AFP, invasão microvascular, proliferação celular e estágio tumoral. A survivina é mais sensível do que a GPC3 para detectar CHC, porém é menos específica (NASSAR; COHEN; SIDDIQUI, 2009).

O LYVE1 é um receptor de ácido hialurônico expresso pelas células endoteliais de vasos linfáticos que está ausente em vasos angiogênicos (CARREIRA et al., 2001). A expressão gênica deste receptor é diminuída em alguns tumores como resultado da destruição dos vasos linfáticos devido à invasão tumoral, mas ele permanece expresso no tecido adjacente. A baixa expressão do LYVE1, tanto gênica quanto proteica, é progressiva da cirrose para o CHC (LLOVET et al., 2006).

2.5.4 Modelos experimentais

Modelos animais representam ferramentas essenciais na pesquisa do câncer, uma vez que permitem reproduzir aspectos genéticos, fisiopatológicos ou ambientais que possam ser importantes para o desenvolvimento da neoplasia, além de estudar novas abordagens terapêuticas (De MINICIS et al., 2013).

A utilização de modelos experimentais que mimetizem a condição humana é crucial para os esforços em melhorar o tratamento do CHC. Os modelos animais substituem o sistema biológico humano e são usados para entender as funções orgânicas e proporcionar uma base para intervenção preventiva ou terapêutica nas doenças humanas. Um modelo animal deve satisfazer uma série de critérios-chave: (1) permitir uma avaliação precisa dos efeitos do tratamento; (2) ser confiável e previsível na geração do tumor para estudos de cinética de crescimento; (3) ser detectado pelos métodos imagiológicos convencionais; (4) ser barato e evitar qualquer exigência de imunossupressão; (5) permitir que as diferenças de sobrevivência se manifestem (sem mortalidade em curto prazo por doença metastática espontânea ou iatrogênica); (6) evitar identidade genética clonal inata; (7) derivar de um tipo

de célula relevante, de fácil propagação e caracterização em cultura de células e (8) ocorrer em um cenário semelhante ao da doença humana (ARAVALLI et al., 2009).

O fígado é o tecido mais comum para o desenvolvimento de tumores em estudos da exposição crônica a xenobióticos em roedores experimentais. No entanto, a maioria dos modelos positivos para o câncer não conseguem produzir a sequência patogênica do CHC humano começando com fibrose, cirrose, angiogênese e nódulos pré-neoplásicos antes do CHC (HERNANDEZ–GEA et al., 2013; UEHARA et al., 2013).

Há quatro categorias principais de modelos murinos para CHC: induzidos quimicamente, conduzidos por oncogene, modificados geneticamente e xenotransplantes (HERNANDEZ–GEA et al., 2013). Neste trabalho, focaremos os modelos induzidos quimicamente, um dos quais é o tema do nosso estudo.

Vários produtos químicos agredem o fígado e induzem desenvolvimento e progressão de tumores. Os compostos carcinogênicos podem ser de dois tipos: agentes genotóxicos (induzem diretamente a formação de tumor) ou agentes promotores (aumentam a formação de tumor quando associados com agentes genotóxicos). O tratamento com um agente promotor facilita a expansão clonal das células pré-neoplásicas potencializando, portanto, o desenvolvimento do tumor e a sua agressividade. A principal vantagem dos modelos induzidos quimicamente é a semelhança com o ciclo de lesão-fibrose-malignidade vista em humanos (De MINICIS et al., 2013).

2.5.4.1 Dietilnitrosamina

A dietilnitrosamina (DEN) é uma substância cancerígena bastante utilizada que induz tumores hepáticos semelhantes ao CHC humano. A hepatocarcinogênese é gerada através dos passos de iniciação e promoção com ciclos de necrose e regeneração promovendo a transformação neoplásica. A iniciação é feita com a injeção de DEN e, em seguida, é administrado um agente promotor (nodularina, fenobarbital, tioacetamida, tetracloreto de carbono, hepatectomia parcial ou antígeno da hepatite B). A progressão das lesões displásicas para tumores malignos está associada a um aumento da ocorrência de alterações genômicas. Isto requer um longo período de indução que varia de 12 a 18 meses e produz somente CHC sem cirrose hepática (BAKIRI; WAGNER, 2013; HUANG et al., 2008).

As características específicas deste modelo incluem dose dependência, tempo de administração, associação com agentes promotores e eficácia relacionada com sexo, idade e linhagem dos animais. Contudo, o tempo de iniciação é um determinante crítico e um fator

limitante devido à longa duração dos experimentos. O tempo médio para o desenvolvimento de CHC é de 50 semanas (BAKIRI; WAGNER, 2013; De MINICIS et al., 2013).

A DEN sofre ativação metabólica nos hepatócitos por enzimas da família citocromo P450. A atividade carcinogênica desta substância é exercida de dois modos diferentes:

- a) por alquilação da estrutura do DNA, causando danos ao material genético e subsequente degeneração celular pela formação de adutos de DNA mutagênicos;
- b) por produção de ROS, danificando DNA, proteínas e lipídios e levando à morte celular.

O modelo clássico de hepatocarcinogênese induzida por DEN é conhecido como protocolo de Solt-Farber ou modelo do “hepatócito resistente” (De MINICIS et al., 2013). Neste modelo, a iniciação com DEN é seguida por aplicação de 2-acetilaminofluoreno (2-AAF), para inibir a proliferação dos hepatócitos normais. Posteriormente, uma hepatectomia parcial é realizada para estimular a proliferação dos hepatócitos iniciados (SOLT; FARBER, 1976). Embora seja um modelo extensamente utilizado, este também não reproduz a patogênese do CHC humano com os processos patológicos de fibrose e cirrose.

Outros modelos de CHC através de DEN usam uma única injeção intraperitoneal. O tumor se desenvolve após 9 a 12 meses, mas o parênquima hepático exibe pouca ou nenhuma fibrose. Somente se injetada semanalmente e por um longo período, a DEN pode demonstrar o desenvolvimento de fibrose e CHC (WALLACE; FRIEDMAN, 2014).

2.5.4.2 *Tetracloreto de carbono*

O tetracloreto de carbono (CCl_4) foi utilizado antigamente na composição de desengordurante de metais, fluido de limpeza a seco, removedor de manchas de tecido, extintor de incêndio e pesticida (SINGH et al., 2012).

Como carcinógeno, é uma das substâncias mais utilizadas para a indução de lesão hepática em animais de laboratório. O CCl_4 pode ser administrado pelas vias intraperitoneal, subcutânea, intra-gástrica ou inalatória. No entanto, injeção pode causar inflamação local e a administração oral pode ocasionar maior mortalidade e fibrose hepática menos uniforme (LIU et al., 2013). Ademais, o CCl_4 pode afetar outros órgãos por causa da sua elevada solubilidade lipídica (KAUSHIK et al., 2013).

O CCl_4 tem sido amplamente empregado no estudo da patogênese da cirrose e da reversibilidade da fibrose. Após a retirada do agente, depois de 4 semanas de intoxicação, a fibrose sofre resolução espontânea com remodelamento da MEC, mas se a injúria é

continuada, a fibrose evolui levando à cirrose e CHC (LIU et al., 2013). Estudos que utilizaram CCl_4 em ratos obtiveram eficácia de 30% na formação de tumores após 30 semanas de administração demonstrando baixo rendimento do modelo (De MINICIS et al., 2013).

A hepatotoxicidade do CCl_4 se dá de duas formas: atividade do citocromo P450 com consequente aumento da formação de ROS e indução de resposta inflamatória por CKs através da produção de fatores pró-inflamatórios (De MINICIS et al., 2013). O CCl_4 prejudica diretamente os hepatócitos alterando a permeabilidade das membranas celulares. Esta hepatotoxina provoca o bloqueio na síntese de lipoproteínas gerando acúmulo de gordura no fígado, visto que as lipoproteínas transportam os triglicerídeos para fora deste órgão. A biotransformação do CCl_4 produz o radical livre triclorometil (CCl_3^*), o qual reage rapidamente com o oxigênio produzindo o radical triclorometil peróxido (CCl_3OO^*) altamente reativo. Ambos os radicais induzem peroxidação lipídica e danos na membrana, causando severa necrose centrolobular. O processo de peroxidação resulta na liberação de produtos solúveis que podem afetar a membrana celular. A integridade da membrana é quebrada e enzimas intracelulares, tais como ALT e AST, são liberadas no plasma ocasionando a morte celular (KAUSHIK et al., 2013; LIU et al., 2013).

2.5.4.3 Aflatoxina

A atividade carcinogênica da AF é estritamente relacionada com indução de aberrações cromossômicas, quebras de filamentos cromossômicos, geração de adutos de DNA, micronúcleos e síntese de DNA descontrolada. Este modelo pode ser utilizado em camundongos e ratos. Camundongos com 7 dias de idade injetados com 6 mg/kg de AF desenvolvem CHC após 52 semanas com incidência de quase 100%. Os modelos experimentais que envolvem a administração de AF são úteis para avaliar os mecanismos envolvidos na hepatocarcinogênese induzida especificamente por esta toxina ou são limitados aos casos em que a carcinogenicidade seja semelhante (De MINICIS et al., 2013). Os dados disponíveis na literatura sobre a AF como modelo de CHC são muito escassos e aqueles existentes são voltados para estudos macromoleculares sobre estresse oxidativo, peroxidação lipídica e danos ao DNA. O aspecto morfológico praticamente não é abordado, talvez porque esta toxina não provoque grandes alterações estruturais.

2.5.4.4 Álcool

Até o momento, não há um modelo experimental que recapitule a progressão completa da doença hepática alcoólica. Os modelos existentes ainda estão sendo aprimorados para tentar minimizar as suas desvantagens. O trabalho de revisão de Mathews et al. (2014) apresenta e discute os modelos de utilização do álcool na indução de lesão hepática:

1. Consumo crônico de etanol: é o modelo experimental mais antigo, baseado na administração de etanol na água de beber. Embora seja um método fácil, a técnica tem várias limitações devidas à rejeição dos animais ao consumo de álcool. A desidratação, o baixo teor alcoólico no sangue e nutrição inadequada são algumas das desvantagens, além de não induzir lesão hepática significativa.
2. Dieta líquida de Lieber-DeCarli: para superar as limitações do etanol oferecido na água, Lieber; DeCarli; Sorrell (1989) desenvolveram o modelo de dieta líquida nutricionalmente competente que permite a administração de concentrações elevadas de álcool. O modelo é considerado apropriado para estudar as fases iniciais da doença alcoólica, no entanto, também reúne inconvenientes, como pequena elevação de ALT sérica, esteatose leve, pouca inflamação e nenhuma fibrose. Além disso, não contorna totalmente a aversão dos animais ao álcool, uma vez que eles consomem menos a dieta líquida com etanol do que a dieta controle.
3. Consumo de etanol intragástrico: Tsukamoto et al. (1985) desenvolveram um modelo de administração enteral que permitiu alcançar altos níveis de álcool no sangue ao mesmo e controlar o volume e os nutrientes fornecidos na dieta líquida. Os animais desenvolvem esteatose, necrose focal, focos inflamatórios e ALT significativamente elevada e ainda podem ser induzidos à fibrose e cirrose (FRENCH; MIYAMOTO; TSUKAMOTO, 1986; TSUKAMOTO et al., 1995). O modelo ainda possibilita modificar vários parâmetros, como a composição nutricional, proporcionando a oportunidade de estudar a influência de diversos fatores. No entanto, a administração intragástrica não foi amplamente utilizada devido à sua dificuldade técnica e a necessidade de cuidados médicos intensivos e equipamentos caros.
4. Segundo *hit* ou múltiplos *hits*: apesar de superar as limitações da ingestão do álcool, o modelo intragástrico não emprega a via oral de exposição nem imita o padrão de consumo humano. Neste contexto, os pesquisadores usaram um modelo de dois *hits* para mimetizar as fases mais avançadas da doença. Este modelo baseia-se na idéia de

que o simples consumo de álcool induz somente esteatose e, assim, um segundo estímulo é necessário para a progressão da doença. Os estímulos utilizados incluem modificações nutricionais, agentes farmacológicos (por exemplo, CCl₄), hormônios, manipulação genética, infecções virais etc. Entretanto, os resultados desse modelo devem ser interpretados com cautela, pois pode ser difícil determinar se os resultados observados são consequência do etanol ou do segundo *hit*.

5. Consumo de etanol crônico + abuso: muitos pacientes com hepatite alcoólica têm uma história de consumo crônico combinado com períodos de consumo excessivo de álcool, um padrão que não é reproduzido por nenhum modelo. Considerando isso, Bertola et al. (2013) desenvolveram um modelo de consumo crônico combinado com abuso que imita os padrões de consumo humano e resulta em níveis elevados de ALT, esteatose e inflamação. Neste modelo, a dieta líquida com etanol é oferecida aos animais após um período de aclimação à dieta líquida controle para evitar rejeição. Depois de adaptados à nova dieta, uma dose única de etanol (5 g/kg de peso corporal) é administrada. O tempo de indução é relativamente curto – cerca de 4 semanas para provocar lesão hepática – mas pode ser estendido por períodos mais longos, até 8 – 12 semanas, aplicando-se dose única ou múltiplas para induzir lesão hepática mais grave.

2.5.4.5 Tioacetamida

A tioacetamida (TAA) é utilizada como um solvente orgânico na indústria do couro, têxtil e de papel, como um acelerador na vulcanização de borracha buna e como estabilizador de combustível para motores (SINGH et al., 2012).

A hepatotoxicidade experimental da TAA foi estudada pela primeira vez em 1948, por causa da sua detecção no suco de laranja após ser usada como fungicida em pomares. A utilização de TAA em roedores como modelo hepatotóxico produz danos ao fígado incluindo necrose/apoptose, fibrose, cirrose e CHC (HAJOVSKY et al., 2012).

O efeito tóxico da TAA requer ativação metabólica, a qual ocorre através de duas oxidações. A primeira gera o TAA-S-óxido (TASO) e a segunda transforma-o em TAA-S-dióxido (TASO₂), um metabólito quimicamente reativo que reage com as proteínas celulares acarretando a citotoxicidade e o comprometimento da função celular (CHILAKAPATI et al., 2005). A TAA em si não é tóxica para o fígado, mas os seus intermediários metabólicos ligam-se covalentemente a macromoléculas hepáticas levando a lesão celular e necrose dos hepatócitos (LIU et al., 2013). Esses compostos são responsáveis pela inativação de enzimas e

de proteínas estruturais. A necrose provocada por eles está relacionada com alterações na concentração citoplasmática do cálcio, o que afeta principalmente mitocôndrias e leva à inibição da respiração celular. A ação da TAA sobre o metabolismo dos ácidos nucleicos é evidenciada por nucléolos aumentados e pela inibição no transporte de RNA do núcleo para o citoplasma (FONTANA et al., 1996). Além disso, a TAA altera o ciclo da uréia, o perfil de aminoácidos circulantes, o metabolismo lipídico e lipoprotéico e a síntese de ácidos graxos (DAVID et al., 2002).

A oxidação de TAA e de TASO pode ser feita pelas enzimas hepáticas citocromo P450 e FAD mono-oxigenase, mas a contribuição relativa de cada uma varia em diferentes condições *in vivo*. Os hepatócitos também reduzem TASO de volta a TAA e estudos sugerem que a TAA seja um potente inibidor da oxidação adicional de TASO em TASO₂. Isto pode explicar porque a toxicidade da TAA é lenta e, portanto, TAA e TASO parecem mostrar saturação toxicocinética *in vivo* (HAJOVSKY et al., 2012).

A TAA pode ser administrada de diferentes formas: oral (na água ou na ração), intubação intragástrica e injeções subcutâneas ou intraperitoneais (FONTANA et al., 1996). O principal efeito carcinogênico da TAA está relacionado com estresse oxidativo que conduz progressivamente danos no DNA e desenvolvimento de CHC (De MINICIS et al., 2013). A administração prolongada de TAA em baixas doses induz a formação de septos fibrosos portal-portal ou portal-central e cirrose. Comparada com CCl₄, a fibrose é mais proeminente na cirrose induzida por TAA e persiste por várias semanas após a interrupção do tratamento (LIU et al., 2013).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Estabelecer o modelo experimental de hepatocarcinogênese no microambiente cirrótico e avaliar as características celulares e moleculares das LPNs desenvolvidas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ▶ Avaliar os efeitos do tratamento com TAA sobre a função hepática, através de testes sorológicos;
- ▶ verificar as características morfológicas e histopatológicas das lesões hepáticas;
- ▶ avaliar os efeitos do tratamento com TAA sobre o índice proliferativo e apoptótico no tecido hepático;
- ▶ caracterizar as LPNs após o tratamento com TAA, por imuno-histoquímica;
- ▶ analisar marcadores diferenciais na transição das LPNs para o CHC, por imuno-histoquímica;
- ▶ verificar a expressão gênica de marcadores diferenciais na transição de LPNs para CHC.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados 80 ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) machos, com 2 meses de idade. Os animais foram mantidos no Biotério de Experimentação do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB/USP). O ambiente era constituído por sala com ventilação, umidade (45 a 60%) e temperatura (24° - 26 °C) controladas. A iluminação artificial proporcionou aos animais um ciclo claro-escuro de 12 horas. As lâmpadas utilizadas foram do tipo fluorescente (1200 lux). Água e comida foram fornecidas aos animais *ad libitum* durante todo o experimento. Os animais permaneceram em gaiolas plásticas (máximo de 5 ratos/caixa) medindo 41 x 34 x 16 cm forradas por maravalha (trocada a cada três dias) e tampadas por grade metálica. As condutas e cuidados experimentais estiveram de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal, adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório e que são semelhantes às normas e regimentos internacionais descritos pelo *Committee on Care and Use of Laboratory Animal Resources, National Research Council*, EUA. Todos os procedimentos experimentais foram previamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do ICB/USP (Protocolo nº100 fls 75 livro 02).

4.2 MODELO EXPERIMENTAL

Os animais foram submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese pela administração crônica de tioacetamida (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, EUA). A substância foi administrada por via intraperitoneal, 3 vezes por semana, na dosagem de 200 mg/kg (solução a 4% diluída em solução de cloreto de sódio 0,9%). Os animais foram pesados antes de cada injeção, para acompanhamento do ganho de peso ao longo da indução de cirrose. A dosagem de TAA foi ajustada semanalmente, de acordo com o peso do animal, de modo que a proporção de hepatotoxina administrada fosse constante durante todo o período experimental. Os animais foram distribuídos em grupos conforme descrito na tabela 1:

Tabela 1 – Delineamento experimental do modelo de hepatocarcinogênese pela TAA

Grupos Experimentais (T)	Período de indução	Grupos Controle (C)	Período de indução
T14 (n = 15)	14 semanas	C14 (n = 10)	14 semanas
T21 (n = 15)	21 semanas	C21 (n = 10)	21 semanas
T35 (n = 20)	35 semanas	C35 (n = 10)	35 semanas

4.3 ABATE

Ao término das injeções, os animais permaneceram uma semana em repouso sendo apenas pesados. Após este período, eles foram abatidos com dose excessiva de anestésico quetamina (100 mg/kg) combinado com o analgésico xilazina (20 mg/kg) (Cristália, Itapira, SP, Brasil) (CLOSE et al., 1996).

4.4 COLHEITA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

Sob anestesia profunda dos animais, foram colhidas amostras de sangue por punção cardíaca, utilizando seringa de 3 mL e agulha 30 x 0,7 mm heparinizadas. As amostras foram centrifugadas a 1209,6 G por 5 min e o plasma foi armazenado em freezer (-80 °C) para as análises posteriores.

Após a morte constatada, as vísceras foram removidas e pesadas, assim como a carcaça. O fígado foi separado, pesado e o seu volume foi obtido mergulhando-o em um béquer com água destilada gelada (para retardar a degradação das proteínas), suspenso por um arame, sobre uma balança analítica (o peso em água deslocada equivale ao volume em centímetros cúbicos). Fragmentos do fígado foram fixados em formol 10%, por 24 h, e em metacarn (60% metanol, 30% clorofórmio e 10% ácido acético), por 12 h, para inclusão em paraplast (EasyPath, São Paulo, SP, Brasil). O restante do fígado foi congelado em nitrogênio líquido e armazenado em freezer -80 °C.

4.5 PARÂMETROS BIOMÉTRICOS

Os parâmetros biométricos considerados foram: peso do animal, peso das vísceras, peso da carcaça, peso do fígado e volume do fígado. Com base nas medidas de peso de cada elemento foram obtidos os índices relativos descritos abaixo.

$$\text{– Índice hepatossomático: } \frac{\text{peso do fígado}}{\text{peso do animal}} \times 100$$

$$\text{– Índice viscerossomático: } \frac{\text{peso das vísceras}}{\text{peso do animal}} \times 100$$

$$\text{– Índice hepatocorporal: } \frac{\text{peso do fígado}}{\text{peso da carcaça}} \times 100$$

4.6 MICROSCOPIA DE LUZ

4.6.1 Colorações

Os cortes histológicos do fígado fixado em metacarn foram desparafinizados em xilol e xilol/álcool (1:1), reidratados em seqüência decrescente de álcool, lavados em água corrente e, então, foram aplicadas as seguintes colorações:

- a) Hematoxilina-Eosina (HE): para análise morfológica e histopatológica do tecido;
- b) Picrossírius: para evidenciação das fibras colágenas e estadiamento de fibrose/cirrose;
- c) Impregnação por prata (reticulina): para observação das fibras reticulares no parênquima hepático.

Após a coloração, esses cortes passaram por desidratação, na seqüência inversa, sendo retirados do xilol e montados em resina sintética Permount® (Fisher Scientific, Waltham, MA EUA).

4.6.2 Avaliação histopatológica

A avaliação histopatológica compreendeu o estadiamento da fibrose hepática, cujos escores variam de 0 a 6 (Quadro 1), e o índice de atividade histológica (IAH) com escores de 0 a 18 (Quadro 2). Ambos os critérios foram estabelecidos por Knodell et al. (1981) e modificados por Ishak et al. (1995).

Alterações estruturais / Fibrose / Cirrose	Escore
Sem fibrose	0
Expansão da fibrose em algumas regiões portais, com ou sem pequenos septos fibrosos	1
Expansão da fibrose em diversas regiões portais, com ou sem pequenos septos fibrosos	2
Expansão da fibrose em diversas regiões portais, com ocasional formação de pontes entre os espaços portais	3
Expansão da fibrose nas regiões portais, com marcante formação de pontes entre os espaços portais e entre a veia porta e a veia terminal hepática	4
Marcante formação de pontes entre os espaços portais e entre a veia porta e a veia terminal hepática, com formação ocasional de nódulos (cirrose incompleta)	5
Cirrose	6

Quadro 1 – Estadiamento das alterações estruturais relacionadas à hepatite crônica (ISHAK et al., 1995).

Hepatite de Interface	Escore
Ausente	0
Suave (focal / poucas regiões portais)	1
Suave a Moderada (focal / diversas regiões portais)	2
Moderada (contínua ao redor de < 50% das regiões portais ou sinusoidais)	3
Severa (contínua ao redor de > 50% das regiões portais ou sinusoidais)	4
Necrose	Escore
Ausente	0
Necrose focal	1
Necrose em Zona 3 (poucas regiões)	2
Necrose em Zona 3 (diversas regiões)	3
Necrose em Zona 3 e ocasionalmente na ponte veia porta - veia terminal hepática	4
Necrose em Zona 3 e múltiplos locais na ponte veia porta - veia terminal hepática	5
Necrose multiacinar	6
Necrose lítica focal / apoptose / inflamação focal*	Escore
Ausente	0
1 foco ou menos por campo (objetiva de 10x)	1
2 a 4 focos por campo (objetiva de 10x)	2
5 a 10 focos por campo (objetiva de 10x)	3
Mais de 10 focos por campo (objetiva de 10x)	4
Inflamação portal	Escore
Ausente	0
Suave (poucas regiões portais)	1
Moderada (diversas regiões portais)	2
Acentuada (todas as regiões portais)	3
Severa (todas as regiões portais com grande quantidade de células inflamatórias)	4

Quadro 2 – Índice de atividade histológica (IAH) relacionado à graduação da hepatite crônica (ISHAK et al., 1995). *Não inclui infiltrado inflamatório sinusoidal difuso.

4.7 ANÁLISE BIOQUÍMICA

Esta análise compreendeu a quantificação de marcadores sanguíneos de função e de lesão hepática detectáveis no plasma. As proteínas avaliadas foram: alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), albumina (ALB), fosfatase alcalina (ALKP), gama-glutamiltanspeptidase (GGT), bilirrubina total (TBIL), proteína total (TP) e globulina (GLOB).

As amostras de plasma foram analisadas pelo analisador bioquímico VetTest® (IDEXX Laboratories, Westbrook, ME, EUA). Os valores médios de ALT, AST, ALKP e GGT são expressos em U/L, enquanto que os valores de ALB, TP e GLOB são expressos em g/dL e os de TBIL em mg/dL.

4.8 ELISA PARA AFP

O teste de ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) foi empregado para a quantificação de AFP no plasma. Foi utilizado o kit para imunoensaio do tipo sanduíche (Cusabio Biotech, Wuhan, Hubei, China). No ensaio, padrões e amostras foram incubados em poços de microtitulação revestidos com anticorpo anti-AFP. Após incubação de 2 h, foi adicionada uma solução contendo anticorpo anti-AFP conjugado com biotina e seguiu-se nova incubação por 1 h. Os poços foram lavados por 3 vezes e, então, tratados com uma solução de detecção contendo avidina conjugada com a enzima peroxidase de rábano (HRP). Após nova incubação de 1 h, procedeu-se a uma sequência de 5 lavagens seguidas por incubação com o substrato tetrametilbenzidina (TMB), 30 min, protegido da luz. Uma solução de parada contendo ácido sulfúrico foi adicionada convertendo a cor azul em amarelo. A densidade óptica foi determinada por medida de absorbância em espectrofotômetro com comprimento de onda de 450 nm. As incubações se deram em estufa a 37 °C.

4.9 CARACTERIZAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA

Para as técnicas de imuno-histoquímica foram utilizados cortes histológicos de 4 µm de espessura, dos fragmentos fixados em formalina, em lâminas silanizadas (Starfrost Knittel, Brunsvique, Baixa Saxônia, Alemanha). Os cortes foram levados à estufa a 60 °C por 10 min, para derreter a camada de paraplast, e em seguida o tecido foi desparafinado em xilol e reidratado em sequência decrescente de álcool até água destilada. Na etapa seguinte, realizou-

se a recuperação do antígeno pelo método de calor úmido em panela pressurizada (Cuisinart®, Cell Marque, Rocklin, CA, EUA) por 15 min. Depois os cortes foram lavados em água corrente, água destilada e em tampão de lavagem Tris (pH 7,4) acrescido de Tween 20. A peroxidase endógena foi bloqueada em solução de peróxido de hidrogênio a 3% em metanol por 20 min. Após as lavagens em tampão, seguiu-se o bloqueio de reações inespecíficas e, posteriormente, a incubação com os respectivos anticorpos primários, conforme indicado na tabela 2, diluídos em solução contendo 1% de BSA em tampão. Os cortes pernoitaram incubados com o anticorpo na geladeira, a 4 °C. O controle negativo de cada reação consistiu na omissão do anticorpo primário. No dia seguinte, foram lavados com tampão e receberam o sistema de visualização por polímero (N-Histofine® Simple Stain™ Rat MAX PO [MULTI] Cod. 414191F, Nichirei, Tóquio, Japão) por 30 min. O polímero foi lavado em tampão e os passos que se seguiram para cada imuno-histoquímica estão descritos a seguir:

a) Imuno-histoquímica dupla para GST-P e Ki-67:

Nesta técnica, o primeiro anticorpo incubado na etapa descrita acima foi o Ki-67. Após a retirada do polímero, os núcleos marcados foram revelados com cromógeno cinza-chumbo (ImmPACT SG, Vector Laboratories Cod. SK-4705, Burlingame, CA, EUA) incubado por 5 min. O tecido foi lavado em água destilada e prosseguiu para a segunda marcação imuno-histoquímica com novo bloqueio de peroxidase e de reações inespecíficas e incubação com o segundo anticorpo primário anti-GST-P, por 1 h, em temperatura ambiente. O mesmo polímero foi aplicado novamente e a segunda revelação foi feita com 3'3'-diaminobenzidina (DAB). O tecido foi, então, desidratado em sequência de álcool e xilol e as lâminas foram montadas com Permount.

b) Imuno-histoquímica para β -catenina, HSP70 e GPC3

Após a retirada do polímero, a reação foi revelada com DAB. Depois, os cortes foram contracolorados com hematoxilina, desidratados em sequência de álcool e xilol e as lâminas foram montadas com Permount.

c) Imuno-histoquímica dupla para GS e GST-P

A primeira marcação imuno-histoquímica foi com o anticorpo anti-GS. Esta reação foi revelada com DAB e, em seguida, iniciou-se a segunda marcação repetindo-se os bloqueios antes da incubação com o anticorpo primário anti-GST-P por 1 h. A revelação do segundo anticorpo foi feita com o cromógeno cinza-chumbo. Depois das lavagens as lâminas foram contracoradas com hematoxilina, desidratadas e montadas.

d) Imuno-histoquímica para GST-P seguida por HE

Após a retirada do polímero, a reação foi revelada com DAB e, em seguida, os cortes foram contracorados com HE. Ao término da coloração, o tecido foi desidratado e as lâminas foram montadas.

Tabela 2 – Anticorpos e métodos utilizados para a marcação imuno-histoquímica

Anticorpo primário	Fornecedores	Tampão para recuperação antigênica	Bloqueio de reações inespecíficas	Titulação
GST-P (311)	MBL, Japão	Solução 3 em 1 (Spring Bioscience)	Comercial - 10 min (Spring Bioscience)	1:1000
Ki-67, clone MIB-5 (M7248)	Dako, Dinamarca	Solução 3 em 1 (Spring Bioscience)	Comercial - 10 min (Spring Bioscience)	1:100
β-catenina (9587)	Cell Signaling, EUA	EDTA 1 mM pH 8,0	Comercial - 20 min (Spring Bioscience)	1:300
HSP70 (SC-1060)	Santa Cruz Biotechnology, EUA	EDTA 1 mM pH 8,0	Leite em pó desnatado 1 h a 37 °C	1:200
GPC3 (251482)	Abbiotec, EUA	Tris-EDTA pH 9,0	Leite em pó desnatado 1 h a 37 °C	1:100
GS (MAB302)	Merck-Millipore, Alemanha	Citrato pH 6,0	Comercial - 20 min (Spring Bioscience)	1:500

4.10 DUPLA MARCAÇÃO DE TUNEL E GST-P

A dupla marcação foi realizada para identificar LPNs, representadas por células GST-P positivas, e células em apoptose, evidenciadas por núcleos positivos ao TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*). Nesta análise, foram avaliados 5 animais controles e 5 animais tratados de cada grupo.

Foram usados cortes histológicos de 4 µm de espessura, fixados em formalina, em lâminas silanizadas. O material foi desparafinado, reidratado e lavado em tampão PBS acrescido de Tween 20 (PBST) por 5 min. O tecido foi permeabilizado com proteinase K (20 µg/mL diluída em Tris 10 mM pH 7,4) por 20 min e lavado em PBST. A peroxidase endógena foi bloqueada com solução contendo 3% de peróxido de hidrogênio em metanol por 30 min. Após as lavagens, foi feito o bloqueio de proteína com solução composta por 3% de BSA e 20% de soro fetal bovino diluídos em PBS, por 1 h. A lâmina utilizada como controle positivo foi incubada com DNase I (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) por 15 min. Em seguida, os cortes foram lavados em PBST e, então, foram impermeabilizados sobre gelo, por 2 min. Logo após, procedeu-se a incubação com a solução de TUNEL (Roche Diagnostics, Basileia, Suíça) por 1 h; a concentração da enzima TdT (*Terminal deoxynucleotidyl Transferase*) aplicada correspondeu a 50% daquela recomendada pelo fabricante para redução do *background*. A lâmina utilizada como controle negativo foi incubada apenas com o tampão de diluição da enzima. O material foi lavado em tampão e incubado com *converter-POD* por 30 min. Após as lavagens, a reação foi revelada com DAB e o material prosseguiu para marcação imuno-histoquímica da GST-P. Todas as incubações foram feitas em estufa a 37 °C.

A recuperação antigênica foi feita com tampão citrato pH 6,0 em panela pressurizada por 15 min. A peroxidase endógena foi bloqueada com solução comercial por 15 min. Posteriormente, o tecido foi lavado e aplicou-se o bloqueador de proteína, também comercial, por 10 min. O excesso do bloqueador foi escorrido e seguiu-se incubação com anticorpo primário anti-GST-P, por 1 h. Nas etapas seguintes, os cortes foram incubados com o polímero por 30 min e a GST-P foi revelada com o cromógeno cinza chumbo. Logo após, as lâminas foram contracoradas com hematoxilina, desidratadas e montadas com Permount. As incubações da reação imuno-histoquímica ocorreram em temperatura ambiente.

4.11 CLASSIFICAÇÃO E MORFOMETRIA DAS LESÕES PRÉ-NEOPLÁSICAS

As LPNs foram identificadas pela imuno-histoquímica para GST-P, como descrito no item 4.10, nas lâminas com dupla marcação para Ki-67. A classificação das LPNs seguiu os critérios adotados por Mazzantini, De Conti e Moreno (2008). As lesões foram classificadas em persistentes (LPNp) ou remodelantes (LPNr), considerando-se a uniformidade da marcação imuno-histoquímica e a regularidade das bordas da lesão: LPNp apresenta marcação uniforme e bordas regulares, ao contrário da LPNr que pode perder uma ou ambas as

características. Para a quantificação foram considerados: o número de lesões por unidade de área (LPN/cm²), a área das lesões (mm²) e a porcentagem da área total ocupada por elas (%). Para tanto, as lâminas foram digitalizadas em escâner digital de lâminas automático (Pannoramic MIDI, 3DHistech, Budapeste, Hungria), utilizando-se objetiva Zeiss Plan-Apocromatic de 20x/NA 0,8. As regiões de interesse foram marcadas e a área de cada uma foi calculada automaticamente pelo *software* PANNORAMIC VIEWER.

4.12 ANÁLISE DA PROLIFERAÇÃO CELULAR

A proliferação celular no tecido hepático foi identificada pela imuno-histoquímica para Ki-67, descrita no item 4.10, este anticorpo se liga a uma proteína nuclear detectada apenas na fase ativa da divisão celular (GERDES et al., 1983). A contagem das células em proliferação foi realizada nas lâminas digitalizadas, nas regiões previamente marcadas no Pannoramic Viewer: área total no fígado controle e LPNp, LPNr e tecido adjacente no fígado cirrótico. Após a identificação de todas as regiões de interesse, as imagens foram analisadas pelo *software* de quantificação HISTOQUANT, um módulo integrante do Pannoramic Viewer. Para a quantificação dos núcleos Ki-67 positivos estabeleceu-se um padrão de separação por cor, em uma determinada área (MISP: *Microscopic Image Segmentation Profile*), que foi aplicado em todas as amostras (Figura 1).

Figura 1 – Identificação dos núcleos Ki-67 positivos para quantificação automática. Esquerda: LPN com células em proliferação marcadas em cinza chumbo. Direita: MISP desenhado sobre a lesão utilizado para identificar (em vermelho) e quantificar as células em proliferação.

4.13 QUANTIFICAÇÃO DA APOPTOSE – TUNEL

As células em apoptose foram marcadas com TUNEL, uma reação enzimática que identifica quebras no DNA. A contagem dos hepatócitos marcados foi realizada em fotomicrografias capturadas com objetiva de 40x ao microscópio de luz (Standard 25 ICS, Zeiss, Oberkochen, Alemanha) com câmara acoplada e *software* de processamento de imagens AXIOVISION. Foram fotografadas áreas de LPNs, persistentes e remodelantes, e de parênquima adjacente, GST-P negativo. Dessa forma, a contagem de células apoptóticas foi realizada dentro e fora das LPNs em um total de 1000 núcleos para cada região. Os resultados são apresentados em porcentagem de núcleos positivos e negativos em relação ao número total de núcleos contados. As células foram contadas com auxílio do *software* de processamento e análise de imagem IMAGE J.

4.14 QUANTIFICAÇÃO DA APOPTOSE – CORPÚSCULOS APOPTÓTICOS

Os corpúsculos apoptóticos foram contados nas lâminas de imuno-histoquímica para GST-P seguida por HE (item 4.10). Estas estruturas foram identificadas segundo suas características morfológicas: retração da célula formando um halo ao seu redor, citoplasma denso e eosinofilia intensa. A contagem dos corpúsculos seguiu a mesma metodologia adotada para as células marcadas por TUNEL, descrita no item anterior.

4.15 ANÁLISE DO PAINEL IMUNO-HISTOQUÍMICO

Para a identificação das proteínas que compõem o painel imuno-histoquímico (GPC3, HSP70 e GS), foram empregados cortes histológicos sequenciais, de modo que a mesma região pudesse ser reproduzida para cada marcação. As lâminas foram analisadas individualmente e quando uma região era reconhecida como positiva para uma proteína, a mesma região era identificada nas demais lâminas para se determinar a coincidência dos marcadores. Para a quantificação da positividade desses marcadores, o *n* amostral foi estabelecido pelo número de cortes analisados em cada grupo.

4.16 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA POR RT-PCR EM TEMPO REAL

4.16.1 Extração do RNA

O RNA foi extraído do fígado previamente congelado em N₂ líquido e armazenado a -80 °C. Foi analisado um n = 5 – 7 animais por grupo. O kit de extração *RNAspin Mini RNA Isolation Kit* (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, Reino Unido), foi utilizado de acordo com as instruções do fabricante. Aproximadamente 30 mg de tecido foram macerados com pistilo em cadinho, previamente autoclavados e limpos com *RNAse away* e, em seguida, transferidos para 350 µL da solução de lise RA1 do kit à qual acrescentou-se 3,5 µL de β-mercaptoetanol. Depois, a mistura foi transferida para colunas de extração, onde o RNA fica retido enquanto é lavado e purificado por uma série de reagentes fornecidos pelo fabricante até a etapa final com a liberação do RNAm. Este foi armazenado em freezer -80 °C até o momento do uso.

4.16.2 Determinação da integridade e quantificação do RNA total

Para a verificação da integridade do RNA, uma alíquota de 10 µl do RNAm extraído foi retirada de cada amostra. A qualidade do RNA foi determinada por eletroforese em gel de agarose a 1,5% diluída em TAE 1X (48,4 g de Tris base; 20 mL de EDTA 0,5 M pH 8,0; 11,4 mL de ácido acético; água deionizada autoclavada q.s.p. 1 L), 80 V, por 1,5 hora. Às amostras de RNA foi acrescentado o corante *Blue Green Loading Dye I* (LGC Biotecnologia, São Paulo, SP, Brasil) para a visualização das bandas ribossômicas 28S e 18S em luz UV, no aparelho ImageQuant (GE Healthcare). A correta identificação dessas bandas indicou a qualidade do RNA, cuja concentração total foi demonstrada em biofotômetro (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) a 260/280 nm. Amostras contendo 1,7 – 2,0 ng/µL indicaram baixa contaminação e foram consideradas adequadas para a transcrição reversa.

4.16.3 Obtenção do DNA complementar (cDNA)

Para eliminar resquícios de DNA, o RNA extraído foi tratado com DNase I (1 µL de DNase para 4 µg/µL de RNA total). Após 15 min em temperatura ambiente, acrescentou-se 1 µL de EDTA (25 mM) para bloquear a ação da enzima aquecendo-se, em seguida, à 65 °C por 10 min em termociclador. As amostras receberam 1 µL de OligoDT e 1 µL de dNTPs (mix 10

mM – 2,5 mM de cada dNTP) e foram incubadas à 65 °C por 5 min. Posteriormente, no gelo, as amostras receberam 4 µL de tampão Superscript II 5X, 2 µL de DTT 1 M e 1 µL de RNase OUT, seguindo-se nova incubação de 2 min à 42 °C. Depois, adicionou-se 1 µL da enzima de transcrição reversa Superscript II e as amostras foram incubadas à 42 °C por 50 min. Após nova incubação, a 70 °C por 15 min, as amostras foram resfriadas em gelo e 1 µL da enzima RNase H foi adicionado para eliminar resíduos de RNA da amostra de cDNA. Todos os reagentes foram fornecidos pela Invitrogen Life Technologies.

4.16.4 Quantificação da expressão gênica por PCR em tempo real

Para a avaliação da expressão gênica foram colocados 5 µL de cada produto da PCR (cerca de 10 ng do RNA total), tampão A TaqMan 1X, MgCl₂ 5,5 mM, 200 µM de dATP, dCTP e dGTP, 400 µM dUTP, 200 nM dos *primers* (senso e anti-senso), 10 nM das *probes* TaqMan, 0,01 U/mL de *AmpErase* e 0,025 U/µL da DNA polimerase *AmpliTaq Gold*, no volume total de 50 µL, em tubos *Optical Tubes* (Applied Biosystem, Life Technologies) apropriados. Todas as reações foram corridas em duplicata e realizadas em termociclador Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System. As condições de amplificação utilizadas foram: 2 min a 50°C, 10 min a 95°C seguidos de 40 ciclos a 95 °C por 15 segundos, para desnaturação da fita de cDNA, e 1 min a 60°C, para sua extensão. Foram utilizados o TaqMan® Universal Master Mix e os *assays* listados no quadro 3. O gene da β-actina foi empregado como controle endógeno por estar presente no citoesqueleto das células hepáticas independentemente dos tratamentos. A interpretação dos resultados seguiu o método comparativo no qual a expressão relativa dos genes corresponde a $2^{-\Delta\Delta CT}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

Gene	Assay (ID)
β-actina	Rn00667869_m1
GPC3	Rn00516722_m1
Survivina	Rn00574012_m1
LYVE1	Rn01510421_m1

Quadro 3 – *Assays* utilizados para análise da expressão gênica dos marcadores tumorais por RT-PCR em tempo real.

4.17 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística dos dados experimentais foi inicialmente aplicado o teste de Bartlet (JOHNSON; LEONE, 1997) para verificar se apresentavam ou não uma distribuição normal, ou seja, determinar se os dados eram paramétricos ou não paramétricos. Para os dados paramétricos foi empregado teste *t* de Student ou ANOVA seguida do teste de Tukey-Kramer, para as comparações múltiplas entre os grupos. Nos casos de dados não paramétricos, utilizou-se o teste *U* de Mann-Whitney ou a análise de variância não paramétrica de Kruskal-Wallis seguida do teste de Dunn. Os dados de marcação do painel imuno-histoquímico foram analisados pelo Teste Qui-Quadrado (χ^2). Estes foram expressos em porcentagem absoluta, enquanto que o restante foi representado por média e desvio padrão. O nível de significância adotado foi de 5%, isto é, $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo entre os grupos.

5 RESULTADOS

5.1 GANHO DE PESO

As curvas do ganho de peso comportaram-se de forma semelhante entre os grupos controle e entre os grupos experimentais. Os grupos tratados com TAA mostraram ganho de peso inferior ao seu grupo controle ao longo do período experimental com uma nítida separação das curvas de ganho de peso por volta da 5ª semana (Figura 2).

Todos os grupos que desenvolveram cirrose tiveram um discreto aumento de peso no final do experimento, no período correspondente ao repouso dos animais (uma semana após o término das injeções).

Figura 2 – Ganho de peso dos animais durante o experimento.

T14: 14 semanas de TAA; C14: controle; T21: 21 semanas de TAA; C21: controle; T35: 35 semanas de TAA; C35: controle.

5.2 MORTALIDADE

Durante o período de experimentação nenhuma morte foi registrada entre os grupos controle, conforme esperado. Entre os animais tratados com TAA houve morte de 4 animais no grupo T14 (26,66%), 2 animais no grupo T21 (13,33%) e 4 animais no grupo T35 (20%) (Figura 3). Todas as mortes foram precedidas de acentuada perda de peso, de forma brusca (8 – 29 1 hg em um período de 2 dias) ou gradual (31 – 66 g em um período de 4 – 11 dias).

Figura 3 – Curva de sobrevivência dos grupos experimentais.

T14: 14 semanas de TAA; T21: 21 semanas de TAA; T35: 35 semanas de TAA

5.3 PARÂMETROS BIOMÉTRICOS

Os parâmetros biométricos considerados relevantes para a análise patológica foram as medidas de massa (do corpo do animal, da carcaça, das vísceras e do fígado) e volume (do fígado). A partir dos valores mensurados, os índices relativos foram calculados.

Conforme foi demonstrado no item 5.1, os animais tratados com TAA tiveram peso menor do que os grupos controle, o que já era esperado, porém esta diferença tornou-se significativa nos grupos de 21 e 35 semanas. O peso corporal dos animais tratados foi similar entre os grupos, apesar dos diferentes períodos de indução adotados. Já entre os grupos controle, o peso de C14 foi significativamente menor do que C35 ($p < 0,01$) mostrando a influência do tempo de vida nesses animais (Figura 4A). As mesmas diferenças observadas para o peso corporal foram identificadas analisando-se o peso da carcaça. Entretanto, neste parâmetro acrescenta-se o peso menor da carcaça também em 14 semanas entre os grupos controle e tratado (Figura 4B).

O peso das vísceras foi mais elevado em todos os grupos tratados com TAA comparados aos controles. Entre estes últimos, C35 apresentou medidas significativamente maiores, o que é esperado visto que estes animais foram mantidos por um período mais longo. Dos grupos tratados, o T14 exibiu menor peso das vísceras demonstrando que 14 semanas de injeção de TAA não provocaram alterações suficientes para equipar esse parâmetro aos outros grupos (Figura 4C).

Foi observado um acentuado aumento da massa hepática nos grupos tratados quando comparados aos controles. Nos animais sadios, mesmo nos mais velhos, não houve diferença no peso do órgão. Todavia, os fígados cirróticos aumentaram gradativa e significativamente ao longo do experimento indicando que a continuidade da injúria tóxica promove e amplifica

os eventos que compõem o peso do fígado (Figura 4D). As medidas de volume do fígado seguiram o mesmo padrão verificado para o peso, o qual também se repetiu para os índices relativos baseados no peso do fígado (Figura 4E, F e G). Por fim, o índice viscerossomático foi maior nos grupos tratados e destes, o grupo T14 apresentou índice significativamente menor do que os outros 2 grupos, já que foi tratado por um período mais curto (Figura 4H).

Há que se destacar os valores referentes ao peso do fígado, uma vez que foi base para o cálculo dos índices relativos, além de contribuir para o peso das vísceras.

Figura 4 – Parâmetros biométricos e índices relativos à massa hepática, corporal e visceral dos grupos ($p < 0,05$). (*) representa diferença estatística Controle x TAA.

5.4 AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA

Os animais tratados com TAA desenvolveram cirrose hepática. Em todos os fígados foi possível observar o desenvolvimento de nódulos regenerativos de diversos tamanhos (até 10 mm de diâmetro) caracterizando a cirrose do tipo mista. Os fígados cirróticos apresentaram tamanho aumentado, consistência firme e coloração empalidecida em comparação com os órgãos hígidos (Figura 5A).

No grupo T14 os nódulos regenerativos eram esparsos, separados por áreas de superfície regular. Neste grupo o desenvolvimento da cirrose foi heterogêneo com alguns fígados exibindo poucos nódulos. A superfície era relativamente lisa, apesar da textura granular, apresentando manchas esbranquiçadas circulares que não chegavam a formar protuberâncias. Em outras amostras, houve a formação de nódulos grandes e pequenos distribuídos pela superfície do órgão (Figura 5B).

No grupo T21 a cirrose desenvolveu-se homogeneamente entre os animais. Os fígados converteram-se inteiramente em nódulos regenerativos. Pequenas manchas de sangue foram observadas nesses nódulos e, nos maiores, foi possível distinguir estruturas semelhantes a vasos sanguíneos que convergiam da base para o centro do nódulo, indicando o desenvolvimento de telangiectasia (Figura 5C). A presença de ascite foi registrada em 3 animais, correspondendo a uma ocorrência de 20%; a quantidade de líquido da cavidade abdominal não excedeu 200 μ L.

No grupo T35 o desenvolvimento da cirrose também foi homogêneo. Notou-se a predominância de nódulos regenerativos grandes (≥ 5 mm) bem como a maior ocorrência das estruturas vasculares examinadas no T21. Todavia, não se verificou nenhum padrão de organização desses vasos, mas apenas que eram mais proeminentes do que aqueles observados anteriormente (Figura 5D). Neste grupo, um animal apresentou necrose de metade do lobo hepático esquerdo, onde foi observada uma grande massa tumoral (1,5 cm) branca e sólida, cujo centro possuía coloração castanha (Figura 5E).

Figura 5 – Fotografia apresentando aspectos macroscópicos do fígado. (A) Grupo controle. (B) Grupo T14: superfície relativamente regular com nódulos pequenos e esparsos. (C) Grupo T21: intensa nodulação. (D) e (E) Grupo T35: nódulos regenerativos de diferentes tamanhos cobrem toda a superfície. *Seta preta*: nódulo regenerativo; *seta azul*: vaso sanguíneo; *cabeça de seta*: manchas de sangue; *seta branca*: massa tumoral em região necrosada do lobo hepático. Barras de escala: 1,5 cm.

5.5 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

5.5.1 Análise quantitativa

Inicialmente, foi realizada a análise das alterações teciduais concernentes a modificações estruturais procedendo-se, então, ao estadiamento da fibrose, conforme consta no quadro 1 (item 4.6.2). Nesta avaliação, todos os animais tratados com TAA atingiram o escore máximo de 6, caracterizando o estágio de cirrose hepática, enquanto que os grupos tratados com solução salina obtiveram escore 0.

A análise histopatológica do fígado seguiu os critérios descritos no quadro 2 (item 4.6.2), referentes à graduação da hepatite crônica, cujos escores variam de 0 a 18. O IAH, que permite avaliar a atividade necroinflamatória no tecido hepático, foi maior nos animais cirróticos comparativamente aos controles ($p < 0,0001$). Entre os grupos tratados com TAA foi observado maior IAH no T35 ($9,9 \pm 2,1$) do que em T14 ($7,1 \pm 1,1$) e T21 ($8,0 \pm 2,0$), sendo a diferença significativa em relação ao primeiro (Figura 6).

Figura 6 – Índice de atividade histológica (IAH) dos grupos controle e grupos tratados com TAA ($p < 0,05$). (*) representa diferença estatística Controle x TAA.

A análise individual dos itens avaliados no IAH mostrou que os escores atribuídos ao T35 foram superiores aos outros grupos em todas as variáveis, embora apenas necrose e inflamação focal tenham sido significativas ($p < 0,05$). A avaliação dos animais controle também apresentou um pequeno grau de inflamação focal, mas sem diferença estatística demonstrando que o tempo de indução não foi um fator importante para o estabelecimento das lesões avaliadas (Tabela 3).

Tabela 3 – Parâmetros avaliados para análise do índice de atividade histológica (IAH) segundo critérios estabelecidos por Ishak et al. (1995)

	Hepatite de interface	Necrose	Inflamação focal	Inflamação portal
C14 (n=10)	0	0	0,6 ± 0,5	0
C21 (n=10)	0	0	0,7 ± 0,5	0
C35 (n=10)	0	0	0,9 ± 0,3	0
T14 (n=11)	2,4 ± 0,7	1*	1,3 ± 0,5*	2,5 ± 0,7
T21 (n=13)	2,9 ± 0,9	1,2 ± 0,7	1,5 ± 0,7*	2,4 ± 0,5
T35 (n=16)	2,7 ± 0,9	1,8 ± 1,2	2,5 ± 0,9	3 ± 0,7

(*) comparado com o grupo T35, $p < 0,05$.

5.5.2 Análise qualitativa

Conforme citado anteriormente, o estadiamento considera as alterações estruturais e o grau de fibrose do tecido hepático. Para esta avaliação foram utilizadas lâminas coradas por Picrossírius para evidenciar fibras colágenas, as quais refletem o nível de cicatrização tecidual. No fígado dos animais controle as fibras colágenas foram observadas compondo estruturas vasculares: tríade portal (artéria, veia e ducto biliar) e veia centrolobular (Figura 7A). Essas fibras também foram encontradas permeando o parênquima hepático, adjacentes aos sinusóides, compondo o arcabouço de sustentação do tecido (Figura 7E). Já os animais cirróticos apresentaram deposição exacerbada de colágeno no fígado, com pronunciada fibrose portal. A expansão da fibrose portal resultou na formação de septos fibrosos, isolando grupos de hepatócitos em nódulos e culminando no desenvolvimento de cirrose. Entretanto, a cirrose desenvolvida foi distinta entre os grupos estudados. No grupo T14, os nódulos regenerativos foram delimitados por septos fibrosos delgados e irregulares com grande frequência de nódulos incompletos. A arquitetura hepática foi parcialmente preservada sendo possível distinguir espaços porta e veias centrolobulares no interior dos nódulos (Figura 7B). No grupo T21, foram observados septos espessos circunscrevendo nódulos regenerativos completos e formando largas pontes entre espaços porta ampliados pela fibrose. O padrão lobular da arquitetura hepática foi completamente desorganizado (Figura 7C). A cirrose do grupo T35 desenvolveu-se à semelhança do T21, com desorganização estrutural, septos fibrosos espessos com formação de pontes largas e nódulos regenerativos completos. Contudo, nesse grupo, a deposição de colágeno parece ter sido mais intensa formando septos mais densos e de bordas irregulares (Figura 7D). Uma característica comum aos três grupos foi a redução das fibras colágenas de sustentação no parênquima do nódulo (Figura 7F).

Figura 7 – Fotomicrografias do tecido hepático: deposição de colágeno. **(A)** Grupo controle: espaços porta (*seta superior*) dispostos ao redor de uma veia central (*seta inferior*). **(B)** Grupo T14: espaços porta (*setas estreitas*) em nódulos regenerativos (N) circundados por septos fibrosos (*seta larga*); fibrose portal (*asterisco*). **(C)** Grupo T21: nódulos delimitados por septos (*seta*); fibrose portal formando pontes (*asterisco*). **(D)** Grupo T35: fibrose em ponte (*seta*) com expressiva deposição de colágeno. **(E)** Parênquima hepático normal: fibras colágenas adjacentes aos sinusóides (*setas*); à direita, há um espaço porta. **(F)** Ausência de fibras colágenas no parênquima do nódulo; no centro observa-se um septo fibroso. Coloração: Picrosírius. Barras de escala: A – D: 300 µm; E e F: 50 µm.

O IAH foi determinado em lâminas coradas por HE. O padrão normal do fígado hígido foi semelhante entre os grupos controle não havendo alterações estruturais no tocante à idade. O parênquima hepático apresentou a estrutura típica de organização em lóbulos no qual espaços porta se dispõem em torno de uma veia central (Figura 8).

Figura 8 – Fotomicrografias do tecido hepático: arquitetura do fígado normal. (A) Formato aproximado de um conjunto de lóbulos hepáticos. (B) Tríade portal: ramo da veia porta (*asterisco*), ramo da artéria hepática (*seta larga*) e ducto biliar (*seta estreita*). Coloração HE. Barras de escala: A (300 μ m) e B (200 μ m).

As figuras seguintes ilustram as lesões usadas como critérios de avaliação do IAH.

A hepatite de interface, também chamada de necrose em saca bocado, foi caracterizada pela invasão do parênquima por células inflamatórias que partiam do espaço porta, ou mesmo dos próprios septos, e se projetavam pelo tecido individualizando e encarcerando hepatócitos. Estes hepatócitos aprisionados mostravam tamanho aumentado, núcleo grande e claro e citoplasma mais denso do que as células contíguas não afetadas (Figuras 9A e 9B).

A inflamação portal foi classificada pela presença e pela intensidade de células inflamatórias, predominantemente linfócitos, presentes nos tratos portais expandidos pela fibrose (Figuras 9C e 9D). Os fígados cirróticos também apresentaram áreas de necrose, por vezes extensas, com grande quantidade de líquido e células em degeneração (Figuras 9E e 9F).

Figura 9 – Fotomicrografias do tecido hepático: alterações do fígado cirrótico. (A) Hepatite de interface em fase inicial. (B) Hepatite de interface em estágio avançado. (C) Fibrose portal e septos com grande quantidade de células. (D) Septo fibroso com grande quantidade de células inflamatórias difusas e um infiltrado inflamatório focal (*seta*). (E) Necrose do tecido hepático. (F) Área de necrose (à direita) mostrando a interface com o parênquima íntegro. Coloração HE. Barras de escala: A, B e F (100 μ m); C (300 μ m); D e E (200 μ m).

A última lesão abrangida pelo IAH foi o infiltrado inflamatório focal (Figura 10A).

Este infiltrado, do tipo mononuclear, composto proeminentemente de linfócitos, foi observado tanto no parênquima quanto nos septos fibrosos, embora com menor frequência nestes últimos (Figura 10B). Infiltrados inflamatórios polimorfonucleares também foram registrados e consistiram, predominantemente, de neutrófilos (Figura 10C).

Outras alterações teciduais relevantes ainda foram observadas no exame histopatológico do fígado.

A esteatose foi uma alteração recorrente, principalmente no grupo T35. Hepatócitos com acúmulo de gordura apareceram, na maior parte das vezes, localizados junto com o infiltrado inflamatório focal (Figura 10 D e 10E).

A proliferação de células ovais também foi em evento marcante. Uma grande quantidade delas foi observada ao longo dos septos fibrosos e nos tratos portais, dividindo o espaço com células inflamatórias (Figura 10F). Elas também estavam presentes em regiões de proliferação de ductos biliares.

Figura 10 – Fotomicrografias do tecido hepático: alterações do fígado cirrótico. (A) Infiltrado inflamatório focal (*setas*). (B) Infiltrado inflamatório mononuclear (linfocitário). (C) Infiltrado inflamatório polimorfonuclear com predomínio de neutrófilos (*setas*). (D) Área com esteatose no centro da imagem e infiltrado inflamatório focal (*seta*) no canto superior direito. (E) Hepatócitos contendo gotículas de gordura no citoplasma. (F) Células ovais (*setas*). Coloração HE. Barras de escala: A e D (200 µm); B, C e F (30 µm); E (100 µm).

Além da esteatose, os animais tratados com TAA também apresentaram balonização de hepatócitos (Figuras 11A e 11B) e corpúsculos apoptóticos foram frequentemente observados pelo parênquima (Figura 11C).

Em todos os grupos que desenvolveram cirrose foi notável a proliferação de ductos biliares (Figura 11D). No entanto, somente T21 e, marcadamente, T35 apresentaram proliferação de ductos com luz dilatada (Figura 11E).

O fígado cirrótico também apresentou formações pseudoglandulares (rosetas), típicas de lesões neoplásicas iniciais (Figura 11F).

Figura 11 – Fotomicrografias do tecido hepático: alterações do fígado cirrótico. (A) Grupo de hepatócitos com esteatose (*seta*) ao lado de uma área de hepatócitos balonizados (*cabeças de seta*). (B) Área de hepatócitos balonizados (*setas*) em maior aumento. (C) Corpúsculo apoptótico (*seta*). (D) Proliferação de ductos biliares. (E) Proliferação de ductos biliares com dilatação da luz. (F) Pseudoglandulas ou rosetas (*setas*). Coloração HE. Barras de escala: A e F (100 μ m); B e C (50 μ m); D e E (200 μ m).

A técnica de impregnação por prata foi empregada para se observar a distribuição das fibras reticulares no parênquima hepático.

Notou-se que as fibras reticulares seguiram o mesmo padrão de distribuição descrito anteriormente para as fibras colágenas. Nos fígados saudáveis, essas fibras participavam da constituição de estruturas vasculares, como os espaços porta e as veias centrolobulares (Figura 12A), e também foram encontradas adjacentes aos sinusóides, permeando o parênquima hepático formando uma rede (Figura 12B). Porém, no fígado cirrótico as fibras reticulares acumularam-se nos septos fibrosos e nas regiões portais, junto com as fibras colágenas (Figura 12C), ao mesmo tempo em que foi observada redução dessas fibras no parênquima dos nódulos regenerativos (Figura 12D).

Figura 12 – Fotomicrografias do tecido hepático: distribuição das fibras reticulares no fígado. **(A)** Fibras reticulares (coradas em negro) no fígado sadio. **(B)** Fígado sadio exibindo a rede de fibras reticulares do parênquima hepático. **(C)** Fígado cirrótico: fibras reticulares presentes nos septos fibrosos. **(D)** Parênquima de fígado cirrótico: as fibras se tornaram escassas. **(E)** Fígado de porco utilizado como controle positivo da reação. Coloração: impregnação por prata (reticulina). Barras de escala: 20 µm.

5.6 ANÁLISE BIOQUÍMICA

Os marcadores sanguíneos de função e lesão hepática foram analisados comparando-se os grupos experimentais com os respectivos controles. Posteriormente, foram comparados os grupos controle entre si, para avaliar os marcadores em relação à idade do animal, e os grupos experimentais entre si, para avaliar os efeitos do tempo de tratamento com TAA.

O tratamento com TAA por 14 semanas produziu aumentos significativos nos níveis plasmáticos de ALT, AST e ALKP demonstrando a ocorrência de lesão celular. GGT, que não foi detectável no grupo controle, também apresentou nível elevado no grupo tratado apontando que o sistema biliar também foi afetado (Tabela 4).

Tabela 4 – Níveis plasmáticos dos marcadores sanguíneos de função e lesão hepática em 14 semanas de tratamento

	C14 (n=9)	T14 (n=11)
ALT	45,11 ± 12	90,55 ± 21,11*
AST	96,89 ± 24,96	141,09 ± 33,87*
ALB	2,79 ± 0,27	2,69 ± 0,66
ALKP	161,56 ± 40,41	260,27 ± 68,73*
GGT	0 ± 0	13,82 ± 8,11
TBIL	0,17 ± 0,11	0,14 ± 0,08
TP	7,02 ± 0,39	6,67 ± 0,401
GLOB	4,23 ± 0,34	3,98 ± 0,5

(*) diferente do grupo controle, $p < 0,01$.

ALT: alanina aminotransferase (U/L); AST: aspartato aminotransferase (U/L); ALB: albumina (g/dL); ALKP: fosfatase alcalina (U/L); GGT: gama-glutamyltranspeptidase (U/L); TBIL: bilirrubina total (mg/dL); TP: proteína total (g/dL); GLOB: globulina (g/dL).

A maioria dos marcadores avaliados aumentou após 21 semanas de injeção de TAA. Os valores encontrados indicaram aumento significativo dos marcadores de lesão hepática, embora a ALB, um marcador de função, também tenha elevado seu nível plasmático em relação ao controle. Os níveis de GGT foram bastante elevados no grupo cirrótico (Tabela 5).

Tabela 5 – Níveis plasmáticos dos marcadores sanguíneos de função e lesão hepática em 21 semanas de tratamento

	C21 (n=9)	T21 (n=11)
ALT	48 ± 13,36	97,18 ± 21,19*
AST	104,11 ± 33,60	140,73 ± 33,03*
ALB	2,84 ± 0,23	3,12 ± 0,24*
ALKP	150,67 ± 43,50	296,64 ± 46,17*
GGT	0 ± 0	48,91 ± 14,56
TBIL	0,17 ± 0,10	0,22 ± 0,11
TP	7,43 ± 0,56	7,03 ± 0,41
GLOB	4,60 ± 0,61	3,91 ± 0,33*

(*) estatisticamente diferente do grupo controle, $p < 0,05$.

ALT: alanina aminotransferase (U/L); AST: aspartato aminotransferase (U/L); ALB: albumina (g/dL); ALKP: fosfatase alcalina (U/L); GGT: gama-glutamyltranspeptidase (U/L); TBIL: bilirrubina total (mg/dL); TP: proteína total (g/dL); GLOB: globulina (g/dL).

No grupo T35 os níveis de ALT, AST, ALKP e GGT, indicativos de injúria celular, estavam significativamente maiores do que o controle. Já a GLOB apresentou menor nível plasmático nos animais tratados com TAA (Tabela 6).

Tabela 6 – Níveis plasmáticos dos marcadores sanguíneos de função e lesão hepática em 35 semanas de tratamento

	C35 (n=10)	T35 (n=15)
ALT	45,8 ± 9,73	112,6 ± 45,55*
AST	87,7 ± 14,24	136,13 ± 46,83*
ALB	3,03 ± 0,39	3,19 ± 0,29
ALKP	155,5 ± 82,51	281,13 ± 34,08*
GGT	0,1 ± 0,32	61,47 ± 22,19*
TBIL	0,15 ± 0,13	0,26 ± 0,21
TP	7,72 ± 0,42	7,41 ± 0,44
GLOB	4,7 ± 0,52	4,23 ± 0,4*

(*) estatisticamente diferente do grupo controle, $p < 0,01$.

ALT: alanina aminotransferase (U/L); AST: aspartato aminotransferase (U/L); ALB: albumina (g/dL); ALKP: fosfatase alcalina (U/L); GGT: gama-glutamyltranspeptidase (U/L); TBIL: bilirrubina total (mg/dL); TP: proteína total (g/dL); GLOB: globulina (g/dL).

Na comparação entre os grupos controle, a única diferença estatística encontrada foi no valor de TP do grupo C35. Passadas 35 semanas houve um aumento em relação ao grupo manipulado por 14 semanas (Tabela 7).

Tabela 7 – Níveis plasmáticos dos marcadores sanguíneos de função e lesão hepática nos grupos controle

	C14 (n=9)	C21 (n=9)	C35 (n=10)
ALT	45,11 ± 12	48 ± 13,36	45,8 ± 9,73
AST	96,89 ± 24,96	104,11 ± 33,60	87,7 ± 14,24
ALB	2,79 ± 0,27	2,84 ± 0,23	3,03 ± 0,39
ALKP	161,56 ± 40,41	150,67 ± 43,50	155,5 ± 82,51
GGT	0 ± 0	0 ± 0	0,1 ± 0,32
TBIL	0,17 ± 0,11	0,17 ± 0,1	0,15 ± 0,13
TP	7,02 ± 0,39	7,43 ± 0,56	7,72 ± 0,42*
GLOB	4,23 ± 0,34	4,60 ± 0,61	4,7 ± 0,52

(*) estatisticamente diferente do grupo C14, $p < 0,01$.

ALT: alanina aminotransferase (U/L); AST: aspartato aminotransferase (U/L); ALB: albumina (g/dL); ALKP: fosfatase alcalina (U/L); GGT: gama-glutamiltanspeptidase (U/L); TBIL: bilirrubina total (mg/dL); TP: proteína total (g/dL); GLOB: globulina (g/dL)

Entre os grupos submetidos à hepatocarcinogênese foi observada diferença estatística apenas nas comparações com o grupo T14. Os grupos T21 e T35 expressaram elevados níveis de GGT. Os marcadores de função hepática ALB e TP foram maiores no T35 (Tabela 8).

Tabela 8 – Níveis plasmáticos dos marcadores sanguíneos de função e lesão hepática nos grupos tratados com TAA

	T14 (n=11)	T21 (n=11)	T35 (n=15)
ALT	90,55 ± 21,11	97,18 ± 21,19	112,6 ± 45,55
AST	141,09 ± 33,87	140,73 ± 33,03	136,13 ± 46,83
ALB	2,69 ± 0,66	3,12 ± 0,24	3,19 ± 0,29*
ALKP	260,27 ± 68,73	296,64 ± 46,17	281,13 ± 34,08
GGT	13,82 ± 8,11	48,91 ± 14,56*	61,47 ± 22,19*
TBIL	0,14 ± 0,08	0,22 ± 0,11	0,26 ± 0,21
TP	6,67 ± 0,401	7,03 ± 0,41	7,41 ± 0,44*
GLOB	3,98 ± 0,5	3,91 ± 0,33	4,23 ± 0,4

(*) estatisticamente diferente do grupo T14, p<0,05.

ALT: alanina aminotransferase (U/L); AST: aspartato aminotransferase (U/L); ALB: albumina (g/dL); ALKP: fosfatase alcalina (U/L); GGT: gama-glutamyltranspeptidase (U/L); TBIL: bilirrubina total (mg/dL); TP: proteína total (g/dL); GLOB: globulina (g/dL)

5.7 MORFOMETRIA DAS LESÕES PRÉ-NEOPLÁSICAS

As lesões pré-neoplásicas (LPNs) foram classificadas em persistentes (LPNp) e remodelantes (LPNr) segundo a uniformidade da marcação pela GST-P e a regularidade das bordas da lesão. Neste trabalho, o critério que considera a regularidade da borda foi pouco aplicável uma vez que, no fígado cirrótico, as bordas são quase sempre regulares, pois estão delimitadas por septos fibrosos configurando nódulos. Dessa forma, a uniformidade da marcação foi a principal característica observada para a classificação dessas lesões (Figura 13).

Figura 13 – Lesões pré-neoplásicas no fígado cirrótico. **(A)** Lesão persistente. **(B)** Lesão remodelante. Imuno-histoquímica dupla para GST-P (citoplasmática) e Ki-67 (nuclear). Barras de escala: A (100 μ m) e B (200 μ m).

Os fígados cirróticos exibiram muitas áreas GST-P positivas. Estas LPNs formavam focos, compostos por 10-20 hepatócitos, ou constituíam-se em nódulos de vários tamanhos. Nódulos maiores chegaram a atingir 7,5 mm de diâmetro, porém não mostraram nenhuma característica marcante. Foram observadas LPNs tanto persistentes quanto remodelantes de grandes tamanhos, sendo a maioria composta por lesões persistentes. Estas últimas corresponderam a até 74% da área total no grupo T35, enquanto que no grupo T21 ocuparam 46% e no grupo T14 apenas 18%, aproximadamente (Tabela 9).

Tabela 9 – Porcentagem da área total do tecido hepático ocupada por lesões pré-neoplásicas persistentes (LPNp) e remodelantes (LPNr)

%	T14 (n=11)	T21 (n=13)	T35 (n=15)
LPNp	18,45 $\pm$ 11,92	46,74 $\pm$ 10,24*	74,64 $\pm$ 10,59* [#]
LPNr	1,02 $\pm$ 1,09	1,90 $\pm$ 1,67	3,53 $\pm$ 6,09
LPNp + LPNr	19,48 $\pm$ 11,69	48,64 $\pm$ 9,49*	78,16 $\pm$ 9,80* [#]

(*) estatisticamente diferente do grupo T14; ([#]) estatisticamente diferente do grupo T21, $p < 0,001$.

Em todos os grupos a quantidade de LPNp foi significativamente maior do que de LPNr ($p < 0,05$). A contagem das lesões em relação à área de tecido analisado revelou que o grupo T21 apresentou o maior número de lesões por cm^2 sendo estatisticamente diferente dos outros 2 grupos na soma total das LPNs (Figura 14).

Figura 14 – Número de lesões pré-neoplásicas (LPNs) no fígado cirrótico ($p < 0,05$).

Em relação à área dessas lesões, observou-se que o seu tamanho foi proporcional ao período de tratamento, levando ao aparecimento de lesões maiores no grupo T35. Apenas as LPNp mostraram diferença estatística entre os grupos (Figura 15).

Figura 15 – Área das lesões pré-neoplásicas (LPNs) no fígado cirrótico ($p < 0,05$).

5.8 PROLIFERAÇÃO CELULAR

As células hepáticas em proliferação foram marcadas por reação imuno-histoquímica com Ki-67. A quantificação total revelou acentuada proliferação no fígado cirrótico comparando-se os grupos tratados com TAA com seus controles ($p < 0,0001$), confirmando a eficácia da TAA como estímulo regenerativo (Figura 16A e 16B). Entre os grupos controle não houve diferença estatística no número de núcleos Ki-67 positivos. Entretanto, entre os grupos tratados, a proliferação celular do T14 foi significativamente maior do que do T35 ($p < 0,05$) (Tabela 10).

Tabela 10 – Proliferação celular total no fígado: contagem de células Ki-67 positivas (núcleos/mm²)

C14 (n=10)	7,09 ± 4,41	T14 (n=11)	507,23 ± 114,28*#
C21 (n=9)	7,10 ± 4,98	T21 (n=13)	451,79 ± 151,55*
C35 (n=10)	8,22 ± 4,55	T35 (n=14)	349,85 ± 107,93*

(*) estatisticamente diferente do grupo controle, p<0,0001.

(#) diferente do grupo T35, p<0,05.

Figura 16 – Fotomicrografias do tecido hepático: imuno-histoquímica de dupla marcação para LPNs (anti-GST-P: citoplasmática) e proliferação celular (anti-Ki-67: nuclear). (A) Fígado sadio. (B) Fígado cirrótico: parênquima de LPN. (C) Fígado cirrótico evidenciando LPN, ao centro, e o tecido adjacente GST-P negativo. (D) Diferente padrão de positividade à GST-P das lesões persistentes (LPNp) e remodelantes (LPNr). Barras de escala: A e C: 200 µm; B: 100 µm; D: 500 µm.

A proliferação celular também foi analisada separadamente nas LPNs e no tecido adjacente (Figura 16C). O tecido adjacente apresentou maior número de células positivas para Ki-67 do que as LPNs ($p < 0,0002$), denotando alta atividade proliferativa (Figura 17).

Figura 17 – Proliferação celular nas lesões pré-neoplásicas (LPN) e no tecido adjacente no fígado cirrótico ($p < 0,0002$).

Quando as LPNs foram separadas em persistentes e remodelantes (Figura 16D), notou-se que no T14 a proliferação foi similar entre as LPNr e o tecido adjacente ($p > 0,05$), sugerindo que eventos semelhantes podem ocorrer em ambas as regiões.

A taxa de proliferação celular analisada apenas entre LPNp e LPNr mostrou que, apesar da proliferação ter sido maior nas LPNr, apenas no grupo T21 essa diferença foi significativa ($293,7 \pm 92,7$ x $423,5 \pm 165,8$ $p < 0,05$). Não foi observada diferença estatística ao comparar-se a proliferação celular no mesmo tipo de lesão ou no tecido adjacente a elas entre os grupos ($p > 0,05$) (Figura 18).

Figura 18 – Proliferação celular nas diferentes regiões do fígado cirrótico: lesões pré-neoplásicas persistentes (LPNp), remodelantes (LPNr) e tecido adjacente ($p < 0,05$).

5.9 APOPTOSE

5.9.1 Marcação por TUNEL

Células em apoptose foram identificadas por meio de marcação enzimática pelo método TUNEL. A quantificação foi feita pela porcentagem de núcleos positivos em um total de 1000 núcleos e mostrou que, no tecido em geral, o grupo T14 apresentou quantidade maior de núcleos positivos do que o controle ($79,9\% \pm 3,7$ e $72,1\% \pm 7,8$ $p < 0,01$) (Figura 19). Entre os grupos controle (Figura 21A) e entre os grupos tratados nenhuma diferença foi observada.

Figura 19 – Porcentagem de células positivas ao TUNEL no fígado dos grupos controle e tratados com TAA ($p < 0,01$).

Em relação às LPNs (Figura 21B e 21C) e ao tecido adjacente (Figura 21D), o grupo T14 apresentou maior porcentagem de hepatócitos em apoptose nas LPNs ($82,13\%$) do que no tecido adjacente ($77,76\%$) e no fígado sadio ($72,06\%$). No grupo T35 a porcentagem de apoptose também foi maior nas LPNs, mas apenas comparadas ao tecido adjacente (Figura 20).

Figura 20 – Porcentagem de células positivas ao TUNEL nas lesões pré-neoplásicas e no tecido adjacente dos grupos ($p < 0,05$).

Figura 21 – Fotomicrografias do tecido hepático: dupla marcação para detecção de apoptose (TUNEL: nuclear) e de lesões pré-neoplásicas (GST-P: citoplasmática). (A) Fígado sadio. (B) Fígado cirrótico mostrando lesão pré-neoplásica. (C) Núcleos marcados no parênquima pré-neoplásico – GST-P positivo. (D) Núcleos marcados no parênquima adjacente – GST-P negativo. (E) Controle positivo da reação de TUNEL. (F) Controle negativo da reação de TUNEL. Barras de escala: 20 µm.

5.9.2 Contagem de corpúsculos apoptóticos

A análise geral dos grupos mostrou que a morte de hepatócitos foi mais acentuada nos grupos tratados pelos períodos mais curtos. A injeção de TAA por 35 semanas não aumentou significativamente a apoptose comparada ao grupo controle. Nos grupos tratados, tanto T14 quanto T21 exibiram número significativamente maior de corpúsculos apoptóticos do que T35, porém os dois grupos foram similares entre si (Tabela 11).

Tabela 11 – Apoptose das células hepáticas: corpúsculos apoptóticos/1000 células

C14	0,7 ± 0,8	T14	8,2 ± 8,4* [#]
C21	0,8 ± 0,9	T21	12,9 ± 11,4* [#]
C35	0,3 ± 0,8	T35	1,8 ± 1,9

* p<0,05 comparado com grupo controle

[#] p<0,05 comparado com T35

A apoptose foi maior nas LPNs do que no tecido adjacente. A maior quantidade de corpúsculos apoptóticos foi encontrada no T21, seguido pelo T14, e a morte celular foi mais elevada nas LPNp desse grupo. O menor índice apoptótico foi do grupo T35, tanto nas LPNs quanto no tecido adjacente (Figura 22A). As LPNp do grupo T21 apresentaram mais células em apoptose do que as lesões do T35. Na apoptose do tecido adjacente também o T35 registrou menor número de corpúsculos (Figura 22B). Imagens representativas dos corpúsculos contados em cada região encontram-se na figura 23.

Figura 23 – Fotomicrografias do tecido hepático mostrando apoptose em cada região analisada. **(A)** Fígado sadio. **(B)** Tecido adjacente à LPN. **(C)** Lesão persistente. **(D)** Lesão remodelante. *Setas* indicam corpúsculos apoptóticos. Imuno-histoquímica para GST-P seguida por HE. Barras de escala: 20 μ m.

5.10 MARCADORES TUMORAIS

5.10.1 Marcador sorológico: AFP

O teste ELISA para AFP revelou que os níveis plasmáticos dessa proteína foram muito baixos e, praticamente, semelhantes entre os grupos. Apenas o grupo tratado por 14 semanas, expressou um aumento significativo em comparação com o controle ($0,126 \pm 0,009$ x $0,121 \pm 0,001$, respectivamente). O T14 ainda demonstrou valor médio superior ao T35 ($0,120 \pm 0,001$), sendo estatisticamente diferente deste (Figura 24).

Figura 24 – Teste ELISA para AFP dos grupos controle e dos grupos tratados com TAA.

5.10.2 Marcadores teciduais

5.10.2.1 β -catenina

A imuno-histoquímica para β -catenina teve a finalidade de avaliar seu papel como molécula sinalizadora de acordo com sua localização na célula.

Conforme o esperado, esta proteína foi observada na membrana plasmática, onde participa dos complexos de adesão. A marcação da β -catenina foi mais intensa na membrana dos hepatócitos do grupo controle (Figura 9A), enquanto que nos grupos tratados com TAA a intensidade da marcação diminuiu (Figura 9B – 9F).

Entre os grupos tratados, T21 e T35 que foram expostos por período mais longo à TAA, apresentaram marcação mais fraca do que T14. Neste último, a intensidade da marcação foi similar a dos grupos controle.

Nos exemplares examinados não foi observada marcação nuclear da β -catenina, o que indicaria ativação da via de sinalização Wnt. Algumas regiões continham células com marcação citoplasmática, mas foram encontradas esporadicamente durante a análise.

Nesta reação imuno-histoquímica foi observada forte marcação de estruturas semelhantes a corpúsculos apoptóticos (Figura 9E e F).

Figura 25 – Fotomicrografias do tecido hepático: imuno-histoquímica anti- β -catenina. (A) Fígado sadio apresentando marcação na membrana. (B) Grupo T14: a intensidade da marcação é próxima à do grupo controle. (C) Grupo T21: β -catenina ligeiramente reduzida na membrana. (D) Grupo T35: diminuição da intensidade da marcação na membrana. (E) e (F) Fígado cirrótico com estruturas semelhantes a corpúsculos apoptóticos fortemente positivas para β -catenina. Barras de escala: 20 μ m.

5.10.2.2 HSP70

A expressão de HSP70 foi fraca e muito difusa pelo citoplasma dos hepatócitos. Entretanto, foi possível observar que a expressão ocorreu em regiões específicas do fígado cirrótico (Figura 26). Devido à baixa expressão desta proteína pelo tecido, não foi possível identificar as LPNs através de dupla marcação com GST-P, pois ambas são citoplasmáticas. Todavia, os nódulos regenerativos positivos para HSP70 (Figura 26C e 26D), quando confrontados com os cortes marcados com GS/GST-P, revelaram a expressão de HSP70 sempre em LPNs. Esta proteína foi mais expressa no grupo tratado por 14 semanas, com 76% dos cortes observados apresentando positividade (Tabela 12).

5.10.2.3 GPC3

A expressão de GPC3 foi baixa em todos os grupos, mas de modo geral o T35 teve uma quantidade maior desta proteína. Neste grupo, 51% dos cortes analisados apresentaram regiões positivas (Tabela 12). A GPC3 apresentou uma marcação citoplasmática granular e canalicular. Ela raramente foi vista nos grupos controle, mas, quando presente, foi observada nos hepatócitos pericentrais (Figura 27B). O grupo C35 foi o que teve maior número de animais apresentando células positivas para GPC3. A marcação citoplasmática foi muito rara e foi observada em células isoladas distribuídas pelo tecido. No fígado cirrótico essa proteína estava presente em locais onde a disposição das células exibia arranjo cordonal (Figura 27C) e, principalmente, nos hepatócitos próximos aos vasos (Figura 27D e 27E).

5.10.2.4 GS

A GS mostrou-se relativamente abundante, tanto nos animais controle quanto nos tratados. No grupo controle, a sua expressão foi restrita à região da veia centrolobular, nos hepatócitos de zona 3 (Figura 28A). Já no fígado cirrótico, a GS foi observada nos hepatócitos contíguos aos septos fibrosos, na periferia dos nódulos regenerativos (Figura 28B). Para esta proteína foi realizada dupla marcação com GST-P, o que permitiu observar a presença de GS e das LPNs (Figura 28C). Não houve um padrão nítido de marcação havendo células marcadas na periferia das lesões tanto quanto em nódulos GST-P negativos do tecido adjacente (Figura 28D e 28E). Apenas em áreas onde ocorreu necrose do tecido hepático foram observados grupos de hepatócitos que eram simultaneamente positivos para ambas as proteínas (Figura

28F). Observada isoladamente, sem considerar GST-P, a GS foi positiva em uma quantidade considerável do tecido analisado, embora essas regiões não abrangessem o nódulo regenerativo uniformemente. A expressão de GS foi maior no grupo T21 com positividade registrada em 61% dos cortes (Tabela 12).

5.10.2.5 Painel imuno-histoquímico: dois marcadores positivos

O painel imuno-histoquímico é constituído pela análise de HSP70, GPC3 e GS, em conjunto. O cruzamento de dois marcadores confere maior sensibilidade e especificidade ao diagnóstico.

A positividade para duas proteínas na mesma região apresentou baixa ocorrência, principalmente por causa da GPC3, que teve baixa expressão no tecido. Já HSP70 e GS foram relativamente abundantes e a positividade para ambas as proteínas ocorreu mais no grupo tratado por 21 semanas (Tabela 12).

Tabela 12 – Expressão dos marcadores tumorais do painel imuno-histoquímico: porcentagem de cortes positivos

Fenótipo	T14 (n=34)	T21 (n=49)	T35 (n=49)
GPC3	8,8	28,6	51,0*
HSP70	76,5	55,1	65,3
GS	26,5	61,2	57,1
GPC3 + HSP70	8,8	10,2	---
HSP70 + GS	14,7	24,5	18,4
GPC3 + GS	5,9	12,2	14,3#

Pelo menos um marcador positivo: teste de χ^2 (*p<0,0001)

Pelo menos dois marcadores positivos: teste de χ^2 (#p<0,05)

Figura 26 – Fotomicrografias do tecido hepático: imuno-histoquímica anti-HSP70. **(A)** Controle negativo da reação. **(B)** Fígado sadio sem expressão de HSP70. **(C)** Fígado cirrótico: região com expressão de HSP70 (marrom). **(D)** Grupo T14: interface de uma área positiva para HSP70 (acima) e uma área negativa (abaixo). **(E)** Grupo T21: observar menor expressão de HSP70, no nódulo à direita, comparado com 14 semanas. **(F)** Grupo T35: HSP70 expressa difusamente pelo tecido. Barras de escala: A (20 μ m); B – F (100 μ m).

Figura 27 – Fotomicrografias do tecido hepático: imuno-histoquímica anti-GPC3. (A) Controle negativo da reação. (B) Fígado sadio: GPC3 em hepatócitos próximos a uma veia centrolobular. (C) Grupo T14: GPC3 nas células arranjadas em cordões. (D) e (E) Grupo T21: GPC3 em células próximas a vasos sanguíneos; observar a disposição canalicular da proteína. (F) Grupo T35: baixa expressão de GPC3. Barras de escala: A (100 μ m); B – F (20 μ m).

Figura 28 – Fotomicrografias do tecido hepático: imuno-histoquímica dupla anti-GS e anti-GST-P. **(A)** Fígado sadio: localização da GS nos hepatócitos de zona 3. **(B)** Fígado cirrótico com marcação de GS na periferia dos nódulos regenerativos. **(C)**, **(D)** e **(E)** Fígado cirrótico com dupla marcação imuno-histoquímica para GS e GST-P: as LPNs também apresentam marcação de GS nos hepatócitos periféricos. **(F)** Área de necrose no fígado cirrótico apresentando células simultaneamente positivas para ambos os marcadores. Barras de escala: (100 μ m).

5.10.3 Marcadores moleculares

Foram analisados 3 genes considerados marcadores de CHC (GPC3, survivina e LYVE1), cuja expressão é diferenciada na transição da cirrose para o hepatocarcinoma.

GPC3 apresentou expressão aumentada nos grupos tratados com TAA em relação aos seus controles. Este aumento foi significativo nos grupos T14 ($p<0,05$) e T35 ($p<0,01$) (Figura 29A). Nos animais induzidos à cirrose hepática a expressão gênica de GPC3 foi maior no grupo tratado por 35 semanas (Figura 29B).

Figura 29 – Expressão gênica de GPC3 relativa ao grupo controle nos diferentes períodos de tratamento. **(A)** Comparação entre o grupo experimental e o grupo controle. **(B)** Comparação entre os grupos experimentais (* $p<0,05$; ** $p<0,01$).

A expressão gênica da survivina foi, consideravelmente, mais elevada nos animais tratados com TAA, em todos os períodos avaliados (Figura 30A). Interessantemente, a expressão de survivina foi reduzindo ao longo do período experimental de modo que este gene foi significativamente mais expresso em 14 semanas de tratamento ($5,4\pm1,8$ $p<0,05$) do que em 21 semanas ($3,3\pm1,1$) e 35 semanas ($2,3\pm0,9$) (Figura 30B).

Figura 30 – Expressão gênica de survivina relativa ao grupo controle nos diferentes períodos de tratamento. **(A)** Comparação entre o grupo experimental e o grupo controle. **(B)** Comparação entre os grupos experimentais (* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$).

O receptor LYVE1 foi menos expresso nos animais com cirrose dos grupos T14 e T21, sendo que esta menor expressão foi significativa no T21 ($p < 0,01$). Ao contrário do que era esperado, o T35 apresentou maior expressão deste gene do que o grupo controle, apesar de não ter sido estatisticamente diferente (Figura 31A). Todavia, quando comparamos os grupos experimentais, a maior expressão de LYVE1 é significativa em relação ao T21 (Figura 31B).

Figura 31 – Expressão gênica de LYVE1 relativa ao grupo controle nos diferentes períodos de tratamento. **(A)** Comparação entre o grupo experimental e o grupo controle. **(B)** Comparação entre os grupos experimentais (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

6 DISCUSSÃO

Os resultados demonstraram que os ratos tratados com TAA reagiram a esta injúria exibindo alterações hepáticas. Estas alterações ocorreram em todos os animais submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese e não foram registradas nos animais do grupo controle.

No decorrer do experimento o peso dos animais evoluiu conforme o esperado com um ganho de peso menor entre os animais que receberam TAA. A dificuldade em ganhar peso entre os animais induzidos à cirrose hepática pode estar associada ao déficit metabólico, uma vez que a injúria infligida pela TAA leva a morte celular e, assim, ao comprometimento de várias funções hepáticas. A perda constante de hepatócitos prejudica a síntese e o metabolismo adequado dos nutrientes em função da redução do número de células funcionais e do aumento da síntese de MEC no processo de cicatrização. Dessa forma, os animais sadios ganham peso com maior facilidade pela eficiência das células hepáticas na metabolização e utilização dos nutrientes (FONTANA et al., 1996; GEORGE et al., 2001).

Conforme foi apontado e discutido em nosso estudo anterior (LIMA, 2008), sugere-se que os efeitos tóxicos da TAA sobre o ganho de peso sejam eliminados tão logo se suspenda a administração do fármaco. Entretanto, no presente experimento, a recuperação do peso corporal não foi tão acentuada quanto à previamente relatada. Este fato pode ser justificado pelos ajustes semanais na dose de TAA administrada, calculada e atualizada semanalmente em função do peso dos animais, no intuito de impedir a adaptação metabólica do animal à substância e, assim, mantendo a constância da intensidade da ação da droga sobre os hepatócitos.

No que diz respeito à taxa de mortalidade registrada entre os grupos experimentais não constatamos diferenças estatísticas. Entretanto, um dos animais do grupo T14 foi a óbito no final da primeira semana, fato que sugeriu alta sensibilidade à droga num provável caso de insuficiência hepática fulminante hiperaguda, o que estaria de acordo com a classificação proposta por O'Grady et al. (1993). As demais mortes ocorreram em diferentes períodos do experimento e infere-se que tenham sido ocasionadas por falência hepática de outro grau decorrente dos danos celulares causados pela TAA.

Quanto à caracterização macroscópica, a cirrose desenvolvida apresentou-se menos intensa e homogênea no grupo tratado pelo período mais curto. Interessantemente, apenas no T21 foi observada a ocorrência de ascite, fato que não foi registrado nos trabalhos anteriores da mesma linha de pesquisa com o modelo da TAA (GUERRA et al., 2009, 2010; LIMA, 2008; SILVA, 2011). Essa presença de líquido na cavidade abdominal pode estar relacionada com alterações na circulação hepática provocadas pela fibrose, as quais resultam em hipertensão portal. O surgimento de ascite somente no grupo do período intermediário de

indução (21 semanas) leva a crer que a administração de TAA por 14 semanas, embora seja considerada crônica, não promove eventos inflamatórios ou hipertensão portal suficientes para o acúmulo de líquido. Por outro lado, o período mais prolongado de aplicações de TAA (35 semanas) pode constituir-se em uma exposição demasiadamente longa e permitir que o organismo consiga combater os efeitos da inflamação ou mesmo se adaptar a sua nova condição circulatória.

Com relação aos parâmetros biométricos avaliados, foram detectadas diferenças quanto ao tempo de administração de TAA, confirmando a eficácia da substância em promover injúria hepática de maneira tempo-dependente. Essa injúria refletiu-se num menor ganho de peso dos animais com cirrose no decorrer do experimento, no entanto, sem ocasionar diferenças significantes entre os grupos tratados no peso do corpo ou da carcaça, no dia do abate. Vale lembrar que T14 recebeu TAA por 7 semanas a menos que T21 e por 21 semanas a menos que T35. Portanto, a similaridade nesses dois parâmetros demonstra que T21 e T35 sofreram maior comprometimento hepático. Isto explicaria por que esses dois grupos não superaram o primeiro em massa corpórea ao final do experimento, o que seria natural do próprio crescimento do animal, como verificado nos grupos controle. Além disso, a semelhança nos pesos do corpo e da carcaça entre os grupos tratados com TAA, comprova que todas as diferenças mostradas pela análise estatística foram devidas ao peso do fígado.

O incremento da massa e do volume hepático foi diretamente proporcional ao tempo de tratamento com TAA. O mesmo foi observado para o índice hepatossomático e hepatocorporal. O maior peso e maior volume do fígado cirrótico podem estar associados a processos inflamatórios, incluindo edema, proliferação celular (sobretudo de hepatócitos, HSCs, células ovas e ductos biliares) e uma produção exacerbada de MEC. Em conformidade com esses dados, Yeakel (1948) afirma que água e outros elementos constituintes do fígado podem influenciar o seu peso, assim como glicogênio e gordura que representam material de reserva. Tomados em conjunto, todos esses fatores podem contribuir para o aumento no peso do órgão.

A gravidade da cirrose desenvolvida no presente trabalho, no que tange à quantidade e tamanho de nódulos regenerativos, vascularização destes nódulos e surgimento de lesões macroscópicas, foi também proporcional ao tempo de tratamento. Ainda que todos os animais tenham atingido o estágio de cirrose, conforme verificado pelo estadiamento, foram observadas diferenças quanto à formação, distribuição e quantidade de nódulos nos fígados cirróticos. No grupo tratado por 14 semanas a formação de nódulos foi irregular e a fibrose menos intensa do que nos outros dois grupos. A administração de TAA tanto por 21 quanto

por 35 semanas propiciou a formação de nódulos regenerativos de forma uniforme, com estruturas aparentemente displásicas. Constatou-se a presença de vascularização visível, inclusive, a olho nu. No tocante a esse aspecto, segundo Yamauchi et al. (2005) uma das características da cirrose é a perda de fenestras do endotélio sinusoidal e formação de uma membrana basal subendotelial, fenômeno descrito como capilarização sinusoidal.

Outro ponto relacionado à capilarização dos sinusóides diz respeito ao fato da mesma comprometer o intercâmbio normal entre o sangue e as células do fígado sendo um dos principais contribuintes para a insuficiência hepática em pacientes cirróticos. Esse fenômeno de defenestração do endotélio sinusoidal foi observado em ratos com cirrose induzida por TAA (XU et al., 2008). Os pesquisadores observaram que as microvilosidades dos hepatócitos localizadas no espaço de Disse foram extintas, prejudicando as trocas com o sangue sinusoidal. Os hepatócitos, incapazes de obter a nutrição necessária e eliminar os metabólitos, entraram em apoptose. Esses dados encontram consonância com nossos resultados, que mostraram a presença de nódulos grandes e vascularizados, como aqueles vistos nos grupos T21 e T35, os quais sugerem evidências de lesões potencialmente neoplásicas (≥ 2 cm, no caso de humanos). A presença de capilarização sinusoidal e, posteriormente, a angiogênese aumenta gradualmente durante a evolução da carcinogênese e são eventos concomitantes com o grau crescente de malignidade dos nódulos (MATSUI et al., 2011).

Nossos dados sobre a análise histológica demonstraram que os nódulos formados no grupo T14 eram, muitas vezes, incompletos e possuíam a estrutura parcialmente preservada com tratos portais em seu interior. A presença de espaços porta, mesmo em nódulos displásicos, é uma característica de lesões não malignas (SCHAFF et al., 2010). Já nos grupos T21 e T35, a fibrose foi mais intensa e a formação de nódulos mais evidente. O parênquima do fígado cirrótico apresentou redução da quantidade das fibras colágenas de sustentação tecidual vistas nos fígados controle. Nestes últimos as fibras localizavam-se ao longo dos sinusóides, enquanto que nos cirróticos os sinusóides eram comprimidos por uma densa massa celular homogênea, desprovida de tratos portais. Esse parênquima, provavelmente, é formado após os hepatócitos serem circunscritos por septos fibrosos e, então, proliferarem respondendo à injúria tóxica pela TAA. De fato, estudos anteriores relataram que durante o processo de regeneração, ocorre uma hiperplasia compensatória das células parenquimais reconstituindo o mesmo tipo de tecido perdido (DAGLI; HERNANDEZ-BLAZQUEZ, 2007). Dessa maneira, a população de hepatócitos seria reposta prioritariamente, garantindo a funcionalidade básica do órgão, mas protelando a restituição do arcabouço de sustentação. Cabe ressaltar que a cirrose é, pois, um processo dinâmico de injúria, regeneração e cicatrização que gera

alterações estruturais, celulares e teciduais. A fim de caracterizá-las foi realizada a análise histopatológica que considerou a atividade necroinflamatória no tecido hepático.

Em nosso trabalho, observamos a presença de eventos relacionados à hepatite de interface, também chamada de necrose em saca bocado ou necrose *piecemeal*, a qual é caracterizada por hepatócitos encarcerados por células inflamatórias que migram a partir de espaços porta ou septos fibrosos. Estudos demonstram que esses hepatócitos, por sua vez, sofrem modificações como aumento de tamanho e aumento da densidade citoplasmática e, por fim, entram em apoptose. Este tipo de lesão é característico de hepatites virais tendo sido bem documentada na hepatite C (BOLDORINI et al., 1997), na hepatite autoimune (IZUMI; NAKAMURA; MANO, 2010) e na cirrose experimental induzida pelos modelos clássicos – DMN, CCl₄ e TAA (JANG et al., 2008).

No fígado cirrótico foram observadas muitas áreas de necrose do tecido hepático, principalmente nos grupos T21 e T35. Na maior parte das vezes, a necrose foi vista na região centrolobular, um fato em concordância com a descrição de outros trabalhos de injúria hepática por TAA (AL-ATTAR, 2011; LEDDA-COLUMBANO et al., 1991). Nesta região do lóbulo hepático a função primordial dos hepatócitos é a detoxificação das substâncias nocivas com consequente produção de radicais livres gerando estresse oxidativo e levando à necrose celular (TÚNEZ et al., 2005). Cabe lembrar que a necrose é um tipo de morte celular que ocorre simultaneamente com a apoptose, mas, ao contrário desta, provoca a destruição do tecido. A morte celular por necrose é, geralmente, acompanhada por resposta inflamatória enquanto que a apoptose não altera a arquitetura tecidual. A apoptose pode ocorrer devido a danos celulares ou como controle do excesso de tecido hepático. Este excesso pode ser gerado por hiperplasia compensatória induzida pelo estímulo regenerativo produzido pelo agente químico (COLUMBANO et al., 1996; LEDDA-COLUMBANO et al., 1991).

Além da necrose, no presente estudo, verificou-se a ocorrência de infiltrado inflamatório focal e portal, fato comumente relacionado à secreção de várias citocinas e quimiocinas que contribuem para a inflamação. Desta forma, nossos dados corroboram os de Oo; Shetty e Adams (2010) sobre hepatites crônicas. Segundo esses autores, durante a hepatite, a taxa de recrutamento de linfócitos via endotélio sinusoidal aumenta e a sua retenção no fígado em locais de inflamação ou em superfícies epiteliais resulta em hepatite crônica e inflamação persistente.

Outro aspecto importante acerca das alterações teciduais é a grande quantidade de células ovas presentes após a administração de TAA tanto nas áreas de proliferação de ductos quanto ao longo dos septos fibrosos. Lowes et al. (1999) afirmaram que em um quadro de

cirrose há uma íntima associação entre a proliferação de células ovas e o maior risco de desenvolvimento de hepatocarcinoma. Na hepatite crônica humana o número de células ovas está diretamente relacionado ao grau da doença e pode indicar o futuro desenvolvimento de CHC (TSAMANDAS et al., 2007). As células ovas são CPHs podendo formar tanto hepatócitos quanto colangiócitos e aparecem quando a regeneração de hepatócitos maduros é suprimida (THAN; NEWSOME, 2014). Nesse caso, quando os hepatócitos não respondem adequadamente ao processo de regeneração face à injúria aplicada ao órgão, a ativação das células ovas seria um evento auxiliar na manutenção e recuperação do tecido hepático. Em modelos animais, a proliferação de células ovas está associada à presença de células inflamatórias no fígado, o que foi verificado também neste experimento. Quando colocadas em cultura, as células ovas de animais induzidos à cirrose se deterioram rapidamente, sugerindo que fatores exógenos sejam fundamentais para sua manutenção. Assim, citocinas provenientes de células inflamatórias e outros fatores produzidos por células associadas à fibrogênese, tais como HSCs e CKs, podem ser responsáveis por estimular a proliferação e a migração de células ovas (TSAMANDAS et al., 2007).

Outra alteração histológica evidenciada foi a balonização de hepatócitos nos fígados cirróticos, verificada de maneira mais intensa no grupo T35, o mesmo grupo no qual foi verificada também esteatose mais intensa. A balonização tem sido relatada e relacionada com necrose hepatocelular e esteatose macrovesicular decorrentes da síndrome metabólica e consumo de álcool, em humanos (NOUJAIM et al., 2010) muito embora tenha sido descrita em lesões hepáticas em casos de leishmaniose visceral (DUARTE et al., 2008).

Também constatamos a formação de pseudoglândulas, ou rosetas, mais frequentemente observada no grupo tratado por 35 semanas. Essas estruturas são típicas de NDAG e CHC inicial e costumam estar associadas com esteatose, angiogênese, atipias nucleares e displasia de pequenas células (CHANG et al., 2010; DREBBER; DIENES, 2006; RONCALLI et al., 2011).

Neste trabalho, a técnica de impregnação pela prata demonstrou que as fibras reticulares dispuseram-se uniformemente no parênquima do fígado sadio, formando uma rede de sustentação para os hepatócitos. A análise das fibras reticulares é amplamente utilizada como critério diagnóstico na diferenciação de nódulos hepatocelulares, pois a malha de reticulina diminui gradativamente conforme aumenta a malignidade da lesão. Tanto no AH, quanto na HNF e no NDAG a rede de fibras reticulares é preservada enquanto que no CHC está muito diminuída ou mesmo ausente (SHAFIZADEH; KAKAR, 2011; VERTEMATI et al., 2012). No fígado cirrótico foi observada considerável diminuição ou mesmo ausência

dessas fibras no parênquima dos nódulos regenerativos. Neste caso, as observações são diversas das de Salomao; McMillen; Lefkowitz (2011) que afirmaram que o tecido não-neoplásico, mesmo o cirrótico, possui a rede de reticulina bem desenvolvida. A divergência dessas observações pode ser devida ao objeto de análise, uma vez que o trabalho citado compreendia tecido humano. Esta hipótese é reforçada pelo fato de que o mesmo padrão de distribuição das fibras reticulares observado no presente estudo foi descrito para o modelo de injúria hepática por CCl₄ em ratos (GEORGES et al., 2007). Esses autores também constataram a perda da reticulina parenquimal e o aumento das fibras nas regiões portais. Segundo eles, esta característica é consequência da dinâmica de deposição de MEC, que se iniciaria nas áreas portais, e da alteração dos elementos da própria matriz. Sabe-se que durante o processo de fibrose hepática há acúmulo de MEC e substituição do colágeno tipo IV, de baixa densidade, pelo colágeno tipo I de alta densidade (ALBANIS; FRIEDMAN, 2006). A maior parte das proteínas da MEC é composta por colágeno e os tipos I, III, IV e V são os mais abundantes. Na cirrose, a deposição de MEC implica no acúmulo de colágeno do tipo I (componente do tecido cicatricial) e III (componente das fibras reticulares) (BEDOSSA; PARADIS, 2003). Isto corrobora o que foi observado em nosso experimento, em que tanto fibras colágenas quanto reticulares foram identificadas nos espaços porta, expandindo septos fibrosos, enquanto que a malha de sustentação do parênquima hepático não foi reconstruída.

As provas de função hepática são aspectos fundamentais para o diagnóstico e avaliação da gravidade de hepatopatias, bem como para o seu monitoramento. O fígado é um órgão dotado de grande plasticidade devida, principalmente, a sua capacidade de regeneração, o que lhe confere o estado funcional. Isto garante o desempenho das funções metabólicas mediante diferentes agressões (GAYOTTO; ALVES, 2001). Quando a injúria é contínua, causando lesão celular, acontece um desequilíbrio que envolve alterações de permeabilidade da membrana plasmática dos hepatócitos. Por conseguinte, é possível detectar no plasma substâncias que, normalmente, pertencem ao meio intracelular, como as transaminases. O aumento dessas substâncias com a morte celular possibilita diagnosticar a presença e a extensão da necrose tecidual, a qual está relacionada à concentração enzimática no plasma. A ALT é a transaminase mais usada para avaliar processo inflamatório ou necrótico no fígado, pois é liberada facilmente quando o hepatócito sofre alguma alteração. A elevação de AST é encontrada nas hepatites virais podendo ser discretamente maior do que os níveis de ALT. Quando há necrose extensa, a AST pode baixar ao passo que a ALT permanece alta (GAYOTTO; ALVES, 2001).

No que concerne às provas de função hepática, o grupo tratado por 14 semanas apresentou aumento dos níveis plasmáticos das transaminases, da ALKP e da GGT, em comparação com o grupo controle. As alterações observadas nesse grupo demonstraram que o tratamento com TAA provocou morte celular com liberação do conteúdo intracelular, evidenciada pela detecção de ALT e AST. Esse período de indução também foi suficiente para causar alterações biliares, observadas pelo aumento de ALKP associada à GGT, porém, em relação à síntese protéica, nenhuma alteração significativa foi notada. Este resultado condiz com a análise da proliferação celular que foi maior neste grupo, embora sem diferença estatística. O processo regenerativo acentuado nos animais do grupo T14, provavelmente, supriu a demanda funcional mantendo a síntese de proteínas que seria prejudicada pela constante perda de células causada pela TAA.

No grupo T21 foram observadas as mesmas alterações nas provas de função hepática que as constatadas no grupo 14. Entretanto, perfazendo 21 semanas de tratamento, os animais com cirrose hepática apresentaram também significativa alteração na síntese protéica. Ao contrário do que era esperado, houve um aumento dos níveis plasmáticos de ALB e diminuição da GLOB; o mesmo foi observado no grupo T35. ALB e GLOB juntas compõem a TP e, geralmente, encontram-se reduzidas em caso de lesão hepática, devido ao aumento da permeabilidade capilar e à diminuição da produção hepática (BANKS, 1992; SCHUPPAN; AFDHAL, 2008). Todavia, em hepatites agudas e crônicas os níveis de ALB podem ser normais, em virtude de sua meia vida longa, cerca de 22 dias (GAYOTTO; ALVES, 2001). Os achados do nosso trabalho sugerem que a ALB mais elevada nos grupos com maior tempo de indução pode ser resultante da adaptação metabólica do fígado. Assim, o órgão conseguiria responder à injúria restaurando sua função de síntese e compensando o seu déficit funcional através da proliferação celular. Por fim, os hepatócitos sofreriam mais os efeitos tóxicos da TAA no período mais inicial, mas se adaptariam as novas condições ao longo do tempo.

Apesar do aumento na fração de ALB dos grupos T21 e T35 e da estabilidade do grupo T14, em relação aos seus respectivos controles, a TP apresentou sutil diminuição. Este resultado se deve ao fato de que a fração de GLOBs diminuiu nos 3 tratamentos, diferentemente do que era esperado, uma vez que essas proteínas estão associadas com processos inflamatórios, os quais estavam presentes no exame histopatológico. Contudo, de acordo com Gayotto e Alves (2001), as GLOBs são proteínas de meia vida curta e podem diminuir nas doenças hepáticas crônicas em que há deficiência na síntese protéica. No nosso estudo ficou demonstrado que a função de síntese não foi comprometida, conforme pôde ser observado pelos valores de ALB, embora esta síntese talvez estivesse voltada principalmente

para componentes constitutivos, os quais desempenham funções vitais. A ALB, por exemplo, tem importância fundamental no transporte de substâncias orgânicas, na manutenção da pressão oncótica e da homeostase do organismo (GAYOTTO; ALVES, 2001).

Não foram observadas diferenças relevantes em relação ao tempo de manipulação dos animais dos grupos controle na análise bioquímica plasmática dos marcadores analisados. Já a comparação entre os grupos experimentais revelou aumentos significativos de ALB, e consequentemente da TP, no grupo T35 comparado ao T14. Este aumento, nesse caso, não pode ser explicado pelo aumento da proliferação celular já que o grupo T35 foi o grupo com menor proliferação. Provavelmente, o longo período de exposição do fígado à TAA possa ter propiciado uma estabilização, aliando adaptação metabólica do animal à droga e manutenção da funcionalidade hepática, o que permitiria reduzir a proliferação celular. É sabido que, após um determinado período de administração da substância, o animal adquire resistência à droga (LI; BENJAMIN; ALEXANDER, 2002), mas era esperado que os ajustes semanais na dosagem de TAA sanassem os problemas de resistência e adaptação. No entanto, parece que o fígado ainda foi capaz de demonstrar resiliência, superando as adversidades.

Outro aspecto importante a ser ressaltado são os elevados níveis de GGT, cujo aumento foi proporcional ao período de indução. Esta enzima reflete lesões do sistema biliar e está correlacionada com os valores de ALKP. O acometimento do sistema biliar foi evidenciado por extensas áreas de proliferação de ductos biliares, algumas com produção de mucopolissacarídeos e outras com luz dilatada. A GGT também está aumentada nos processos em que o citocromo P-450 tenha sido induzido por algum tipo de substância tóxica (GAYOTTO; ALVES, 2001). Esta informação vai ao encontro do modelo adotado neste trabalho, pois é reconhecida a via de ativação da TAA pela ação catalítica desse citocromo. O sistema enzimático citocromo P-450 compreende várias isoenzimas das quais a CYP2E1 parece ser a que está mais envolvida na metabolização da TAA (WANG et al., 2000). Esta é a principal família de citocromos P-450 do fígado dos mamíferos e desempenha um papel crucial no metabolismo, toxicidade e carcinogênese de xenobióticos (CARO; CEDERBAUM, 2005; RAMAIAH; APTE; MEHENDALE, 2001).

Alguns aspectos sobre a TBIL merecem destaque. Embora não tenha sido encontrada diferença significativa em nenhuma análise, houve um leve aumento dos seus níveis plasmáticos nos grupos T21 e T35 quando comparados ao controle e também quando comparados com o grupo T14. Este resultado apresenta-se relevante em virtude do fato de que esse aumento estaria em concordância com a análise histopatológica que evidenciou a presença de sinusóides dilatados, contendo sangue e várias áreas de hemorragia nesses 2

grupos. O aumento de TBIL, supostamente, se dá pela quantidade exacerbada de glóbulos vermelhos para ser degradada.

A ação carcinogênica da TAA foi confirmada pelo aparecimento de LPNs, as quais foram identificadas pela imuno-histoquímica anti-GST-P, proteína que tem sua expressão aumentada em focos e nódulos de hepatócitos alterados (WOOD; KORKOLA; ARCHER, 2002). A GST-P é utilizada como marcador para células pré-neoplásicas, pois apresenta baixa atividade em tecidos normais ou em regeneração (SATO et al., 1985). Nesses casos, a concentração de GSTs é suficiente para promover a proteção da célula contra substâncias nocivas provenientes dos alimentos ou subprodutos do próprio metabolismo. Todavia, essas enzimas encontram-se aumentadas frente à injúria hepática, participando do processo de detoxificação (SHEEHAN et al., 2001).

A TAA é ativada pelo citocromo P-450, que faz a sua oxidação gerando metabólitos tóxicos. Sabe-se que a injúria constante provocada pela administração a longo prazo dessa substância acarreta modificações bioquímicas e moleculares nas células e uma delas é o aumento da atividade da GST-P, devido à ação citotóxica dos seus metabólitos. As LPNs apresentam expressão alterada de GST-P no citosol, região celular onde é sintetizada (FERNANDEZ-CHECA; KAPLOWITZ, 2005; SATO et al., 1985).

Neste trabalho, as LPNs apareceram em todos os grupos tratados com TAA ocupando mais de 70% da área analisada no grupo T35, 50% no grupo T21 e cerca de 20% no grupo T14. Isto mostra que, apesar da adaptação metabólica que busca manter as funções básicas em termos de bioquímica sanguínea, as alterações celulares e a transformação dos hepatócitos ocorreram em larga escala. Algumas lesões atingiram até 7 mm de diâmetro, podendo constituir adenomas que, geralmente, são menores do que 3 mm, no estágio inicial (OGAWA, 2009). Na hepatocarcinogênese experimental considera-se que o número das LPNs, no fígado do rato, implica na intensidade do efeito de iniciação, enquanto que o tamanho das LPNs está relacionado com a intensidade do efeito de promoção (SAWAKI et al., 1998). Neste experimento, o grupo T21 apresentou o maior número de LPNs/cm² demonstrando que a fase de iniciação da carcinogênese hepática foi mais intensa em 21 semanas do que em 14 semanas de indução. Quanto ao tamanho, as lesões foram maiores quando o tratamento foi mais duradouro mostrando que a injúria tóxica pela TAA também favoreceu a fase de promoção.

Em nosso trabalho verificamos que o tratamento com TAA promoveu uma intensa proliferação celular que chegou a ser 30 vezes maior do que o grupo controle. A injúria tóxica pode ter causado lesão e morte celular e atuaria como estímulo regenerativo para as células hepáticas, resultando na iniciação dos hepatócitos. A injúria prolongada favoreceu a fase de

promoção das LPNs que aumentaram em tamanho através da replicação clonal das células iniciadas. A proliferação celular, assim como a apoptose, é um evento fundamental na manutenção das populações celulares nos tecidos normais. A proliferação descontrolada e o desequilíbrio entre as atividades proliferativa e apoptótica resultam no crescimento tumoral, pois a proliferação celular promove a expansão das células neoplásicas (ALBERTS et al., 2008).

A principal característica da fase de promoção é a sua reversibilidade, a qual pode ser conferida por morte celular, apoptose ou remodelamento da lesão. A promoção, ao contrário da iniciação, pode ser modulada por fatores ambientais. Assim, no caso da carcinogênese experimental, a fase de promoção pode ser regulada pela administração do agente promotor, cuja capacidade iniciante originará um número finito de células iniciadas. Entretanto, nas causas “naturais” ou nas doenças crônicas, a presença contínua do promotor aumenta o risco de desenvolvimento do câncer em função do aumento da taxa de proliferação celular, acentuando a probabilidade de propagação de um erro genético (PITOT, 2001; PITOT; DRAGAN, 1991). Nos resultados obtidos das LPNs foi observado o predomínio no número e, sobretudo, na área das LPNp sobre as LPNr, indicando que o remodelamento não é o principal mecanismo de reversibilidade neste modelo.

Em contrapartida, a proliferação celular, no grupo T21, foi maior nas LPNr do que nas LPNp. Nesse grupo, cuja fase de iniciação foi mais intensa, talvez a tentativa de reversão por remodelamento da lesão também o seja. Foi constatado que no parênquima normal as células proliferaram mais do que nas LPNs. Nestas a proliferação se manteve relativamente constante nos períodos analisados. Já no tecido adjacente notou-se um aumento gradual evidente ao longo da indução, embora não significativo. Resultado inverso foi observado nas LPNr, com proliferação maior no grupo tratado por 14 semanas. A proliferação das LPNr foi similar à do tecido adjacente, o que pode caracterizar um remodelamento bem sucedido nesse grupo. O número de LPNr foi pequeno em todos os grupos, mas o T14 também apresentou a menor área ocupada por esse tipo de lesão. Segundo esse critério, a hipótese de remodelamento das lesões no T21 é refutável porque a proliferação nas LPNr foi menor do que no tecido adjacente. Portanto, o remodelamento foi menos eficiente no T21 do que no T14, pelo menos no que tange à proliferação celular. A suposição de que o remodelamento não é o principal mecanismo de reversibilidade desse modelo se sustenta pelo fato de que as LPNp predominaram em número e, sobretudo, em tamanho e a proliferação foi similar às LPNr, exceto no grupo T14.

A análise da apoptose foi inicialmente proposta pelo método TUNEL, mas a quantificação mostrou mais de 70% de células marcadas, mesmo nos grupos controle. O número extremamente alto levantou a suspeita de que os resultados pudessem estar superestimados, uma vez que as células positivas não exibiam as características morfológicas da apoptose. Em vista disso, o método de contagem de corpúsculos apoptóticos foi utilizado para confirmar os resultados concernentes à morte celular.

Na avaliação pelo TUNEL, apenas o grupo T14 teve aumento significativo da apoptose. Esta diferença foi devida à apoptose nas LPNs que foi superior ao tecido adjacente. No que diz respeito à morte celular, nossas observações concordam com o modelo do hepatócito resistente, em que as lesões apresentam apoptose mais elevada do que o parênquima normal e, a proliferação celular também é maior nas LPNs (CARDOZO, 2007; CHAGAS et al., 2011). No entanto, nosso modelo mostrou resultados opostos com as LPNs proliferando menos. Essas discordâncias são, provavelmente, ocasionadas pelo fato de que no nosso estudo o tecido adjacente seja cirrótico e, por si só, já possua muitas alterações teciduais e celulares acarretadas pela injúria hepatotóxica crônica.

Na contagem dos corpúsculos apoptóticos, conquanto os resultados tenham sido mais convincentes, no geral, foram equivalentes ao TUNEL. No entanto, uma importante diferença foi revelada: a apoptose foi mais elevada no grupo T21, mesmo grupo em que já foi registrado o maior número de lesões. Esses dois resultados indicam que a apoptose é um evento que se contrapõe à iniciação da hepatocarcinogênese – mais efetiva no T21 – buscando impedir a sobrevivência e a multiplicação de células iniciadas (BURSCH et al., 2005).

Posto que a apoptose seja um processo complementar à proliferação, sendo responsável pela manutenção do número adequado de células e pela remoção de células danificadas, o aumento da morte celular no tecido pré-neoplásico impediria a sobrevivência e a multiplicação de células iniciadas (BURSCH et al., 2005; SCHULTE-HERMANN et al., 1993). Esta relação foi refletida pelos dados obtidos neste trabalho (LIMA-PORTELA et al., 2013) com maior apoptose nas LPNs. Alguns autores consideram a apoptose um fator importante na regeneração tecidual, pois observaram que as células apoptóticas liberam sinais de crescimento que estimulam a proliferação de CPHs (LI et al., 2010). Entretanto, outros estudos mostram que a apoptose é apenas ligeiramente maior no CHC se comparada ao fígado normal, indicando que não seria um processo crítico para o desenvolvimento ou para a progressão da doença. Assim, um elevado índice de proliferação, característico de CHC, pode não estar associado com aumento da taxa de apoptose (SAFTOIU et al., 2003).

Nesse experimento, ao contrário do que era esperado, os níveis de AFP foram mais elevados no grupo T14, cujo período de tratamento foi menor e as alterações estruturais e histopatológicas mais brandas. O que se observou foi um decréscimo gradual, inversamente proporcional ao período de indução. Tratando-se de marcadores específicos para diagnóstico e monitoramento, a AFP é utilizada, praticamente, como único marcador sorológico do CHC na prática clínica, apesar da sua sensibilidade bastante baixa na fase inicial do tumor (VELOSA, 2011). Algumas alternativas têm sido pesquisadas, mas ainda não foram incorporadas à rotina laboratorial como a AFP. A dosagem desta proteína tem sido útil, há muito tempo, para a triagem de pacientes de alto risco e como marcador tumoral para o desenvolvimento de CHC (JIA et al., 2007). Pesquisadores que utilizaram AFP como marcador de neoplasia experimentalmente induzida chamaram atenção para o fato de que a elevação dos níveis de AFP apresenta um pico no período inicial que, se perdido, pode comprometer o diagnóstico. O aumento da AFP nos animais constituiria uma resposta aguda e estaria relacionado com a proliferação das diversas células do fígado durante o processo de regeneração (KROES; WILLIAMS; WEISBURGER, 1973). Isto confere à AFP a desvantagem de não ser específica para o CHC e estar aumentada em pacientes com hepatite e doença hepática crônica (PAGE et al., 2014). Possivelmente, a maior concentração de AFP no período inicial do experimento (14 semanas) seja devida à resposta regenerativa e não ao desenvolvimento tumoral.

Dessa forma, as alterações displásicas do tecido hepático devem ser aliadas a uma seleção de biomarcadores. Além disso, os aspectos morfológicos são essenciais para complementar o diagnóstico e para fortalecer a especificidade desses marcadores, especialmente a AFP, tendo em conta que seu nível plasmático pode diminuir após o desenvolvimento do tumor, enquanto outras variáveis persistem como ferramentas diagnósticas confiáveis (ABDEL-HAMID, 2009).

Nossos resultados não foram satisfatórios quanto à ativação da β -catenina, pois não foi observada expressão nuclear dessa proteína, apesar de ser notada uma redução na intensidade da marcação na membrana nos fígados cirróticos. Considerando que a β -catenina está mutada e expressa no núcleo em aproximadamente 20% dos CHCs (SHAFIZADEH; KAKAR, 2011), talvez o modelo da TAA não tenha alcançado o grau de malignidade necessário para a ativação dessa via de sinalização. Esses autores citam que nos AHs somente cerca de 10% mostram ativação de β -catenina. Os outros 90%, assim como a HNF, apresentam apenas marcação na membrana, como foi verificado no nosso estudo. Outro fator que poderia explicar a ausência de β -catenina nuclear é a vantagem seletiva da mutação. Um exemplo disso foi um modelo de carcinogênese induzida por DEN que proporcionava vantagem

seletiva a hepatócitos com mutações em H-ras. Curiosamente, quando os animais foram alimentados com fenobarbital após a injeção de DEN, 80% dos tumores mostraram mutações da β -catenina, enquanto que as mutações de H-ras foram indetectáveis, sugerindo que o fenobarbital seleciona positivamente células que contêm mutações de β -catenina (NEJAK-BOWEN; MONGA, 2011). No nosso caso, talvez a TAA não seja o modelo que seleciona essa mutação.

A patogênese molecular do CHC é muito heterogênea, mas a ativação da via Wnt/ β -catenina é um dos eventos mais frequentes associados com a transformação maligna das células hepáticas (CAPURRO et al., 2005). A β -catenina é um componente essencial dessa via, desempenhando funções de adesão celular, transdução de sinal e transcrição gênica (KIM; SILLS; HOULE, 2005). Essa proteína geralmente é estudada em associação com a glutamina sintetase (GS), regulando positivamente a sua expressão (SAKAMOTO, 2009). Anormalidades nessa via são refletidas pelo aumento de GS, a qual é fortemente expressa em tecidos que apresentam β -catenina nuclear (DI TOMMASO et al., 2007; 2009).

Além da β -catenina, outros marcadores teciduais foram analisados para a caracterização da hepatocarcinogênese pela TAA. Neste trabalho avaliamos o painel imuno-histoquímico composto pelas proteínas GPC3, HSP70 e GS. A expressão destas proteínas tem sido indicada para o diagnóstico do CHC precoce, em humanos, apresentando alta sensibilidade e especificidade quando pelo menos dois desses marcadores estão aumentados (TREMOSINI et al., 2012).

No modelo da TAA foi observada maior expressão de HSP70 em 14 semanas de administração, indicando que ela não está relacionada com a transformação dos hepatócitos, já que neste grupo as alterações celulares observadas não apontaram lesões, de fato, neoplásicas. O aumento de HSP70 no período experimental mais curto é, possivelmente, uma resposta celular inicial e, portanto, é mais sensato supor que a toxicidade do agente seja responsável pelo aumento circunstancial desse marcador devido à injúria causada pelo tratamento. Se fosse um indicativo de malignidade, era de se esperar seu aumento nos animais submetidos a tratamentos mais prolongados – 21 e 35 semanas – com maior probabilidade das LPNs progredirem para lesões malignas.

A HSP70 é uma proteína fisiologicamente essencial, com papel antiapoptótico, cujo aumento permite que as células sobrevivam em condições adversas (DI TOMMASO et al., 2007). Ela pode ser usada como marcador diferencial entre LPNs e CHC inicial por não se expressar em lesões benignas (SAKAMOTO, 2009). O seu aumento é relatado em vários tumores, sugerindo seu envolvimento na transformação ou na progressão de carcinomas, e

está relacionado com malignidade e resistência à terapia (CHUMA et al., 2003; MAYER; BUKAU, 2005).

De maneira contrária às nossas expectativas, a GPC3 foi identificada no fígado dos animais controle e também no fígado cirrótico. No grupo C35 a positividade para GPC3 foi maior em quantidade de células e em número de animais do que nos outros grupos, demonstrando que a sua expressão pode ser causada por alterações celulares relacionadas com o envelhecimento. Esse grupo também mostrou pequenos focos de hepatócitos GST-P positivos. A GPC3 é utilizada como marcador tumoral porque sua expressão aumenta no CHC em relação às LPNs e ao tecido cirrótico, sugerindo sua atuação na transformação maligna das células (LIBBRECHT et al., 2006). Essa proteína apresenta alta sensibilidade e especificidade na diferenciação de lesões hepáticas malignas por estar ausente em fígados normais, na hepatite crônica ou na cirrose (YAMAUCHI et al. 2005).

O terceiro componente do painel de marcadores é a enzima GS, que cataliza a síntese de glutamina, a maior fonte de energia das células tumorais. Sua expressão aumenta gradualmente da LPN para o CHC inicial e avançado. Ela também é considerada alvo de sinalização da β -catenina (SAKAMOTO, 2009). De acordo com os resultados, não houve aumento de GS em nenhuma região particular do tecido que pudesse indicar a presença de uma lesão maligna. Isso pode estar relacionado com a ausência de β -catenina nuclear, referida anteriormente. Além disso, é provável que a expressão de GS na periferia dos nódulos regenerativos se deva à alta proliferação celular e as novas células deslocariam os hepatócitos, outrora pertencentes à zona 3, para as bordas dos nódulos. Este fenômeno aliado à cicatrização, que desorganiza a arquitetura hepática formando pontes de colágeno entre as estruturas, também modifica a disposição das células. A presença de GS foi observada em grupos de hepatócitos aprisionados, resultado da hepatite de interface; estas células estão submetidas a um estresse maior em razão da inflamação local, o que pode causar a sua alteração. Isto é reforçado pelo fato de que a maioria das regiões que expressaram GS estava localizada no interior de LPNs.

Numa análise posterior, verificamos que o percentual de dupla positividade para as três combinações de marcadores possíveis foi mais expressivo no T21 e que a combinação mais prevalente foi de HSP70 + GS. Tremosini et al. (2012) validaram a acurácia diagnóstica deste painel de marcadores com uma especificidade de 100% quando pelo menos dois deles (independentemente de quais) foram positivos. Contudo, estes marcadores também podem ser expressos em nódulos não malignos. Isto tem sido demonstrado com HSP70 e com GPC3, particularmente quando uma coloração fraca é classificada como positiva. No nosso caso, a

expressão de GPC3 foi muito baixa e o que consideramos como positivo talvez reflita o fenótipo maligno de algumas células que não necessariamente desenvolveriam tumor. Porquanto essas células não configuraram um nódulo propriamente dito elas poderiam ser removidas do tecido futuramente. Há que se ressaltar que os nódulos HSP70+ foram sempre GST-P+, caracterizando sua localização em LPNs. Entretanto, nem todas as LPNs foram HSP70+. Por esta razão, Tremosini et al. (2012) recomendam que o diagnóstico histológico do CHC deva ser feito por análise patológica convencional e o uso deste painel deve ser reservado para reforçar a suspeita de CHC, especialmente em biópsias com amostragem escassa ou para patologistas menos experientes. A expressão dos marcadores do painel imuno-histoquímico é mais indicada para estádios avançados da carcinogênese hepática e seu uso deve ser considerado em caso de lesões hepatocelulares morfológicamente atípicas, quando não se sabe se os nódulos são malignos ou apenas displásicos (DI TOMMASO et al., 2007).

A utilização desse painel de marcadores está recomendada no Guia de Práticas Clínicas da European Association for the Study of the Liver (EASL) e European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC) publicado em 2012. Este mesmo documento indica traçar o perfil de expressão gênica dos marcadores moleculares: GPC3, survivina e LYVE 1.

Conforme relatado anteriormente, a expressão tecidual de GPC3 foi baixa e fraca, muito embora a expressão gênica tenha mostrado que os tratamentos por 14 e 35 semanas produziram aumento nos níveis desse gene. De fato, o grupo T35 apresentou aumento significativo na sua expressão, concordando com o resultado da expressão tecidual, no qual este grupo teve 51% dos cortes analisados positivos.

Em se tratando da expressão gênica de survivina, nosso experimento apresentou resultados coerentes com os dados da proliferação celular em que o T14 apresentou maior atividade proliferativa. A expressão dessa proteína foi decrescente em relação ao tempo de tratamento com TAA e o mesmo comportamento foi observado quanto aos níveis de AFP. O aumento significativo para ambas, survivina e AFP, foi verificado no T14. A survivina é uma proteína inibidora de apoptose que contribui para a progressão tumoral favorecendo a proliferação (FABREGAT, 2009). A expressão de survivina correlaciona-se com os níveis de AFP, invasão microvascular, proliferação celular (Ki-67) e estágio tumoral. Ela é mais sensível que a GPC3, mas menos específica na detecção do CHC (NASSAR; COHEN; SIDDIQUI, 2009).

No último marcador do painel, o LYVE 1, analisado em nosso trabalho verificamos que a expressão gênica desse receptor foi menor nos grupos T14 e T21, o que está consoante

com a descrição da literatura. No entanto, foi hiper-regulado no grupo T35, ao contrário do esperado, já que este grupo apresentou cirrose mais severa e maior expressão gênica e tecidual de GPC3, considerada mais específica para lesões com potencial maligno. Este resultado poderia ser explicado pelo fato de que o LYVE 1, um receptor das células endoteliais de vasos linfáticos, é sub-regulado em alguns tumores como resultado da destruição desses vasos devido à invasão tumoral e esta sub-regulação é progressiva da cirrose para o CHC (LLOVET et al., 2006).

A análise geral aponta que no grupo T14 a expressão gênica de todos os marcadores moleculares foi condizente com os dados da literatura. Entretanto, o mesmo não se repetiu para a expressão dos marcadores teciduais, os quais foram mais expressos no T21. Com estes resultados percebe-se que a expressão gênica é acometida na fase mais inicial da cirrose provavelmente devido aos eventos de inflamação e proliferação provocados pela injúria tóxica que alteram o microambiente hepático. Todavia, o fenótipo celular será alterado apenas numa fase mais tardia, quando as fases de iniciação e promoção já puderem ser distinguidas.

7 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho nos permitem concluir que:

1. O modelo da TAA foi eficiente no desenvolvimento da cirrose hepática mesmo no período mais curto de 14 semanas;
2. Os efeitos da injúria por TAA sobre a morfologia hepática são cumulativos: quanto maior o tempo de administração da droga, mais severo é o quadro patológico, apresentando, inclusive, maiores alterações estruturais;
3. A ação carcinogênica da TAA foi confirmada pela presença de LPNs em todos os períodos avaliados tendo sido identificadas as fases de iniciação e promoção da hepatocarcinogênese, embora nenhum deles tenha atingido a fase de progressão;
4. A avaliação da hepatocarcinogênese através da análise das LPNs indicou que a o efeito de iniciação foi mais efetivo em 21 semanas de tratamento, visto que este período foi mais eficaz para produzir um maior número de lesões;
5. A TAA atuou como estímulo regenerativo aumentando sobremaneira a proliferação celular cujo pico se deu em 14 semanas, o que demonstra que as LPNs deste grupo estiveram mais propensas ao remodelamento;
6. No grupo T35 notaram-se as maiores lesões, em tamanhos típicos dos que ocorrem na promoção da hepatocarcinogênese; todavia, neste grupo as outras alterações estabilizaram-se alcançando um platô, com menor proliferação celular e menos apoptose, possivelmente devido à ausência de um agente promotor da carcinogênese;
7. Novos estudos utilizando agentes promotores como a TAA, aliados a adição de substâncias tóxicas que induzem a iniciação carcinogênica, poderão representar uma importante ferramenta para o estudo do câncer no fígado.

REFERÊNCIAS*

* De acordo com:
ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação:
referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

- ABDEL-HAMID, N. M. Premalignant variations in extracellular matrix composition in chemically induced hepatocellular carcinoma in rats. **J. Membr. Biol.**, v. 230, n. 3, p. 155-162, 2009.
- AKHTAR, T.; SHEIKH, N. An overview of thioacetamide-induced hepatotoxicity. **Toxin Rev.**, v. 32, n. 3, p. 43-46, 2013.
- AL-ATTAR, A. M. Hepatoprotective influence of vitamin C on thioacetamide-induced liver cirrhosis in Wistar male rats. **J. Pharmacol. Toxicol.**, v. 6, n. 3, p. 218-233, 2011.
- ALBANIS, E.; FRIEDMAN, S. L. Antifibrotic agents for liver disease. **Am. J. Transplant.**, v. 6, n. 1, p. 12-19, 2006.
- ALBERTS, B. et al. **Molecular biology of the cell**. 5th ed. New York: Garland Science, 2008. 1268 p.
- ALVARADO-MORA, M. V.; PINHO, J. R. Epidemiological update of hepatitis B, C and delta in Latin America. **Antivir. Ther.** v. 18, n. 3, p. 429-433, 2013.
- ARAVALLI, R. N. et al. Stem cell origins and animal models of hepatocellular carcinoma. **Dig. Dis. Sci.**, v. 55, n. 5, p. 1-50, 2010.
- ARAVALLI, R. N.; STEER, C. J.; CRESSMAN, E. N. Molecular mechanisms of hepatocellular carcinoma. **Hepatology**, v. 48, n. 6, p. 2047-2063, 2008.
- ARZUMANYAN, A.; REIS, H. M.; FEITELSON, M. A. Pathogenic mechanisms in HBV- and HCV-associated hepatocellular carcinoma. **Nat. Rev. Cancer.**, v. 13, p. 123-135, 2013.
- AUGUSTINE, M. M.; FONG, Y. Epidemiology and risk factors of biliary tract and primary liver tumors. **Surg. Oncol. Clin. N. Am.**, v. 23, n. 2, p. 171-188, 2014.
- AXIOVISION Rel. Version. 4.8.2. Mannheim: ZEISS. Software.
- BAKIRI, L.; WAGNER, E. F. Mouse models for liver cancer. **Mol. Oncol.**, v. 7, n. 2, p. 206-223, 2013.
- BANKS, W. J. **Histologia veterinária aplicada**. 2. ed. São Paulo: Manole, 1992. 629 p.
- BECKER, U. et al. Prediction of risk of liver disease by alcohol intake, sex, and age: a prospective population study. **Hepatology**, v. 23, p. 1025-1029, 1996.
- BEDOSSA, P.; PARADIS, V. Liver extracellular matrix in health and disease. **J. Pathol.**, v. 200, n. 4, p. 504-515, 2003.
- BELLAMY, C. Pathology of liver tumours. **Surgery**, v. 29, n. 12, p. 597-602, 2011.
- BELLENTANI, S. et al. Drinking habits as cofactors of risk for alcohol induced liver damage. The Dionysos Study Group. **Gut**, v. 41, p. 845-850, 1997.
- BERTOLA, A. et al. Mouse model of chronic and binge ethanol feeding (the NIAAA model). **Nat. Protoc.**, v. 8, n. 3, p. 627-637, 2013.

- BERTRAND, N.; LEROUX, J. C. The journey of a drug-carrier in the body: an anatomophysiological perspective. **J. Control. Release**, v. 161, n. 2, p. 152-163, 2012.
- BETTERMANN, K.; HOHENSEE, T.; HAYBAECK, J. Steatosis and steatohepatitis: complex disorders. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 15, n. 6, p. 9924-9944, 2014.
- BILZER, M.; ROGGEL, F.; GERBES, A. L. Role of Kupffer cells in host defense and liver disease. **Liver Int.**, v. 26, n. 10, p. 1175-1186, 2006.
- BLACHIER, M. et al. **European Association for the Study of the Liver**. The burden of liver disease in Europe. A review of available epidemiological data, 2013. Disponível em: <http://www.easl.eu/assets/application/files/54ae845caec619f_file.pdf>. Acesso em: 28 Aug. 2014.
- BODE, C.; BODE, J. C. Alcohol's role in gastrointestinal tract disorders. **Alcohol. Health Res. World**, v. 21, n. 1, p. 76-83, 1997.
- BOLDORINI, R. et al. Hepatic histology of patients with HIV infection and chronic hepatitis C treated with interferon. **J. Clin. Pathol.**, v. 50, n. 9, p. 735-740, 1997.
- BOLTJES, A. et al. The role of Kupffer cells in hepatitis B and hepatitis C virus infections. **J. Hepatol.**, v. 61, n. 3, p. 660-671, 2014.
- BOSETTI, C.; TURATI, F.; LA VECCHIA, C. Hepatocellular carcinoma epidemiology. **Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.**, v. 28, n. 5, p. 753-770, 2014.
- BRUIX, J.; GORES, G. J.; MAZZAFERRO, V. Hepatocellular carcinoma: clinical frontiers and perspectives. **Gut**, v. 63, n. 5, p. 844-855, 2014.
- BRUNSCHWIG, H. **Liber de arte distillandi de simplicibus. Das buch der rechten kunst zu distilieren die eintzige ding**. Strassburg: Jean Grüninger, 1500.
- BRUNT, E. M. et al. Pathology of the liver sinusoids. **Histopathology**, v. 64, n. 7, p. 907-920, 2014.
- BURSCH, W. et al. Apoptosis in stages of mouse hepatocarcinogenesis: failure to counterbalance cell proliferation and to account for strain differences in tumor susceptibility. **Toxicol. Sci.**, v. 85, n. 1, p. 515-529, 2005.
- CAPURRO, M. I. et al. Glypican-3 promotes the growth of hepatocellular carcinoma by stimulating canonical Wnt signaling. **Cancer Res.**, v. 65, n. 14, p. 6245-6254, 2005.
- CARDOZO, M. T. **Atividade quimiopreventiva do geraniol e β -ionona quando administrados isoladamente ou em associação a ratos durante a fase de promoção da hepatocarcinogênese**. 2007. 123 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.
- CARO, A. A.; CEDERBAUM, A. I. Inhibition of CYP2E1 catalytic activity in vitro by S-adenosyl-L-methionine. **Biochem. Pharmacol.**, v. 69, n. 7, p. 1081-1093, 2005.

CARPINO, G. et al. Role of hepatic progenitor cells in nonalcoholic fatty liver disease development: cellular cross-talks and molecular networks. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 14, n. 10, p. 20112-20130, 2013.

CARREIRA, C. M. et al. LYVE-1 is not restricted to the lymph vessels: expression in normal liver blood sinusoids and down-regulation in human liver cancer and cirrhosis. **Cancer Res.**, v. 61, n. 22, p. 8079-8084, 2001.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Alcohol and public health: alcohol related disease impact (**ARDI**). Center for Disease Control and Prevention, 2012.

CHAGAS, C. E. et al. Folic acid supplementation during early hepatocarcinogenesis: cellular and molecular effects. **Int. J. Cancer**, v. 129, n. 9, p. 2073-2082, 2011.

CHANG, O. et al. The cytological characteristics of small cell change of dysplasia in small hepatic nodules. **Oncol. Rep.**, v. 23, n. 5, p. 1229-1232, 2010.

CHILAKAPATI, J.; SHANKAR, K.; KORRAPATI, M. C.; HILL, R. A.; MEHENDALE, H. M. Saturation toxicokinetics of thioacetamide: Role in initiation of liver injury. **Drug Metab. Dispos.**, v. 33, n. 12, p. 1877-1885, 2005.

CHUMA, M. et al. Expression profiling in multistage hepatocarcinogenesis: identification of HSP70 as a molecular marker of early hepatocellular carcinoma. **Hepatology**, v. 37, n. 1, p. 198-207, 2003.

CLOSE, B. et al. Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 1. DGXI of the European Commission. **Lab. Anim.**, v. 30, n. 4, p. 293-316, 1996.

COLUMBANO, A. et al. Effects of cell proliferation and cell death (apoptosis and necrosis) on the early stages of rat hepatocarcinogenesis. **Carcinogenesis**, v. 17, n. 3, p. 395-400, 1996.

CRABB, D. W.; LIANGPUNSAKUL, S. Acetaldehyde generating enzyme systems: roles of alcohol dehydrogenase, CYP2E1 and catalase, and speculations on the role of other enzymes and processes. **Novartis Found. Symp.**, v. 285, p. 4-16, 2007.

CRAWFORD, J. M. Histologic findings in alcoholic liver disease. **Clin. Liver Dis.**, v. 16, n. 4, p. 699-716, 2012.

CRAWFORD, J. M. **Liver and biliary tract**. In: KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. Robbins and Cotran: pathologic basis of disease. 7th ed. Philadelphia: Elsevier, 2005. p. 877-937.

CURRY, M. P. Sofosbuvir and Ribavirin Prevent Recurrence of HCV Infection After Liver Transplantation: An Open-Label Study. **Gastroenterology**, v. 14, p. 1145-1147, 2014.

DAGLI, M. L. Z.; HERNANDEZ-BLAZQUEZ, F. J. Roles of gap junctions and connexins in non-neoplastic pathological processes in which cell proliferation is involved. **J. Membrane Biol.**, v. 218, n. 1-3, p. 79-91, 2007.

DANDRI, M.; LOCARNINI, S. New insight in the pathobiology of hepatitis B virus infection. **Gut**, v. 61, p. i6-i17, 2012. Supl. 1.

- DAVID, P. et al. Failure of liver cirrhosis induction by thioacetamide in Nagase analbuminaemic rats. **Lab. Anim.**, v. 36, n. 2, p. 158-164, 2002.
- DE MINICIS, S. et al. Liver carcinogenesis: rodent models of hepatocarcinoma and cholangiocarcinoma. **Dig. Liver Dis.**, v. 45, n. 6, p. 450-459, 2013.
- DEITRICH, R. A.; PETERSEN, D.; VASILIOU, V. Removal of acetaldehyde from the body. **Novartis Found. Symp.**, v. 285, p. 23-40, 2007.
- DELEVE, L. D. Liver sinusoidal endothelial cells and liver regeneration. **J. Clin. Invest.**, v. 123, n. 5, p. 1861-1866, 2013.
- DI TOMMASO, L. et al. Diagnostic value of HSP70, glypican 3, and glutamine synthetase in hepatocellular nodules in cirrhosis. **Hepatology**, v. 45, n. 3, p. 725-734, 2007.
- DI TOMMASO, L. et al. The application of markers (HSP70 GPC3 and GS) in liver biopsies is useful for detection of hepatocellular carcinoma. **J. Hepatol.**, v. 50, n. 4, p. 746-754, 2009.
- DONATO F. et al. Alcohol and hepatocellular carcinoma the effect of lifetime intake and hepatitis virus infections in men and women. **Am. J. Epidemiol.**, v. 155, n. 4, p. 323-331, 2002.
- DREBBER, U.; DIENES, H. P. Diagnosis and differential diagnosis of hepatocellular carcinoma. **Pathologe**, v. 27, n. 4, p. 294-299, 2006.
- DUARTE, M. I. S. et al. Human visceral leishmaniasis expresses Th1 pattern in situ liver lesions. **J. Infect.**, v. 57, n. 4, p. 332-337, 2008.
- DUDDEMPUDI, A. T.; BERNSTEIN, D. E. Hepatitis B and C. **Clin. Geriatr. Med.**, v. 30, n. 1, p. 149-167, 2014.
- DUSEJA, A.; CHALASANI, N. Epidemiology and risk factors of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). **Hepatol. Int.**, v. 7, p. S755-S764, 2013. Supl. 2.
- EPSTEIN, M. Alcohol's impact on kidney function. **Alcohol Health Res. World**, v. 21, n. 1, p. 84-92, 1997.
- ERIKSSON, C. J. The role of acetaldehyde in the actions of alcohol (update 2000). **Alcohol. Clin. Exp. Res.**, v. 25, p. 15S-32S, 2001. Supl. 5.
- FABREGAT, I. Dysregulation of apoptosis in hepatocellular carcinoma cells. **World J. Gastroenterol.**, v. 15, n. 5, p. 513-520, 2009.
- FARAZI, P. A.; DEPINHO, R. A. Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment. **Nat. Rev. Cancer**, v. 6, n. 9, p. 674-687, 2006.
- FAUSTO, N.; CAMPBELL, J. S. Liver Regeneration. In: ARIAS, I. et al. **The liver: biology and pathobiology**. 5th ed. Chichester: Wiley-Blackwell, 2009. p. 549-565.
- FERENCI P. et al. World Gastroenterology Organisation Guidelines and Publications Committee. World Gastroenterology Organisation Guideline. Hepatocellular carcinoma (HCC): a global perspective. **J. Gastrointest. Liver Dis.**, v. 19, n. 3, p. 311-317, 2010.

- FERLAY J. et al. GLOBOCAN 2012 v 1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: **IARC CancerBase No. 11** [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2013. Disponível em: <http://globocan.iarc.fr>. Acesso em: 22 Aug. 2014.
- FERNANDEZ-CHECA, J. C.; KAPLOWITZ, N. Hepatic mitochondrial glutathione: transport and role in disease and toxicity. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 204, n. 3, p. 263-273, 2005.
- FIEL, M. I. Pathology of chronic hepatitis B and chronic hepatitis C. **Clin. Liver Dis.**, v. 14, n. 4, p. 555-575, 2010.
- FIELDING, C. M.; ANGULO, P. Hepatic steatosis and steatohepatitis: Are they really two distinct entities? **Curr. Hepatol. Rep.**, v. 13, n. 2, p. 151-158, 2014.
- FONSECA, J. C. Natural history of chronic hepatitis B. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 40, n. 6, p. 672-677, 2007.
- FONTANA, L. et al. Serum amino acid changes in rats with thioacetamide-induced liver cirrhosis. **Toxicology**, v. 106, n. 1-3, p. 197-206, 1996.
- FORBES, S. J.; PAROLA, M. Liver fibrogenic cells. **Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.**, v. 25, n. 2, p. 207-217, 2011.
- FORNER, A.; LLOVET, J. M.; BRUIX, J. Hepatocellular carcinoma. **Lancet**, v. 379, n. 9822, p. 1245-1255, 2012.
- FRENCH, S. W.; MIYAMOTO, K.; TSUKAMOTO, H. Ethanol-induced hepatic fibrosis in the rat: role of the amount of dietary fat. **Alcohol. Clin. Exp. Res.**, v. 10, p. 13S-19S, 1986. Supl. 6.
- FREZZA, M. et al. High blood alcohol levels in women. The role of decreased gastric alcohol dehydrogenase activity and first-pass metabolism. **N. Engl. J. Med.**, v. 322, p. 95-99, 1990.
- FRIEDMAN, S. L. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. **Physiol. Rev.**, v. 88, n. 1, p. 125-172, 2008.
- GALAMBOS, J. T. Alcoholic liver disease: fatty liver, hepatitis, and cirrhosis. In: BERK, J. E. **Bockus Gastroenterology**. 4th ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1985. 2985 p.
- GANEM, D.; PRINCE, A. M. Hepatitis B virus infection--natural history and clinical consequences. **N. Engl. J. Med.**, v. 350, n. 11, p. 1118-1129, 2004.
- GAO, B.; BATALLER, R. Alcoholic liver disease: pathogenesis and new therapeutic targets. **Gastroenterology**, v. 141, n. 5, p. 1572-1585, 2011.
- GAUDIO, E. et al. New insights into liver stem cells. **Dig. Liver Dis.**, v. 41, n. 7, p. 455-462, 2009.
- GAYOTTO, L. C. C.; ALVES, V. A. F. **Doenças do fígado e vias biliares**. São Paulo: Atheneu, 2001. v. 1. 664 p.

- GEORGE, J. et al. Dimethylnitrosamine-induced liver injury in rats: the early deposition of collagen. **Toxicology**, v. 156, n. 2-3, p. 129-138, 2001.
- GEORGES, P. C. et al. Increased stiffness of the rat liver precedes matrix deposition: implications for fibrosis. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, v. 293, n. 6, p. 1147-1154, 2007.
- GERDES, J. et al. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. **Int. J. Cancer**, v. 31, n. 1, p. 13-20, 1983.
- GHANY, M. G. et al. American Association for the Study of Liver Diseases. Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C: an update. **Hepatology**, v. 49, n. 4, p. 1335-1374, 2009.
- GOMES, M. A. et al. Hepatocellular carcinoma: epidemiology, biology, diagnosis, and therapies. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 59, n. 5, p. 514-524, 2013.
- GRESSNER, O. A; GAO, C. Monitoring fibrogenic progression in the liver. **Clin. Chim. Acta**, v. 433, p. 111-122, 2014.
- GROSS-STEINMEYER, K.; EATON, D. L. Dietary modulation of the biotransformation and genotoxicity of aflatoxin B(1). **Toxicology**, v. 299, n. 2-3, p. 69-79, 2012.
- GUERRA, R. R. et al. A novel chronic cirrhosis TAA-induced model in rats. **Braz. J. Vet. Pathol.**, v. 3, n. 1, p. 9-16, 2010.
- GUERRA, R. R. et al. Modulation of extracellular matrix by nutritional hepatotrophic factors in thioacetamide-induced liver cirrhosis in the rat. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 42, n. 11, p. 1027-1034, 2009.
- GUICCIARDI, M. E. et al. Apoptosis and necrosis in the liver. **Compr. Physiol.**, v. 3, n. 2, p. 977-1010, 2013.
- GUIDO, M.; MANGIA, A.; FAA, G. Chronic viral hepatitis: the histology report. **Dig. Liver Dis.**, v. 43, p. S331-S432, 2011. Supl. 4.
- HAJOVSKY, H. et al. Metabolism and toxicity of thioacetamide and thioacetamide S-oxide in rat hepatocytes. **Chem. Res. Toxicol.**, v. 25, n. 9, p. 1955-1963, 2012.
- HANNIVOORT, R. A.; HERNANDEZ-GEA, V.; FRIEDMAN, S. L. Genomics and proteomics in liver fibrosis and cirrhosis. **Fibrogenesis Tissue Repair**, v. 5, n. 1, p. 1-14, 2012.
- HAYCOCK, P. C. Fetal alcohol spectrum disorders: the epigenetic perspective. **Biol. Reprod.**, v. 81, n. 4, p. 607-617, 2009.
- HELLERBRAND, C. Hepatic stellate cells – the pericytes in the liver. **Pflugers Archiv**, v. 465, n. 6, p. 775-778, 2013.
- HERLIHY, B.; MAEBIUS, N. K. **Anatomia e fisiologia do corpo humano saudável e enfermo**. São Paulo: Manole, 2002. 555 p.

- HERNANDEZ-GEA, V. et al. Role of the microenvironment in the pathogenesis and treatment of hepatocellular carcinoma. **Gastroenterology**, v. 144, n. 3, p. 512-527, 2013.
- HOSHIDA, Y.; FUCHS, B. C.; TANABE, K. K. Prevention of hepatocellular carcinoma: potential targets, experimental models, and clinical challenges. **Curr. Cancer Drug Targets**, v. 12, n. 9, p. 1129-1159, 2012.
- HOU, J.; LIU, Z.; GU, F. Epidemiology and Prevention of Hepatitis B Virus Infection. **Int. J. Med. Sci.**, v. 2, n. 1, p. 50-57, 2005.
- HUANG, K. W. et al. Dual therapeutic effects of interferon-alpha gene therapy in a rat hepatocellular carcinoma model with liver cirrhosis. **Mol. Ther.**, v. 16, n. 10, p. 1681-1687, 2008.
- HVIDTFELDT, U. A. et al. Incidence of cardiovascular and cerebrovascular disease in Danish men and women with a prolonged heavy alcohol intake. **Alcohol. Clin. Exp. Res.**, v. 32, n. 11, p. 1920-1924, 2008.
- IMAGE J. Version 1.45s. Bethesda: NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH. Software.
- INGAWALE, D. K.; MANDLIK, S. K.; NAIK, S. R. Models of hepatotoxicity and the underlying cellular, biochemical and immunological mechanism(s): a critical discussion. **Environ. Toxicol. Pharmacol.**, v. 37, n. 1, p. 118-133, 2014.
- INSTITUTO NACIONAL DE CâNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA - INCA. Coordenação Geral de Ações Estratégicas. Coordenação de Prevenção e Vigilância. **Estimativa 2012**: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2011. 118 p.
- ISHAK, K. et al. H. Histological grading and staging of chronic hepatitis. **J. Hepatol.**, v. 22, n. 6, p. 696-699, 1995.
- IVANOV, A. V. et al. HCV and oxidative stress in the liver. **Viruses**, v. 5, n. 2, p. 439-469, 2013.
- IZUMI, S.; NAKAMURA, S.; MANO, S. Large intrahepatic cholangiocarcinoma with tumor infiltrative lymphocytes and autoimmune hepatitis-like features. **Case Rep. Gastroenterol.**, v. 4, n. 1, p. 46-51, 2010.
- JANG, J. H. et al. Reevaluation of experimental model of hepatic fibrosis induced by hepatotoxic drugs: an easy, applicable, and reproducible model. **Transplant. Proc.**, v. 40, n. 8, p. 2700-2703, 2008.
- JIA, H. L. et al. Gene expression profiling reveals potential biomarkers of human hepatocellular carcinoma. **Clin. Cancer Res.**, v. 13, n. 4, p. 1133-1139, 2007.
- JOHNSON, N.; LEONE, F. **Statistics and experimental design in engineering and physical sciences**. 2nd ed. New York: John Wiley, 1977. 512 p.
- JORDAAN, G. P.; EMSLEY, R. Alcohol-induced psychotic disorder: a review. **Metab. Brain Dis.**, v. 29, n. 2, p. 231-243, 2014.

- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013. 556 p.
- KATOONIZADEH, A.; POUSTCHI, H.; MALEKZADEH, R. Hepatic progenitor cells in liver regeneration: current advances and clinical perspectives. **Liver Int.**, v. 34, n. 10, p. 1464-1472, 2014.
- KAUSHIK, V. et al. Diverse Sources of Hepatotoxicity in Rats - A Review. **Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.**, v. 21, n. 41, p. 254-259, 2013.
- KAUSHIK, V. et al. Diverse Sources of Hepatotoxicity in Rats – A Review. **Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.**, v. 21, n. 41, 254-259, 2013.
- KAWAI, H. et al. Behavioral and biochemical characterization of rats treated chronically with thioacetamide: proposal of an animal model for hepatic encephalopathy associated with cirrhosis. **J. Toxicol. Sci.**, v. 37, n. 6, p. 1165-1175, 2012.
- KENSLER, T. W. et al. Aflatoxin: a 50-year odyssey of mechanistic and translational toxicology. **Toxicol. Sci.**, v. 120, p. S28-S48, 2011. Supl. 1.
- KEW, M. C. The role of cirrhosis in the etiology of hepatocellular carcinoma. **J. Gastrointest. Cancer**, v. 45, n. 1, p. 12-21, 2014.
- KIERSZENBAUM, A. L.; TRES, L. L. **Histologia e biologia celular: uma introdução à patologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012. 720 p.
- KIM, Y.; SILLS, R. C.; HOULE, C. D. Overview of the molecular biology of hepatocellular neoplasms and hepatoblastomas of the mouse liver. **Toxicol. Pathol.**, v. 33, n. 1, p. 175-180, 2005.
- KNODELL, R. G. et al. Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis. **Hepatology**, v. 1, n. 5, p. 431-435, 1981.
- KNOLLE, P. A.; GERKEN, G. Local control of the immune response in the liver. **Immunol. Rev.**, v. 174, p. 21-34, 2000.
- KOGURE, K. et al. A comparative study of the anatomy of rat and human livers. **J. Hepatobiliary Pancreat. Surg.**, v. 6, n. 2, p. 171-175, 1999.
- KONISHI, M.; ISHII, H. Role of microsomal enzymes in development of alcoholic liver diseases. **J. Gastroenterol. Hepatol.**, v. 22, p. S7-S10, 2007. Supl. 1. Published erratum appears in J Gastroenterol Hepatol., v. 23, n. 3, p. 501-502, 2008.
- KROES, R.; WILLIAMS, G. M.; WEISBURGER, J. H. Early appearance of serum-fetoprotein as a function of dosage of various hepatocarcinogens. **Cancer Res.**, v. 33, n. 3, p. 613-617, 1973.
- KRUITWAGEN, H. S.; SPEE, B.; SCHOTANUS, B. A. Hepatic progenitor cells in canine and feline medicine: potential for regenerative strategies. **BMC Vet. Res.**, v. 10, n. 137, p. 1-15, 2014.

- KUCERA, O.; CERVINKOVA, Z. Experimental models of non-alcoholic fatty liver disease in rats. **World J. Gastroenterol.**, v. 20, n. 26, p. 8364-8376, 2014.
- LANE, B. P.; LIEBER, C. S. Ultrastructural alterations in human hepatocytes following ingestion of ethanol with adequate diets. **Am. J. Pathol.**, v. 49, n. 4, p. 593-603, 1966.
- LAUTT, W. W. (Ed.). **Hepatic circulation: physiology and pathophysiology**. San Rafael, CA.: Morgan & Claypool Life Sciences, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK53073/?report=reader>>. Acesso em: 11 Set. 2014.
- LE COUTEUR, D. G. et al. Old age and the hepatic sinusoid. **Anat. Rec.**, v. 291, n. 6, p. 672-683, 2008.
- LEDDA-COLUMBANO, G. M. et al. Induction of two different modes of cell death, apoptosis and necrosis, in rat liver after a single dose of thioacetamide. **Am. J. Pathol.**, v. 139, n. 5, p. 1099-1109, 1991.
- LEE, U. E.; FRIEDMAN, S. L. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. **Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.**, v. 25, n. 2, p. 195-206, 2011.
- LI, F. et al. Apoptotic cells activate the “Phoenix Rising” pathway to promote wound healing and tissue regeneration. **Sci. Signal.**, v. 3, n. 110, p. 1-10, 2010.
- LI, X.; BENJAMIN, I. S.; ALEXANDER, B. Reproducible production of thioacetamide-induced macronodular cirrhosis in the rat with no mortality. **J. Hepatol.**, v. 36, n. 4, p. 488-493, 2002.
- LI, Y.; TANG, Z. Y.; HOU, J. X. Hepatocellular carcinoma: insight from animal models. **Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.**, v. 9, n. 1, p. 32-43, 2011.
- LIBBRECHT, L. et al. Glypican-3 expression distinguishes small hepatocellular carcinomas from cirrhosis, dysplastic nodules, and focal nodular hyperplasia-like nodules. **Am. J. Surg. Pathol.**, v. 30, n. 11, p. 1405-1411, 2006.
- LIBBRECHT, L.; DESMET, V.; ROSKAMS, T. Preneoplastic lesions in human hepatocarcinogenesis. **Liver Int.**, v. 25, n. 1, p. 16-27, 2005.
- LIEBER, C. S.; DECARLI, L. M.; SORRELL, M. F. Experimental methods of ethanol administration. **Hepatology**, v. 10, n. 4, p. 501-510, 1989.
- LIEDTKE, C. et al. Experimental liver fibrosis research: update on animal models, legal issues and translational aspects. **Fibrogenesis Tissue Repair**, v. 6, n. 19, 2013.
- LIM Y. S.; KIM, W. R. The global impact of hepatic fibrosis and end-stage liver disease. **Clin. Liver Dis.**, v. 12, n. 4, p. 733-746, 2008.
- LIM, I. K. Spectrum of molecular changes during hepatocarcinogenesis induced by DEN and other chemicals in Fischer 344 male rats. **Mech. Ageing Dev.**, v. 123, n. 12, p. 1665-1680, 2002.

- LIMA, T. C. **Cirrose hepática induzida por tioacetamida**: estudo do modelo por injeção intraperitoneal a longo prazo em ratas Wistar. 2008. 140 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.
- LIMA, T. C. et al. Modelo de inducción de cirrosis hepática en ratas tioacetamida: nuevas perspectivas. **Int. J. Morphol.**, v. 26, n. 3, p. 764, 2008.
- LIMA-PORTELA, T. C. et al. Hepatocarcinogenesis in a cirrhotic microenvironment: experimental model for the study of human hepatocellular carcinoma. **Virchows Archiv. The European Journal of Pathology**, v. 463, p. 287, 2013. Apresentado no European Congress of Pathology, 25, 2013, Lisboa.
- LINDEMAN, B.; SKARPEN, E.; HUITFELDT, H.S. Stress protein expression in rat liver during tumour promotion: induction of heat-shock protein 27 in hepatocytes exposed to 2-acetylaminofluorene. **Carcinogenesis**, v. 19, n. 9, p. 1559-1563, 1998.
- LIU Y. et al. Animal models of chronic liver diseases. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, v. 304, n. 5, p. G449-G468, 2013.
- LIU Y. et al. Population attributable risk of aflatoxin-related liver cancer: systematic review and meta-analysis. **Eur. J. Cancer**, v. 48, n. 14, p. 2125-2136, 2012.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.
- LLOVET, J. M. et al. A molecular signature to discriminate dysplastic nodules from early hepatocellular carcinoma in HCV cirrhosis. **Gastroenterology**, v. 131, n. 6, p. 1758-1767, 2006.
- LO, R. C.; NG, I. O. Hepatocellular tumors: immunohistochemical analyses for classification and prognostication. **Chin. J. Cancer Res.**, v. 23, n. 4, p. 245-253, 2011.
- LOWES, K. N. et al. Oval cell numbers in human chronic liver diseases are directly related to disease severity. **Am. J. Pathol.**, v. 154, n. 2, p. 537-541, 1999.
- LU, Y.; CEDERBAUM, A. I. CYP2E1 and oxidative liver injury by alcohol. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 44, n. 5, p. 723-738, 2008.
- LUCAS, D. L. et al. Alcohol and the cardiovascular system: research challenges and opportunities. **J. Am. Coll. Cardiol.**, v. 45, n. 12, p. 1916-1924, 2005.
- LUDWIG, J. et al. Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. **Mayo Clin. Proc.**, v. 55, n. 7, p. 434-438, 1980.
- MACSWEEN, R. N.; BURT, A. D. Histologic spectrum of alcoholic liver disease. **Semin. Liver Dis.**, v. 6, n. 3, p. 221-232, 1986.
- MALARKEY, D. E. et al. New insights into functional aspects of liver morphology. **Toxicol. Pathol.**, v. 33, n. 1, p. 27-34, 2005.

- MARIN, S. et al. Mycotoxins: occurrence, toxicology, and exposure assessment. **Food Chem. Toxicol.**, v. 60, p. 218-237, 2013.
- MARTINS, P. N.; NEUHAUS, P. Surgical anatomy of the liver, hepatic vasculature and bile ducts in the rat. **Liver Int.**, v. 27, n. 3, p. 384-392, 2007.
- MATHEWS S. et al. Animals models of gastrointestinal and liver diseases Animal models of alcohol-induced liver disease: pathophysiology, translational relevance, and challenges. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, v. 306, n. 10, p. G819-G823, 2014.
- MATSUDA Y. et al. Mycotoxins are conventional and novel risk biomarkers for hepatocellular carcinoma. **World J. Gastroenterol.**, v. 19, n. 17, p. 2587-2590, 2013.
- MATSUI, O. et al. Hepatocellular nodules in liver cirrhosis: hemodynamic evaluation (angiography-assisted CT) with special reference to multi-step hepatocarcinogenesis. **Abdom. Imaging**, v. 36, n. 3, p. 264-272, 2011.
- MAYER, M. P.; BUKAU, B. Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 62, n. 6, p. 670-684, 2005.
- MAZZANTINI, R. P.; DE CONTI, A.; MORENO, F. S. Persistent and remodeling hepatic preneoplastic lesions present differences in cell proliferation and apoptosis, as well as in p53, Bcl-2 and NF-kB pathways. **J. Cell. Biochem.**, v. 103, n. 2, p. 538-546, 2008.
- MCCULLOUGH, J. A.; O'SHEA, R. S.; DASARATHY, S. Diagnosis and management of alcoholic liver disease. **J. Dig. Dis.**, v. 12, n. 4, p. 257-262, 2011.
- MCMAHON, B. J. Chronic hepatitis B virus infection. **Med. Clin. North. Am.**, v. 98, n. 1, p. 39-54, 2014.
- MOUDGIL, V. et al. A review of molecular mechanisms in the development of hepatocellular carcinoma by aflatoxin and hepatitis B and C viruses. **J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.**, v. 32, n. 2, p. 165-175, 2013.
- NAKATANI, K. et al. Pit cells as liver-associated natural killer cells: morphology and function. **Med. Electron Microsc.**, v. 37, n. 1, p. 29-36, 2004.
- NASSAR, A.; COHEN, C.; SIDDIQUI, M. T. Utility of glypican-3 and survivin in differentiating hepatocellular carcinoma from benign and preneoplastic hepatic lesions and metastatic carcinomas in liver fine-needle aspiration biopsies. **Diagn. Cytopathol.**, v. 37, n. 9, p. 629-635, 2009.
- NEJAK-BOWEN, K. N.; MONGA, S. P. Beta-catenin signaling, liver regeneration and hepatocellular cancer: sorting the good from the bad. **Semin. Cancer Biol.**, v. 21, n. 1, p. 44-58, 2011.
- NEWELL, P. et al. Experimental models of hepatocellular carcinoma. **J. Hepatol.**, v. 48, n. 5, p. 858-879, 2008.
- NISHIKAWA, H.; OSAKI, Y. Clinical significance of occult hepatitis B infection in progression of liver disease and carcinogenesis. **J. Cancer**, v. 4, n. 6, p. 473-480, 2013.

- NOUJAIM, H. M. et al. Clinical and histopathologic factors associate with ischemia/reperfusion injury and outcome of macrosteatotic grafts in human liver transplantation. **Transplantation**, v. 90, p. 577, 2010. Supl. 2. Apresentado no International Congress of The Transplantation Society, 23, 2010, Vancouver.
- O`GRADY, J. C.; SCHALM, S. W.; WILLIAMS, R. Acute liver failure: redefining the syndromes. **Lancet**, v. 342, n. 8866, p. 273-275, 1993.
- OGAWA, K. Molecular pathology of early stage chemically induced hepatocarcinogenesis. **Pathol. Int.**, v. 59, n. 9, p. 605-622, 2009.
- OO, Y. H.; SHETTY, S.; ADAMS, D. H. The role of chemokines in the recruitment of lymphocytes to the liver. **Dig. Dis.**, v. 28, n. 1, p. 31-44, 2010.
- PAGE, A. J. et al. Hepatocellular carcinoma: diagnosis, management, and prognosis. **Surg. Oncol. Clin. N. Am.**, v. 23, n. 2, p. 289-311, 2014.
- PANNORAMIC VIEWER. Version. 1.15.1. Budapeste: 3DHISTECH. Software.
- PARK, Y. N. et al. Apoptosis and proliferation in hepatocarcinogenesis related to cirrhosis. **Cancer**, v. 92, n. 11, p. 2733-2738, 2001.
- PITOT, H. C. Adventures in hepatocarcinogenesis. **Annu. Rev. Pathol.**, v. 2, p. 1-29, 2007.
- PITOT, H. C. Pathways of progression in hepatocarcinogenesis. **Lancet**, v. 358, n. 9285, p. 859-860, 2001.
- PITOT, H. C.; DRAGAN, Y. P. Facts and theories concerning the mechanisms of carcinogenesis. **FASEB J.**, v. 5, n. 9, p. 2280-2286, 1991.
- RAMAIAH, S. K.; APTE, U.; MEHENDALE, H. M. Cytochrome P4502E1 induction increases thioacetamide liver injury in diet-restricted rats. **Drug Metab. Dispos.**, v. 29, n. 8, p. 1088-1095, 2001.
- ROBERTS, R. A. et al. Role of the Kupffer cell in mediating hepatic toxicity and carcinogenesis. **Toxicol. Sci.**, v. 96, n. 1, p. 2-15, 2007.
- RONCALLI, M. et al. Liver precancerous lesions and hepatocellular carcinoma: the histology report. **Dig. Liver Dis.**, v. 43, p. 361-372, 2011. Suplemento 4.
- ROSKAMS, T. Anatomic pathology of hepatocellular carcinoma: impact on prognosis and response to therapy. **Clin. Liver Dis.**, v. 15, n. 2, p. 245-259, 2011.
- ROSKAMS, T. Relationships among stellate cell activation, progenitor cells, and hepatic regeneration. **Clin. Liver Dis.** v. 12, n. 4, p. 853-860, 2008.
- ROSKAMS, T.; KATOONIZADEH, A.; KOMUTA, M. Hepatic progenitor cells: an update. **Clin. Liver Dis.**, v. 14, n. 4, p. 705-718, 2010.
- SAAD-HUSSEIN, A. et al. Carcinogenic effects of aflatoxin B1 among wheat handlers. **Int. J. Occup. Environ. Health**. v. 20, n. 3, p. 215-219, 2014.

- SAFTOIU, A. Immunohistochemical assessment of proliferating cell nuclear antigen in primary hepatocellular carcinoma and dysplastic nodules. **J. Cell. Mol. Med.**, v. 7, n. 4, p. 436-446, 2003.
- SAKAMOTO, M. Early HCC: diagnosis and molecular markers. **J. Gastroenterol.**, v. 44, p. 108-111, 2009. Supl. 19.
- SALOMAO, M.; MCMILLEN, E.; LEFKOWITCH, J. H. Recent advances in the classification of hepatocellular carcinoma. **Diagn. Histopathol.**, v. 18, n. 1, p. 37-45, 2011.
- SARIN, S. K.; KUMAR, M. Natural history of HCV infection. **Hepatol. Int.**, v. 6, n. 4, p. 684-695, 2012.
- SATOH, K. et al. Purification, induction, and distribution of placental glutathione transferase: a new marker enzyme for preneoplastic cells in the rat chemical hepatocarcinogenesis. **PNAS**, v. 82, n. 12, p. 3964-3968, 1985.
- SAWAKI, M. et al. Chronic liver injury promotes hepatocarcinogenesis of the LEC rat. **Carcinogenesis**, v. 19, n. 2, p. 331-335, 1998.
- SCHAFF, Z.; KOVALSZKY, I.; LOTZ, G.; KISS, A. Hepatocellular carcinoma – from macroscopy to molecular pathology. **Orvosi Hetilap**, v. 151, n. 24, 982-989, 2010.
- SCHATTENBERG, J. M.; GALLE, P. R. Animal models of non-alcoholic steatohepatitis: of mice and man. **Dig. Dis.**, v. 28, n. 1, p. 247-254, 2010.
- SCHULTE-HERMANN, R. et al. Cell proliferation and apoptosis in normal liver and preneoplastic foci. **Environ. Health Persp.**, v. 101, p. 87-90, 1993. Supl. 5.
- SCHUPPAN, D.; AFDHAL, N. H. Liver cirrhosis. **Lancet**, v. 371, n. 9615, p. 838-851, 2008.
- SCHWARTZ, J. M.; REINUS, J. F. Prevalence and natural history of alcoholic liver disease. **Clin. Liver Dis.**, v. 16, n. 4, p. 659-666, 2012.
- SEITZ, H. K.; STICKEL, F. Risk factors and mechanisms of hepatocarcinogenesis with special emphasis on alcohol and oxidative stress. **Biol. Chem.**, v. 387, n. 4, p. 349-360, 2006.
- SHAFIZADEH, N.; KAKAR, S. Diagnosis of well-differentiated hepatocellular lesions: role of immunohistochemistry and other ancillary techniques. **Adv. Anat. Pathol.**, v. 18, n. 6, p. 438-445, 2011.
- SHEEHAN, D. et al. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. **Biochem. J.**, v. 360, n. 1, p. 1-16, 2001.
- SHERMAN, M. Hepatocellular carcinoma: epidemiology, surveillance, and diagnosis. **Semin. Liver Dis.**, v. 30, n. 1, p. 3-16, 2010.
- SILVA, E. A. **Avaliação morfológica e molecular pós-tratamento com fatores hepatotróficos, da cirrose hepática induzida em ratas pela tiocetamida: análise a curto e longo prazo.** 2011. 180 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

- SINGH, R. et al. Different models of hepatotoxicity and related liver diseases: a review. **IRJP**, v. 3, n. 7, p. 86-95, 2012.
- SOLT, D.; FARBER, E. New principle for the analysis of chemical carcinogenesis. **Nature**, v. 263, p. 701-703, 1976.
- TAKAHASHI, Y.; SOEJIMA, Y.; FUKUSATO, T. Animal models of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. **World J. Gastroenterol.**, v. 18, n. 19, p. 2300-2308, 2012.
- TAN, A. et al. Viral hepatocarcinogenesis: from infection to cancer. **Liver Int.**, v. 28, n. 2, p. 175-188, 2008.
- TEIXEIRAI, M. S. et al. Hiperplasia nodular focal do fígado: apresentação de um caso e revisão da literatura. **Radiol. Bras.**, v. 40, n. 4, 2007.
- TELI, M. R. et al. Determinants of progression to cirrhosis or fibrosis in pure alcoholic fatty liver. **Lancet**, v. 346, n. 8981, p. 987-990, 1995.
- THAN, N. N.; NEWSOME, P. N. Stem cells for liver regeneration. **QJM**, v. 107, n. 6, 417-421, 2014.
- THOOLEN, B. et al. Comparative histomorphological review of rat and human hepatocellular proliferative lesions. **J. Toxicol. Pathol.**, v. 25, n. 3, 189-199, 2012.
- TILG, H.; MOSCHEN, A. R. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis. **Hepatology**, v. 52, n. 5, p. 1836-1846, 2010.
- TOVAR, V.; VILLANUEVA, A.; LLOVET, J. M. Biología celular y genética en el cáncer de hígado. **Gastroent. Hepat. Barc.**, v. 30, n. 6, p. 360-369, 2007.
- TRABER, P. G. et al. Regression of fibrosis and reversal of cirrhosis in rats by galectin inhibitors in thioacetamide-induced liver disease. **PLoS One**, v. 8, n. 10, p. e753-e761, 2013.
- TREMOSINI, S. et al. Prospective validation of an immunohistochemical panel (glypican 3, heat shock protein 70 and glutamine synthetase) in liver biopsies for diagnosis of very early hepatocellular carcinoma. **Gut**, v. 61, n. 10, p. 1481-1497, 2012.
- TSAMANDAS, A. C. et al. Oval cell proliferation in cirrhosis in rats: an experimental study. **Hepatol. Res.**, v. 37, n. 9, p. 755-764, 2007.
- TSUKAMOTO, H. et al. Experimental liver cirrhosis induced by alcohol and iron. **J. Clin. Invest.**, v. 96, n. 1, p. 620-630, 1995.
- TU, T. et al. Novel aspects of the liver microenvironment in hepatocellular carcinoma pathogenesis and development. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 15, n. 6, p. 9422-9458, 2014.
- TÚNEZ, I. et al. Hepato- and neurotoxicity induced by thioacetamide: protective effects of melatonin and dimethylsulfoxide. **Pharmacol. Res.**, v. 52, n. 3, p. 223-228, 2005.
- UCHIDA, T. et al. Alcoholic foamy degeneration--a pattern of acute alcoholic injury of the liver. **Gastroenterology**, v. 84, n. 4, p. 683-692, 1983.

- UEHARA, T. et al. Molecular mechanisms of fibrosis-associated promotion of liver carcinogenesis. **Toxicol. Sci.**, v. 132, n. 1, p. 53-63, 2013.
- VELOSA, J. Lesões precursoras de cancro do fígado. **J. Port. Gastreterol.**, v. 18, n. 6, p. 285-297, 2011.
- VERTEMATI, M. et al. Morphometric analysis of hepatocellular nodular lesions in HCV cirrhosis. **Pathol. Res. Pract.**, v. 208, n. 4, p. 240-244, 2012.
- WALLACE, M. C.; FRIEDMAN, S. L. Hepatic fibrosis and the microenvironment: fertile soil for hepatocellular carcinoma development. **Gene Expr.**, v. 16, n. 2, p. 77-84, 2014.
- WANG, T. et al. Potentiation of thioacetamide liver injury in diabetic rats is due to induced CYP2E1. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 294, n. 2, p. 473-479, 2000.
- WANG, Y. et al. Hepatic stellate cells, liver innate immunity, and hepatitis C virus. **J. Gastroenterol. Hepatol.**, v. 28, p. 112-115, 2013. Supl. 1.
- WILLIAMS, M. J.; CLOUSTON, A. D.; FORBES, S. J. Links between hepatic fibrosis, ductular reaction, and progenitor cell expansion. **Gastroenterology**, v. 146, n. 2, p. 349-356, 2014.
- WOOD, G. A.; KORKOLA, K. E.; ARCHER, M. C. Tissue-specific resistance to cancer development in the rat: phenotypes of tumor-modifier genes. **Carcinogenesis**, v. 23, n. 1, p. 1-9, 2002.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Global status report on alcohol**. 2011.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Hepatitis B vaccines. **Wkly Epidemiol. Rec.**, v. 84, n. 40, p. 405-419, 2009.
- WREE, A. et al. From NAFLD to NASH to cirrhosis-new insights into disease mechanisms. **Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.**, v.10, n. 11, p. 627-636, 2013.
- XU, H. et al. Vascular endothelial growth factor attenuates hepatic sinusoidal capillarization in thioacetamide-induced cirrhotic rats. **World J. Gastroenterol.**, v. 14, n. 15, p. 2349-2357, 2008.
- YAMAUCHI, N. et al. The glypican 3 oncofetal protein is a promising diagnostic marker for hepatocellular carcinoma. **Modern Pathol.**, v. 18, n. 12, p. 1591-1598, 2005.
- YANG, J. D.; NAKAMURA, I.; ROBERTS, L. R. The tumor microenvironment in hepatocellular carcinoma: current status and therapeutic targets. **Semin. Cancer Biol.**, v. 21, n. 1, p. 35-43, 2011.
- YEAKEL, E. H. Increased weight of the liver in Wistar albino rats with induced, and transplanted tumors. **Cancer Res.**, v. 8, p. 392-396, 1948.
- YIN, C. et al. Hepatic stellate cells in liver development, regeneration, and cancer. **J. Clin. Invest.**, v. 123, n. 5, p. 1902-1910, 2013.

ZAKHARI, S. Overview: how is alcohol metabolized by the body? **Alcohol Res. Health**, v. 29, n. 4, p. 245-254, 2006.

ZHOU, W. C.; ZHANG, Q. B.; QIAO, L. Pathogenesis of liver cirrhosis. **World J. Gastroenterol.**, v. 20, n. 23, p. 7312-7324, 2014.

ZHU, G. T.; LOU, G. Q.; SHI, J. P. To investigate the relationship of alcohol intake and hepatocellular carcinoma among patients with hepatitis B virus infection. **Chin. J. Exp. Clin. Virol.**, v. 25, n. 5, p. 328-330, 2011.

ZHU, H. et al. Oxidative stress and redox signaling mechanisms of alcoholic liver disease: Updated experimental and clinical evidence. **J. Dig. Dis.**, v. 13, n. 3, p. 133-142, 2012.