FERNANDO GOMES DE BARROS COSTA

**Efeito do sorafenibe na carcinogênese hepática experimental
secundária à doença hepática gordurosa não alcoólica**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Programa de Ciências em Gastroenterologia

Orientadora: Profa. Dra. Claudia Pinto Marques
Souza de Oliveira

Coorientador: Dr. José Tadeu Stefano

São Paulo

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Costa, Fernando Gomes de Barros

Efeito do sorafenibe na carcinogênese hepática experimental secundária à doença
hepática não alcoólica / Fernando Gomes de Barros Costa. -- São Paulo, 2016.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Ciências em Gastroenterologia.

Orientadora: Claudia Pinto Marques Souza de Oliveira.

Coorientador: José Tadeu Stefano.

Descritores: 1.Doença hepática gordurosa não alcoólica 2.Fígado gorduroso
3.Carcinoma hepatocelular 4.Sorafenib 5.Modelos animais 6.Tomografia por emissão
de pósitrons

USP/FM/DBD-432/16

“Recorre-se à Poesia
para iluminar,
com emblemáticas lamparinas,
certos porões onde se escondem
as alegrias e os sonhos:

é preciso resgatá-los
poli-los
encaixá-los de novo a engrenagem
da vida corriqueira

e remetê-los
como gentil convite dos quixotes
aos cotidianos sanchos panças.”

(Arriete Vilela, *Obra Poética Reunida*, p. 196)

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Fernando e Suzana, amor incondicional.

A minha esposa, Larissa, amor escolhido para toda vida.

Ao meu irmão, Felipe, amor fraternal em todas as horas.

Aos meus familiares, amigos e amigas,
amores que a vida me deu desde o berço
e outros que escolhi para mim.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Claudia Pinto Marques Souza de Oliveira, Professora Associada do Departamento de Gastroenterologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), pela sua competência e generosidade, além de ser exemplo de ética e trabalho em grupo, agradeço pela orientação pessoal e profissional durante todas as etapas deste trabalho.

Ao Dr. José Tadeu Stefano, pesquisador do Laboratório de Gastroenterologia Clínica e Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), pelo incentivo e empenho em me ajudar durante todas as etapas deste trabalho.

Ao Sr. José Edson Pereira, Sra. Mariana Torres, Sra. Laís Maruchi e Sr. Caio Levy, companheiros diários do laboratório de Gastroenterologia Clínica e Experimental (LIM-07), pela amizade e ajuda em todas as etapas deste trabalho.

À Dra. Daniele Faria e Sra. Camila Godoi, pesquisadoras do laboratório de Medicina Nuclear (LIM-43), pela colaboração e críticas construtivas na padronização e execução das imagens do PET/TC.

Ao Prof. Dr. Bruno Cogliati, professor doutor do departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, pela colaboração e análise da anatomia patológica.

À Dra. Isabel Pereira, pós-doutoranda no departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, pela prestatividade e confecção das lâminas da imunohistoquímica.

À Dra. Cristina Chammas, diretora do serviço de ultrassonografia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), pela realização dos exames ultrassonográficos.

Ao Prof. Dr. Daniel Mazo, à Dra. Daniela Faria, ao Prof. Dr. Paulo Herman, pelas sugestões e críticas construtivas dadas no exame de qualificação, as quais contribuíram para qualidade científica desta tese.

À Vilma de Jesus Libério, secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciências em Gastroenterologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) pela disponibilidade e prestatividade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo auxílio financeiro concedido.

Esta tese está de acordo com:

Referências: Adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver)*.

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias da FMUSP*. Elaborado por Annelise Carneiro da Cunha, Maria Julia A.L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de S. Aragão, Suely C. Cardoso, Valéria Vilhena. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas

Lista de símbolos

Lista de fórmulas

Lista de figuras

Lista de tabelas

Resumo

Abstract

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Generalidades	2
1.2	Fisiopatogênese da DHGNA.....	3
1.3	CHC na DHGNA	10
1.4	Sorafenibe	16
1.5	Modelos animais de CHC na DHGNA	18
1.6	PET e CHC	22
1.7	Justificativa	25
2	OBJETIVOS.....	26
3	MÉTODOS.....	28
3.1	Local	29
3.2	Animais	29
3.3	Delineamento do estudo	30
3.4	PET.....	32
3.5	Eutanásia.....	35
3.6	Análise histológica	36
3.7	Imunohistoquímica.....	37
3.8	Análise estatística	40
4	RESULTADOS.....	41
4.1	Fluxograma do estudo	42
4.2	Peso	44
4.3	Achados no USG	45
4.4	Achados do PET ¹⁸ F-FDG	46
4.5	SUV médio	49
4.6	SUV máximo.....	50
4.7	Correlação entre o grau de diferenciação do CHC e variáveis encontradas no PET ¹⁸ F-FDG	51
4.8	Achados histológicos	52
5	DISCUSSÃO.....	57
6	CONCLUSÕES.....	66
7	REFERÊNCIAS	68

LISTAS

ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPK	- 5' adenosina monofosfatase quinase ativada
AKT	- proteína quinase B
ANGTPL-3	- angiopoetina proteína 3
ATP	- adenosina trifosfato
B-RAF	- oncogene homologo viral de leucemia murino V-RAF B1
BCLC	- <i>Barcelona clinic liver cancer</i>
c-KIT	- oncogene kit
c-MET	- receptor do fator de crescimento de hepatócito
C-RAF	- oncogene homologo viral de leucemia murino V-RAF-1
CDKN2A	- Inibidor de quinase ciclina-dependente 2 A
CHC	- carcinoma hepatocelular
CK-19	- citoqueratina 19
CTNNB1	- Beta catetina -1
DEN	- dietilnitrosamina
DHGNA	- doença hepática gordurosa não alcoólica
DICOM	- comunicação de imagens digitais em medicina
EDTA	- ácido etilenodiamino tetra-acético
EHNA	- esteato hepatite não alcoólica
EpCam	- Molécula de adesão celular epitelial
EROS	- espécies reativas de oxigênio
EUA	- Estados Unidos da América
¹⁸F-FDG	- Desoxiglicose marcada com flúor dezoito
FBP	- retroprojeção filtrada
FDA	- <i>Food and Drug Administration</i>
FIAF	- Fator adipocitário induzido pelo jejum
FLT-3	- Quinase hepática fetal 3
FXR	- Receptor farsenóide X
GLUT	- transportador de glicose
GS	- glutamina sintetase
G6PASE	- glicose-6-fosfatase

HEP-PAR1	- Antígeno específico de hepatócitos 1
HGF	- Fator de crescimento do hepatócito
IGFR	- Receptor do fator de crescimento de insulina
IL-1β	- interleucina 1 beta
IL-6	- interleucina 6
IL-10	- interleucina 10
IL- 12	- interleucina 12
JAK	- janus quinase
JNK	- c-jun n-terminal quinase
KLF-11	- fator parecido com Krüppel 11
LPL	- Lipase lipoprotéica
MAPK	- proteína quinase ativada por mitógeno
miRNA	- microRNA
MPT	- proteína transferidora de triglicérides microssomal
mTOR	- mecanismo alvo da rapamicina
NAS	- escore de atividade necroinflamatória
NF-$\kappa\beta$	- fator nuclear kappa beta
PAMP	- padrões moleculares associados ao patógeno
PEPCK	- carboxiquinase piruvato fosfoenol
PNPLA-3	- patatina fosfolipase contendo domínio da proteína 3
PPAR-α	- receptor ativado proliferador de peroxissomo
PDGR-β	- Receptor do fator de crescimento derivado de plaqueta beta
PET	- tomografia por emissão de pósitrons
PIK3	- fosfatidilinositol 3 quinase
PTEN	- homólogo da fosfatase e tensina
Ras	- <i>Rat sarcoma</i>
SHP	- pequeno parceiro heterodimético
SMARCA2	- <i>Swi/Snf-related, matrix-associated, actin-dependent regulator of chromatin, subfamily A, member 2</i>
SREBP-1c	- proteína de ligação ao elemento regulador de estero1 1c
STAT	- proteína transdutora de sinal ativadora de transcrição
SUV	- <i>Standard uptake value</i>
TC	- tomografia computadorizada

TERT	- telomerase reverse transcriptase
TNF-α	- Fator de necrose tumoral alfa
TGF-β	- Fator transformador de crescimento beta
TP53	- proteína 53
VEGF	- Fator de crescimento vascular endotelial
VEGFR1-3	- Receptor do fator de crescimento endotelial vascular
VHB	- vírus da hepatite B
VHC	- vírus da hepatite C
VLDL	- lipídio de muito baixa densidade
Wnt	- <i>Wingless type</i>

SÍMBOLOS

cm	- centímetro
g	- grama
Bq/mL	- becquerel por mililitro
kVp	- quilovoltagem pico
MBq	- megabecquerel
mCi	- milicurie
mg	- miligrama
mg/ dL	- miligrama por decilitro
mg/kg	- miligrama por quilograma
mg/L	- miligrama por litro
min	- minuto
mL	- mililitro
mL/ kg.min	- mililitros por quilo por minuto
mL/ min	- mililitros por minuto
mm	- milímetro
O₂	- oxigênio
s	- segundos
x	- vezes
μA	- microampere

FÓRMULAS

Fórmula 1 - Cálculo do SUV	24
---	-----------

FIGURAS

Figura 1 -	Resposta adaptativa da resistência insulínica (RI)	5
Figura 2 -	Esquema mostrando o papel do receptor farsenóide X (FXR) na regulação lipídica e da glicose	9
Figura 3 -	Esquema ilustrativo da evolução da DHGNA para o CHC.....	15
Figura 4 -	Esquema ilustrativo do delineamento do estudo	32
Figura 5 -	Ilustração do modelo de PET/TC utilizado no estudo e das etapas do exame	34
Figura 6 -	Ilustração de como foi padronizado o desenho das regiões de interesse (ROI) do fígado para cálculo da média do SUVmax	35
Figura 7 -	Protocolo de imunohistoquímica	37
Figura 8 -	Fluxograma do estudo	43
Figura 9 -	Curva de sobrevida nos dois grupos estudados	43
Figura 10 -	Imagens ilustrativas da TC, PET com ¹⁸ F-FDG e fusão PET/TC nos dois grupos estudados	47
Figura 11 -	Imagens ilustrativas da TC, PET e fusão PET/TC	48
Figura 12 -	Comparação entre o número total de lesões hipercaptantes homogênea (n=34) e com centro hipocaptante (n=34) entre o grupo controle e sorafenib	48
Figura 13 -	Comparação do SUV médio entre as lesões do grupo controle (n=34) e as lesões do grupo sorafenibe (n=34)	49

Figura 14 - Comparação do SUV máximo entre as lesões do grupo controle (n=34) e as lesões do grupo sorafenibe (n=34)	50
Figura 15 - Gráficos de dispersão sobre correlação entre variável do PET e grau de diferenciação do CHC	51
Figura 16 - Influência do tratamento com sorafenibe (n=8) ou salina (n=4) sobre o grau de diferenciação tumoral	54
Figura 17 - Ilustração de achado macroscópico do fígado cirrótico com vários nódulos alguns regenerativos e outros CHC (A), esteatohepatite no aumento de 50x – coloração HE (B), cirrose no aumento de 50x – coloração HE (C) e transição entre parênquima hepático e CHC moderadamente diferenciado no aumento de 50x – coloração HE (D)	54
Figura 18 - Ilustração da presença de células cancerígenas dentro de vaso a distância do tumor, caracterizando invasão vascular (seta preta) no aumento de 200x – coloração HE ...	55
Figura 19 - Imagens ilustrativas do carcinoma hepatocelular grau 3 de Edmondson-Steiner no aumento de 200x – coloração HE (A), glutamina sintetase com marcação positiva no aumento de 200x (B), HEP-PAR-1 com marcação positiva no aumento de 400x e CK-19 com marcação apenas ductal no aumento de 400x	55
Figura 20 - Ilustração dos achados da macroscopia, do PET ¹⁸ F-FDG e da histologia de um animal tratado com sorafenibe	56

TABELAS

Tabela 1 -	Modelos animais de CHC secundário à EHNA	20
Tabela 2 -	Classificação de Kleiner para o estadiamento da fibrose hepática secundária a EHNA e cálculo do escore de atividade necroinflamatória de acordo com os achados encontrados	36
Tabela 3 -	Classificação de Edmondson-Steiner para Carcinoma hepatocelular, de acordo com características microscópicas vista na coloração de hematoxilina e eosina	37
Tabela 4 -	Evolução do peso de acordo com os dois grupos estudados	44
Tabela 5 -	Achados ultrassonográficos realizados na 16ª semana do experimento, antes do início do tratamento com sorafenibe ou placebo.....	45
Tabela 6 -	Distribuição dos achados histológicos do escore de atividade necroinflamatória e fibrose hepática no grupo controle (n=4) e grupo sorafenibe (n=8).....	53
Tabela 7 -	Distribuição do anatomopatológico dos nódulos hepáticos quanto à invasão vascular, hemorragia intranodular, necrose nodular, nódulos displásicos de baixo grau, CHC grau I/II, CHC grau III/IV	53

RESUMO

Costa FGB. *Efeito do sorafenibe na carcinogênese hepática experimental secundária à doença hepática gordurosa não alcoólica* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2016.

INTRODUÇÃO E OBJETIVOS: A doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) tem sido associada ao carcinoma hepatocelular (CHC), muitas vezes em paciente com hepatopatia avançada. Este estudo objetivou avaliar o efeito do sorafenibe no modelo experimental de CHC avançado secundário à DHGNA, padronizar o PET com ^{18}F -FDG para avaliar o CHC neste modelo e avaliar se há relação entre o grau de avidéz pelo ^{18}F -FDG e o grau de diferenciação tumoral do CHC. **METODOLOGIA:** Estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais. Foram utilizados trinta ratos Sprague-Dawley, machos, com 3 meses de vida, pesando entre 300-400g. O CHC secundário à DHGNA foi induzido pela combinação de dieta hiperlipídica deficiente em colina e dietilnitrosamina na dose de 100 mg/ L na água de beber *ad libitum* por 16 semanas. Após este período foram suspensos os estímulos carcinogênicos, realizou-se ultrassonografia abdominal para caracterização dos nódulos hepáticos maiores que 2 mm, e foi feita a divisão dos dois grupos segundo randomização e iniciada a administração diária do fármaco por gavagem durante 3 semanas: Controle (n=10) – 1 mL salina, Sorafenibe (n=20): 5mg/ kg/ dia. Ao término do tratamento, os animais realizaram PET (Gamma Medica-Ideas, USA) com ^{18}F -FDG (média de ^{18}F -FDG injetada de $1,02 \pm 0,17$ mCi ou $37,7 \pm 6,29$ MBq). Três dias após o PET, os animais foram anestesiados e foi feita a eutanásia, quando foi coletado material hepático. As lâminas foram avaliadas, por patologista veterinário experiente, na coloração de hematoxilina-eosina e imunohistoquímica para glutamina sintetase, antígeno específico de hepatócitos 1 e citoqueratina-19. **RESULTADOS:** A mortalidade nos dois grupos foi de 60% (p=0,07). Os achados ultrassonográficos mostraram grupos homogêneos com média de nódulos por animal: $4,88 \pm 2,75$ no controle e $4,95 \pm 3,11$ no sorafenibe (p=0,48). Na 19ª semana, viu-se que a média de lesões hipercaptantes por animal no PET foi de $4,37 \pm 1,59$ no grupo sorafenibe e $8,5 \pm 3,7$ no controle (p=0,006). A avidéz máxima do ^{18}F -FDG (SUVmáx) foi diferente entre os grupos estudados: $2,4 \pm 1,98$ no sorafenibe e $3,8 \pm 1,74$ no controle (p=0,01). Houve correlação direta entre o CHC pouco diferenciado/indiferenciado e os maiores valores de SUVmed ($R^2 = 0,34$, p=0,04), SUVmax ($R^2 = 0,44$, p=0,01), relação Tumor SUVmax/Fígado SUVmax ($R^2 = 0,42$, p=0,02) e relação Tumor SUVmax/ Músculo SUVmax ($R^2 = 0,54$, p=0,006). A média por animal de CHC confirmado pela histologia foi menor no grupo sorafenibe que no controle ($5,5 \pm 1,5$ vs $3,3 \pm 0,48$, p=0,01). E o grupo tratado com sorafenibe apresentou mais CHC bem diferenciado que o controle (39% vs 5%, respectivamente, p=0,01), bem como, menor presença de CHC pouco diferenciado que o grupo controle (52% vs 81%, p=0,003). **CONCLUSÃO:** O sorafenibe reduziu o número médio de CHC, a agressividade dos CHC e menor SUVmax dos tumores. A metodologia do PET foi padronizada para este modelo animal específico. O PET ^{18}F -FDG pode ser utilizado para avaliar não invasivamente o grau de diferenciação histológica do CHC, pois

valores maiores de SUVmed, SUVmax, Tumor SUVmax/Fígado SUVmax e Tumor SUVmax/ Músculo SUVmax foram correlacionados com CHC pouco diferenciado.

Descritores: doença hepática gordurosa não alcoólica; fígado gorduroso; carcinoma hepatocelular; sorafenib; modelos animais; tomografia por emissão de pósitrons.

ABSTRACT

Costa FGB. *Sorafenib effect's on liver experimental carcinogenesis secondary to non-alcoholic fatty liver disease* [Thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2016.

BACKGROUND AND AIMS: Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) has been linked to hepatocellular carcinoma (HCC), often in patients with advanced liver disease. This study aimed to: assess the effect of sorafenib in the experimental model of NAFLD related HCC, standardize PET ^{18}F -FDG to be an assessment tool of HCC in this model and to assess if there is a correlation between the degree of avidity for ^{18}F -FDG and the degree of tumor differentiation. **METHODS:** The ethics committee on animal use approved this study. Thirty male sprague-dawley rats were used, weighing between 300-400g. NAFLD related HCC was induced by the combination of fat and choline deficient diet with diethylnitrosamine (100 mg/L) in drinking water for 16 weeks. After this period these carcinogenic stimuli were suspended, and liver nodules were identified by abdominal ultrasound. Two groups were randomized: control (n=10) and treatment (n=20). Rats received daily gavage administration of 1 mL saline in the control group and sorafenib (5mg/kg/day) in the treatment group. After treatment, animals performed PET (Gamma Medica-Ideas, USA) with ^{18}F -FDG (average of ^{18}F -FDG injected 1.02 ± 0.17 mCi or 37.7 ± 6.29 MBq). Three days after the PET, the animals were anesthetized and euthanized. Histological aspect was evaluated by experienced veterinary pathologist. **RESULTS:** The mortality in both groups was 60% ($p = 0.07$). The sonographic findings showed homogeneous groups with average nodules per animal of: 4.88 ± 2.75 in control and 4.95 ± 3.11 in sorafenib ($p = 0.48$). On the 19th week, it was observed that the average hypercaptant lesion per animal in PET was 4.37 ± 1.59 in the sorafenib group and 8.5 ± 3.7 in control group ($p = 0.006$). Average SUVmax was different between groups: 2.4 ± 1.98 in the sorafenib group and 3.8 ± 1.74 in the control group ($p = 0.01$). A direct correlation was found between the poorly differentiated HCC and larger values of: SUVmed ($R^2 = 0.34$, $p = 0.04$), SUVmax ($R^2 = 0.44$, $p = 0.01$) tumorSUVmax / LiverSUVmax ratio ($R^2 = 0.42$, $p = 0.02$) and tumorSUVmax / MuscleSUVmax ratio ($R^2 = 0.54$, $p = 0.006$). HCC average per animal was lower in the sorafenib group than in the control group (5.5 ± 1.5 vs. 3.3 ± 0.48 ; $p = 0.01$). And sorafenib group had more well differentiated HCC (39% vs 5%, respectively, $p = 0.01$) and lower presence of poorly differentiated HCC (52% vs 81%, $p = 0.003$) than the control group. **CONCLUSION:** Sorafenib reduced the average number of HCC, the aggressiveness of HCC and lowered values of tumors SUVmax. The methodology of PET was standardized for this particular animal model. PET ^{18}F -FDG can be used noninvasively to assess the degree of histological differentiation of HCC, as higher values of SUVmed, SUVmax, tumorSUVmax/ LiverSUVmax ratio and tumorSUVmax / MuscleSUVmax ratio were correlated with poorly differentiated HCC.

Descriptors: non-alcoholic fatty liver disease, fatty liver; sorafenib; carcinoma, hepatocellular; models, animal; positron-emission tomography.

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Generalidades

A doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) é uma importante hepatopatia, principalmente, por estar associada ao aumento da obesidade mundial. É caracterizada, histologicamente, pela presença de mais de 5% de esteatose hepática, na ausência de outras causas etiopatogênicas e com consumo alcoólico menor que 30 g/ dia em homens e 20 g/ dia em mulheres. Abrange um largo espectro de doença que pode passar pela esteatose hepática não alcoólica, esteatohepatite não alcoólica (EHNA), cirrose até o carcinoma hepatocelular (CHC), ou diretamente da EHNA para CHC ⁽¹⁻³⁾.

A prevalência da DHGNA no mundo varia de 6 - 35% ^(4, 5). Nos EUA, ela é de 16 a 40%, mas se o diagnóstico de EHNA for dado por biópsia hepática a prevalência diminui para 3-5% ⁽⁶⁾. No Brasil, pacientes de centros terciários que tinham aminotransferases alteradas e esteatose hepática no ultrassom, excluindo-se outras hepatopatias, foram submetidos a biópsia hepática. Destes, 42% foram diagnosticados com esteatose isolada, 31% com EHNA e 27% com EHNA e algum grau de fibrose ou cirrose ⁽⁷⁾.

A maioria dos pacientes com DHGNA estão entre a quarta e quinta década de vida, aparentemente com maior prevalência em hispânicos que em caucasianos ou afrodescendentes. A literatura apresenta dados conflitantes quanto à distribuição do gênero ⁽⁷⁻⁹⁾.

O inquérito nacional de nutrição e saúde nos EUA foi feito em três momentos distintos (1988-1994, 1999-2004 e 2005-2008), utilizando o diagnóstico de DHGNA como alteração de enzimas hepáticas na ausência de outras causas definidas e sem realização de biópsia hepática. Ele mostrou que há relação direta entre maior prevalência de DHGNA e componentes da síndrome metabólica, a saber: DHGNA passou de 5,5% para 11%, obesidade 22% para 33%, diabetes mellitus 6 a 9% e hipertensão arterial sistêmica de 22% para 34% ⁽¹⁰⁾. Outros dados mundiais mostram que em pacientes diabéticos a prevalência da DHGNA varia de 49,5 a 87%, nos obesos mórbidos chega até 93% e desses 26-49% tem EHNA ⁽¹¹⁾. No Brasil, a prevalência de EHNA em uma coorte de obesos mórbidos foi de 66,7% ⁽¹²⁾.

Ao se comparar os estudos transversais brasileiros realizados em 1975, 1989 e 1996, observa-se o declínio da desnutrição energético-proteica em crianças e adultos e a emergência da obesidade, com aumento de 112% em mulheres adultas ⁽¹³⁾. Em 2010 cerca de 57% dos homens adultos tinham sobrepeso ou eram obesos, e a previsão para 2050 é que esta prevalência aumente para 95%. Com isto, há projeção de dobrar o número de pacientes portadores de doença arterial coronariana, acidente vascular encefálico, neoplasias malignas e diabetes em 2050, o que implicará um custo em torno de 330 bilhões de dólares ao longo de 40 anos ⁽¹⁴⁾.

1.2 Fisiopatogênese da DHGNA

A fisiopatogênese da DHGNA não está bem elucidada, mas a hipótese mais aceita é a dos múltiplos “hits”: a resistência insulínica, o

depósito de ácidos graxos nos hepatócitos, disfunção dos hormônios produzidos pelo tecido adiposo, ação da microbiota intestinal sobre o fator adipocitário induzido pelo jejum (FIAF) e sobre o receptor do farsenóide X (FXR), seguida da ativação das vias do estresse oxidativo, ativação de citocinas, estresse do retículo endoplasmático e ativação das vias de sinalização da apoptose e fibrogênese ⁽¹⁵⁻¹⁷⁾.

A insulina tem papel fundamental no anabolismo celular por diminuir a apoptose, favorecer o crescimento e diferenciação celular pela via das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK). Além de estimular a síntese de glicogênio no fígado e tecido muscular, diminuir a gliconeogênese hepática, favorecer a lipogênese hepática e adipocitária através da via da fosfoinositideo 3 quinase/proteína quinase B (PIK-3/AKT). De forma que a energia guardada poderá ser usada no jejum, trauma ou infecções, após ação, respectivamente, do glucagon, dos hormônios ligados ao estresse ou das citocinas inflamatórias para ativação da via catabólica (resistência insulínica), como mostra a figura 1 ⁽¹⁸⁾.

Com a mudança dos hábitos de vida na sociedade moderna (baixa atividade física, estresse crônico e ingesta calórica alta) há hipertrofia adipocitária que excede a capacidade habitual de estoque e liporegulação, deturpando esse mecanismo catabólico essencial para a sobrevivência humana ao longo da evolução. O aumento da adiposidade visceral gera resposta inflamatória [aumento de fator de necrose tumoral alfa [(TNF- α) e interleucina 6 (IL-6)], a qual recruta macrófagos da medula óssea, gerando disfunção adipocitária (diminuição da adiponectina e aumento de

angiotensinogênio) e liberação metabólitos lipídicos aos tecidos periféricos. O acúmulo destes metabólitos no fígado e nas células musculares, bem como as citocinas pró-inflamatórias ativam a resistência insulínica, contribuindo para a disfunção das células beta pancreáticas, e em última instância, síndrome metabólica e suas complicações ⁽¹⁸⁾.

Fonte: Adaptado de Tsatsoulis et al., 2013 ⁽¹⁸⁾.

Figura 1 - Resposta adaptativa da resistência insulínica (RI). Nas condições que exigem maior demanda metabólica como jejum, estresse e infecção, os hormônios e citocinas promovem estado de resistência insulínica para mobilizar a energia que fora guardada. A resistência insulínica nos adipócitos promove a lipólise, com liberação de ácidos graxos livres na circulação que serão usados pelos músculos, por exemplo, para poupar glicose para o cérebro. Ainda, a RI no fígado aumenta a produção e liberação de glicose

O acúmulo de ácidos graxos no fígado pode ocorrer por três maneiras: liberação excessiva advinda do tecido adiposo (obesidade e rápida perda ponderal, por exemplo), diminuição da exportação hepática do

VLDL por diminuição de sua síntese ou secreção (abetalipoproteinemia, desnutrição protéica ou deficiência de colina, são exemplos), ou ainda por disfunção hepática na beta-oxidação (como visto no consumo excessivo de álcool, deficiência de coenzima A por uso crônico de ácido valpróico ou ácido acetilsalicílico) ^(19, 20).

Uma das principais adipocitocinas é a leptina, estando muito expressa na DHGNA. Os níveis elevados de leptina têm efeito pró-inflamatório e pró-fibrogênico por ativar as células de Kupfer e as células estreladas. Sua via de sinalização é a da JNK/STAT. Foi demonstrado que a leptina promove o crescimento, migração e invasão do CHC por ativação da via da JNK, AKT e MAPK ^(17, 21).

Acredita-se que outra proteína derivada do tecido adiposo, a resistina, tenha papel importante no desenvolvimento da resistência insulínica. Nos modelos animais com dieta hiperlipídica, sua expressão aumentada levou a intolerância à glicose, hiperinsulinemia e manutenção de níveis séricos altos de ácidos graxos livres, enquanto que ao se administrar oligodesoxinucleotídios *antisense* contra o RNA mensageiro da resistina se observou completa reversão da resistência insulínica ^(22, 23).

Por sua vez, a adiponectina tem ação anti-inflamatória e sensibilizadora de insulina, estando pouco expressa na obesidade, diabetes mellitus e DHGNA. Os níveis baixos de adiponectina são insuficientes para suprimir a inflamação mediada por TNF- α . Além disto, sua falta altera a síntese de ácidos graxos por desregulação da via da 5' adenosina monofosfatase quinase ativada (AMPK). Ela também inibe a carcinogênese

hepática por antagonizar a indução da leptina na via dos sinais tradutores e ativadores de transcrição (STAT), AKT e com modulação do alvo mecânico da rapamicina (mTOR) ^(17, 21).

A DHGNA está ainda associada à maior prevalência do supercrescimento bacteriano, gerando maior permeabilidade intestinal e endotoxemia crônica pela passagem de lipopolissacarídeos e de padrões moleculares associados ao patógeno (PAMP) que ativam células de Kupfer no intestino e fígado via *toll-like receptor 4*. Estas por sua vez, adquirem fenótipo M1, com produção de TNF- α , interleucinas 12 e 1 beta (IL-12 e IL-1 β) o que amplifica a resposta inflamatória e causa mais dano hepatocelular ⁽²⁴⁻²⁷⁾.

A obesidade está frequentemente ligada ao aumento de bactérias do filo Firmicutes sobre filo Bacteroidetes, implicando em maior capacidade de coletar energia da dieta, com aumento da ingesta calórica e por fim a deposição de gordura no fígado ⁽²⁸⁾. Viu-se também que a inoculação intestinal de microbiota obesogênica em camundongos livre de bactérias, fez com que estes animais inoculados tivessem aumento de 60% na gordura corporal e após 14 dias da inoculação apresentassem resistência insulínica, apesar da redução calórica da dieta ⁽²⁹⁾. Isto se explica pela ação da microbiota intestinal na supressão do FIAF, inibidor da lipase lipoprotéica. Se ele está suprimido, há aumento da atividade da lipase lipoprotéica, levando a um maior estoque de triglicérides nos adipócitos ⁽²⁹⁾.

Outros estudos experimentais de DHGNA mostraram atividade da microbiota intestinal sobre: metabolização da colina adquirida na ingesta,

aumento da produção endoluminal de etanol e acetaldeído, os quais são facilmente absorvidos e ao serem levados à circulação portal causam lesão hepatocitária ^(25, 30).

A ativação do receptor farsenóide X (FXR) por ácidos biliares e agonistas sintéticos (ácido obeticólico) diminui a trigliceridemia alterando o metabolismo lipídico (vide figura 2): promove a beta-oxidação via PPAR- α ; reprime a proteína transferidora de triglicérides microssomal (MPT) e apolipoproteína B facilitando o clearance do VLDL e quilomícrons; reprime a paraoxanase 1, inativando a lipoproteína de baixa densidade e diminuindo a produção de lipídios pró-aterogênicos; estimula a atividade da lipase lipoprotéica por aumentar a expressão da apolipoproteína CII/AIV e diminuir a da apolipoproteína CIII/IL-12/ANGTPL3; reprime o fator transcriptor hepático SREBP-1c e, por conseguinte, alvos gênicos lipogênicos ⁽³¹⁾.

No metabolismo da glicose, também demonstrado na figura 2, a ativação do FXR nas células beta-pancreáticas aumenta a fosforilação da AKT e translocação do GLUT-2 na membrana plasmática, aumentando a captação celular de glicose. Há maior expressão do fator parecido com Krüppel 11 (KLF-11), que aumenta a transcrição e secreção de insulina induzida pela glicemia. E a inibição da SHP regula negativamente a gliconeogênese hepática ⁽³¹⁾.

Por fim, as mitocôndrias são consideradas como principais contribuidoras do estresse oxidativo na obesidade. O superóxido é produto natural do ciclo de Krebs, mas quando a captação e oxidação de substratos energéticos excede a capacidade de produzir ATP ou de metabolização

pelos sistemas antioxidantes (catalase, peroxiredoxinas, glutathione peroxidase) há acúmulo das espécies reativas de oxigênio, as quais levam à resistência insulínica e ao desenvolvimento da EHNA⁽³²⁾.

Fonte: Adaptado de Ding et al., 2015⁽³¹⁾

Figura 2 - Esquema mostrando o papel do receptor farnesóide X (FXR) na regulação lipídica e da glicose. PPAR alfa – receptor ativado proliferador de peroxissomo, MTP – proteína microssomal transferidora de triglicérides, Apo B – apolipoproteína B, VLDL – lipoproteína de muito baixa densidade, Apo CII e CIII – apolipoproteína CII e CIII, ANGPTL3 – angiopoetina proteína 3, LPL – lipase lipoprotéica, SHP – heterodímero pequeno companheiro, SREBP1c – proteína de ligação ao elemento regulador de esterol 1c, AKT- proteína quinase B, KLF-11 fator parecido com Krüppel 11, PEPCK – carboxiquinase piruvato fosfoenol, G6PASE – glicose-6-fosfatase, GLUT2 – transportador de glicose 2

1.3 CHC na DHGNA

O câncer de fígado é a segunda maior causa mundial de morte relacionada ao câncer e o CHC responde por aproximadamente 90% de todas as neoplasias primárias do fígado ^(33, 34). Cerca de 80% dos casos de CHC ocorrem na África subsaariana e leste da Ásia ⁽³⁵⁾. Nos EUA entre 1990-2009, enquanto se notou uma diminuição da mortalidade de todas as neoplasias malignas, a mortalidade por neoplasias de fígado e vias biliares aumentou em 60% nos homens e 40% nas mulheres ⁽³⁶⁾. Isto ocorreu porque apenas um terço dos pacientes eram elegíveis, no momento do diagnóstico, para tratamento curativo: ressecção, transplante hepático ou ablação local ⁽³³⁾. Apesar do maior controle dos vírus da hepatite B e C (VHB e VHC, respectivamente), a epidemia mundial de sobrepeso, obesidade e síndrome metabólica emergiu como relevante fator de risco para CHC ⁽³⁴⁾.

Estudos observacionais mostraram que a obesidade, diabetes, sobrecarga de ferro e consumo concomitante de álcool são fatores de risco para o desenvolvimento de CHC relacionado a DHGNA ⁽²⁾. O risco de morte por câncer de fígado é 4.5 vezes maior em homens obesos que homens com índice de massa corpórea normal. Pode-se supor, então, que o incremento na incidência de CHC é em parte causado pelo aumento do número de pacientes com DHGNA, altamente associada a obesidade e diabetes mellitus tipo 2 ⁽³⁷⁾.

No Brasil, cerca de 10% dos transplantes hepáticos são por CHC ⁽³⁸⁾, a incidência anual é de 2,9%, cumulativa em 5 anos de 14,3% e sobrevida de 50% em 5 anos ⁽³⁹⁾. No inquérito nacional da sociedade brasileira de

Hepatologia sobre CHC relacionado a DHGNA, observou-se diabetes em 74% dos pacientes, hipertensão em 60%, obesidade em 52% e ainda que cerca de 30% dos pacientes com CHC não tinham cirrose. Entre os pacientes com cirrose 40% apresentavam hipertensão portal e 30% algum grau de disfunção hepática, sugerindo diagnóstico tardio e dificuldade de administrar tratamento curativo ⁽³⁹⁾. Supõe-se que esse diagnóstico tardio venha da baixa adesão aos protocolos internacionais de rastreio de CHC com USG a cada 6 meses. Por exemplo, estudo recente comparou o rastreamento de CHC em centro terciário do hospital universitário do sudeste e clínica privada, chegando-se a conclusão que apenas 8% dos paciente do hospital universitário e 29% da clínica privada faziam o rastreamento apropriado ⁽⁴⁰⁾.

Da cirrose à hepatocarcinogênese, a caminhada é complexa e com múltiplos degraus, passando dos nódulos displásicos, para CHC precoce, CHC pequeno e mais indiferenciado, até o CHC avançado. Este processo de hepatocarcinogênese não é o mesmo para as diferentes etiologias que causam o CHC, variando conforme a prevalência de suas associações etiológicas ^(35, 41, 42).

O risco de desenvolvimento de CHC é 17% maior em pacientes com sobrepeso e 89% em obesos. Acredita-se que a resistência insulínica seja a chave para desvendar a relação entre CHC e DHGNA, pois a ligação molecular entre balanço energético e controle do ciclo celular é feita pelo receptor de insulina via PIK3 e proteína homologa da fosfatase tensina

(PTEN), além do que o uso de biguanidas ou tiazolidinedionas foi associado com redução de 70% no risco de CHC em pacientes diabéticos ⁽²⁾.

Até o momento, o único polimorfismo (c.444 C>G - rs738409) associado à DHGNA e CHC foi identificado no gene patatina fosfolipase contendo domínio da proteína 3 (PNPLA3), que confere 2,26 vezes mais risco de ter CHC, já na presença de homozigose do alelo G o risco sobe para 5 vezes ao se comparar com o homozigoto CC ⁽²⁾.

O CHC pode ser classificado molecularmente em: proliferativo e não-proliferativo. Os proliferativos, que tem pior prognóstico, são mais indiferenciados, tem maior nível de alfafetoproteína, e são divididos em dois subgrupos fenotípicos: ativação das vias Wnt/TGF- β e da célula progenitora EpCam/CK19. Por sua vez, o grupo não proliferativo é heterogêneo e destes apenas aqueles que possuem mutação da catenina β 1 (CTNNB1) compartilham o mesmo perfil molecular ⁽³³⁻³⁵⁾. O prognóstico do grupo não proliferativo é melhor, tem menor nível de alfafetoproteína e são mais bem diferenciados ⁽³³⁾.

A heterogeneidade funcional e fenotípica torna difícil a erradicação de todas as células tumorais, permitindo a recorrência da neoplasia maligna. Essa heterogeneidade é característica marcante do CHC, que pode ser resultado do próprio CHC ou de alterações genéticas/epigenéticas do microambiente ⁽⁴³⁾. Ela é mais reconhecida em nódulos grandes com estrutura de nódulo dentro de nódulo, onde um pequeno nódulo indiferenciado está dentro de um outro nódulo mais bem diferenciado ⁽³⁵⁾.

A ativação de diferentes vias de sinalização pode explicar esta heterogeneidade tumoral do CHC: fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) – pedra angular da angiogênese do CHC; MAPK – ativada em quase todos os CHC avançados, cujo bloqueio parcial é conseguido através do sorafenibe; PI3K/PTEN/AKT/mTOR – controla a proliferação celular e apoptose; desregulação do receptor do crescimento do hepatócito (c-MET) – importante para a regeneração hepatocitária após lesão hepática, ocorrendo em 50% dos CHC avançados; receptor do fator de crescimento parecido com insulina (IGFR) – ativada em 20% dos casos e WNT/ β -catenina – crucial para hepatocarcinogênese ⁽³⁴⁾.

Para prosseguir na investigação da diversidade do CHC, fez-se o sequenciamento completo do exoma de 243 tumores hepáticos ressecados cirurgicamente identificando 28.478 mutações somáticas e 11 vias ativadas: mutações na região promotora da transcriptase reversa telomerase (TERT) (60%), WNT/ β -catenina (54%), PIK3-AKT-mTOR (51%), TP53 (49%), MAPK (43%), diferenciação hepática (34%), regulação epigenética (32%), remodelamento da cromatina (28%), estresse oxidativo (12%), IL-6/JAK-STAT (9%) e fator de transformação do crescimento beta (TGF- β) (5%). Viu-se ainda que o VHB está frequentemente associado a mutações do TP53 e que o álcool se relaciona com CTNNB1 e TERT. Todavia, VHC, síndrome metabólica e hemocromatose não mostraram associações significativas ^(2, 42, 44).

A expressão de microRNA (miRNA) tem papel significativo no desenvolvimento do CHC, tanto o é que o miRNA122 responde por cerca de

70% de todo o miRNA hepatocitário e está suprimido no desenvolvimento precoce do CHC ⁽⁴¹⁾. Além disto, a presença de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, IL-1 β) no tecido peritumoral ou na circulação sistêmica contribuem para a progressão tumoral e maior risco de recorrência do CHC ⁽⁴³⁾.

Acredita-se que os estímulos externos como dieta rica em frutose e lipídios, desordens endócrinas, polimorfismos genéticos no PNLPA3 e TM6SF2 e sedentarismo levem à obesidade. Esta desencadeia o acúmulo de lipídios e resistência insulínica. Em seguida, há liberação de espécies reativas de oxigênio (EROS) que lesam o DNA. A resposta inflamatória, mediada pela interleucina-6 e fator de necrose tumoral alfa, ativa a via do STAT 3 e fator nuclear kappa beta (NF- κ B), as quais levam ao surgimento de CHC nos pacientes com EHNA, conforme esquematizado na figura 3.

Sugere-se ainda que o acúmulo de ácidos graxos nos hepatócitos leva a maior estresse oxidativo pela peroxidação destes lipídios no retículo endoplasmático. Os subprodutos desta oxidação, entre o *Trans 4 hydroxy 2 nonenal*, causam mutação no gene supressor de tumor p53. A produção aumentada de leptina e resistina foi associada ao crescimento, migração e invasão do CHC por ativação da via da JNK, AKT e MAPK ^(17, 45, 46).

Fonte: Reproduzida com permissão dos autores ⁽¹⁷⁾

Figura 3 - Esquema ilustrativo da evolução da DHGNA para o CHC. Os estímulos externos como dieta rica em frutose e lipídios, desordens endócrinas, polimorfismos genéticos no PNPA3 e TM6SF2 e sedentarismo, levam à obesidade, a qual desencadeia o acúmulo de lipídios e resistência insulínica. Em seguida, há liberação de espécies reativas de oxigênio (EROS) que lesam o DNA, e a resposta inflamatória mediada pela interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral alfa (TNF) ativam as vias dos sinais tradutores e ativadores de transcrição 3 (STAT 3) e fator nuclear kappa beta (NF- κ B), vias sinalizadores oncogênicas, que levam o surgimento de CHC nos pacientes com EHNA

O CHC relacionado à DHGNA é reportado frequentemente como sendo único, grande, com pouca invasão vascular, menor nível de alfafetoproteína e mais bem diferenciado ⁽⁴²⁾. A análise de quase 5000 casos de CHC nos EUA mostrou que os pacientes com CHC relacionado a DHGNA eram mais velhos, tinham menor sobrevida, mais cardiopatia, maior

chance de morrer do CHC e perfaziam apenas 5% de todos os pacientes transplantados por CHC ⁽⁴⁷⁾.

O CHC tipo esteato-hepatítico é caracterizado por mais de 5% de esteatose intratumoral, presença de corpúsculos de Mallory-Denk, fibrose trabecular e pericelular, inflamação de linfócitos e polimorfonucleares, estando presente, na sua maioria, em pacientes com DHGNA ^(48, 49). Em estudo ainda não publicado, Campos et al., estudaram 21 pacientes com DHGNA/EHNA que tinham 35 CHC no total. Destes pacientes 57% tinham cirrose e os 43% fibrose grau 2 ou 3, 90% tinham índice de massa corpórea acima de 25 kg/ m², 81% hipertensão arterial sistêmica e 76% diabetes mellitus. Viu-se ainda que 62% eram CHC grau 3 ou 4 de Edmondson-Steiner, 71% dos CHC poderiam ser classificados nos tipo esteato-hepatítico de acordo com os critérios descritos acima ⁽⁵⁰⁾.

1.4 Sorafenibe

O Sorafenibe foi inicialmente descrito como inibidor do RAF-1, membro da via sinalizadora RAF/MEK/ERB, para suprimir a proliferação e crescimento das células tumorais em modelos experimentais ⁽⁴¹⁾. Atualmente, ele é visto como inibidor multiquinase (C-RAF, B-RAF, c-KIT, FLT-3, PDGR- β e VEGFR1-3), bem absorvido e com alta biodisponibilidade ⁽⁵¹⁾. Em diferentes linhagens celulares de CHC, o sorafenibe atua na desfosforilação de dois resíduos (tirosina - Y705 e serina - S727) da STAT3, o que reduz a fosforilação de AKT e ERK, levando ao acúmulo de autofagossomos e inibição do complexo mTOR1. Além disto, modula a

expressão de mais de 19 proteínas, regulando, por exemplo, para baixo a anexina A1 (envolvida na diferenciação celular, progressão e invasão tumoral) e ciclofilina A (envolvida na metástase do CHC) ^(41, 52, 53).

Ele é aprovado para o tratamento de carcinoma de células renais avançado, câncer de tireóide avançado e é a única droga aprovada pelo FDA para tratar o CHC em estágio C do BCLC ⁽⁵¹⁾. Antes do sorafenibe, nenhuma terapia sistêmica havia mostrado sobrevida consistente no tratamento de pacientes com CHC. Sua administração é por via oral, bem tolerado e com poucos efeitos adversos, sendo os principais a síndrome mão-pé e a diarreia que ocorrem em 8% dos casos, outros menos comuns são: perda ponderal, anorexia e mudanças na voz ⁽⁵⁴⁾. A dose padrão e eficaz aprovada para o uso em seres humanos é de 800 mg/dia. Esta dose após sete dias contínuos de uso gera média de 127 $\mu\text{mol/L/h}$ da concentração plasmática da droga ($\text{AUC}_{0-12\text{h}}$). Para conseguir esta mesma $\text{AUC}_{0-12\text{h}}$, a dose em camundongos varia de 10mg/kg/dia a 30mg/kg/d, já em ratos ela é de 5 mg/kg/dia ⁽⁵⁵⁻⁵⁷⁾.

No tratamento de CHC avançado, os estudos “Asia-Pacific” e “SHARP” provaram que o sorafenibe é capaz de aumentar a sobrevida em torno 3 meses quando comparado a placebo ^(58, 59). No entanto, no estudo “SHARP” 74% dos pacientes tratados com sorafenibe tinha a causa base da cirrose hepática como VHC, VHB ou álcool, e no estudo “Asia-Pacific” cerca de 81% tinham VHC ou VHB, o que mostra que parcela pequena dos pacientes tratados tinham DHGNA ^(58, 59).

Sabe-se também que pequena fração de tumores, cerca de 30%, apresenta resposta benéfica ao uso sorafenibe, possivelmente porque alguns alvos moleculares não foram atingidos pelo fármaco, ou adquiriram resistência primária ou adquirida, geralmente surgindo após 6 meses de uso. Por esses motivos, os estudos com novas drogas que englobaram todos os pacientes de CHC com hepatopatias de diferentes etiologias no mesmo grupo fracassaram ^(41, 60).

O sorafenibe foi avaliado por nosso grupo em modelo experimental de DHGNA, na dose de 2,5 mg/kg/dia, prevenindo a fibrose hepática e a disfunção mitocondrial, bem como diminuindo a inflamação (IL-6 e IL-10) ⁽⁶¹⁾. Além disto, seu uso por 8 semanas em ratos cirróticos por DHGNA, na dose de 5mg/kg/dia, melhorou a desregulação venosa hepática, inibiu o recrutamento e ativação leucocitária, diminuiu a vasodilatação esplâncnica e a formação de ascite ⁽⁶²⁾. Nos modelos animais de CHC secundário à cirrose biliar por ligação do colédoco ou implantação de células provenientes de linhagens de CHC, o sorafenibe reduziu inflamação e fibrose, suprimiu a recorrência intrahepática e prolongou a sobrevida após a ressecção tumoral ⁽⁶³⁾.

1.5 Modelos animais de CHC na DHGNA

Modelos animais são cruciais para a elucidação da fisiopatologia do CHC e para o teste de potenciais alvos terapêuticos, ainda mais porque testes *in vitro* são insuficientes para avaliar tratamentos preventivos de CHC secundário à EHNA, curativos tanto para EHNA quanto para CHC

secundário à EHNA. Contudo, os atuais modelos animais de EHNA-CHC são pouco adequados em mostrar como ocorre a hepatocarcinogênese nos níveis moleculares, genéticos e epigenéticos ⁽⁶⁴⁾.

O modelo experimental ideal de CHC secundário à DHGNA tem que se assemelhar ao que ocorre nos seres humanos: excesso de calorias na dieta alimentar, associado à obesidade, à resistência insulínica e à dislipidemia, histologia hepática com os mesmo marcadores, evolução natural para CHC, expressão gênica e ativação das mesmas vias sinalizadoras ⁽⁶⁵⁾.

Diversos modelos foram criados com esse intuito: animais geneticamente modificados com ou sem dieta, indução dietética com variadas fórmulas (dieta hiperlipídica associada ou não a alto teor de frutose, deficiente em metionina ou colina, dieta hiperlipídica com deficiência de colina com ou sem associação à dietilnitrosamina) ou xenotransplante de células cancerígenas ^(64, 66-68). Na tabela 1 é possível observar um compilado dos modelos de CHC secundário à EHNA.

Tabela 1 - Modelos animais de CHC secundário à EHNA. Em vermelho, destaca-se o estudo do nosso grupo com menor tempo de evolução para CHC. ALIOS – síndrome da obesidade induzida por estilo de vida americano, ALR – argumentador da regeneração hepática, MC4R – receptor da melancortina 4, HL-DC DM – Dieta hiperlipídica deficiente de colina e metionina, DEN – dietilnitrosamina, PTEN – homólogo da fosfatase e tensina, DIAMOND – modelo animal de DHGNA induzida por dieta

Nome	Espécie	Agente	EHNA	CHC
PTEN-nulo	Camundongo AlbCrePten ^{flox/flox}	Espontâneo	10 sem	40 sem
ALR-nulo	Camundongo AlbCreALR ^{flox/flox}	Espontâneo	4 sem	1 ano
MCR4R-deficiente	CamundongoMC R4R-knock-out	Hiperlipídica	5 meses	1 ano
Dieta HL-DC +- DM	Camundongo ou Rato	Hiperlipídica, deficiente de colina e/ou metionina	4-6 meses	12 meses
Defeito metabolismo do Ferro	Camundongo 129S1/SvImJ	Hiperlipídica com solução rica em frutose e glicose na água	4-6 meses	13 meses
STAM	RN Camundongo	Hiperlipídica e Indução sequencial de streptozotocina	8 sem	20 sem
Dieta HL-DC + DEN	Sprague-Dawley	Hiperlipídica, deficiente de colina, DEN água	8 sem	16 sem
ALIOS	Camundongo	Hiperlipídica e xarope de milho rico em frutose	16 sem	1 ano
DIAMOND	Camundongo 129S1/SvImJ + C57BL/6J	Hiperlipídica, deficiente de colina	16-24 sem	13 meses

Fonte: Adaptado de Wu J, 2016 ⁽⁶⁴⁾.

Nos animais geneticamente modificados há indução de DHGNA de forma semelhante ao que ocorre em humanos. Todavia, eles não progridem para EHNA ou CHC, necessitando ou da dieta modificada para induzi-los, ou da associação de um carcinógeno, como a dietilnitrosamina, para

desenvolver CHC ⁽⁶⁸⁾. O DEN é um carcinógeno utilizado há muito tempo em modelos experimentais de CHC por representar a complexidade da doença em humanos. Apesar da variabilidade intra e intertumoral do modelo, o seu uso é promissor no estudo pré-clínico de futuras terapias para CHC avançado ^(69, 70).

Por sua vez, a dieta modificada tem o intuito de imitar o estilo de vida ocidental e os hábitos alimentares que culminam obesidade, resistência insulínica e EHNA. Nestes modelos há consumo entre 45 e 75% de calorias provenientes de lipídios e suas variações *trans* ou colesterol. O problema da dieta hiperlipídica pura é que a lesão hepática é mais leve ao ser comparada com dietas deficientes de colina/metionina. Essas dietas deficientes de aminoácidos causam fibrose em 8 semanas e o aparecimento de CHC ocorre de 3 a 6 meses ^(64, 68).

Os modelos pré-clínicos de xenotransplante ortotópicos permitem estudar o mecanismo molecular de subclasses específicas de CHC, bem como o microambiente tumoral, o qual altera o comportamento biológico das células neoplásicas, como o crescimento e potencial de metástase das mesmas ⁽⁶³⁾. Por exemplo, Kornek et al., 2008 ⁽⁷¹⁾ implantaram células de Hepatoma 129 (Hepa129) em camundongos CH3, os quais receberam álcool via oral com ou sem injeções intraperitoneais de tioacetamida para induzir fibrose hepática. Eles observaram que a fibrose hepática estimulou o desenvolvimento tumoral através de maior expressão do VEGF ⁽⁷¹⁾. Entretanto, Gross et al., 2015 ⁽⁷⁰⁾ compararam este modelo ortotópico com o do DEN e observaram que o CHC induzido pelo DEN demonstrou melhor

perfusão tumoral, similaridade genética ao modelo humano e resposta ao tratamento com sorafenibe ⁽⁷⁰⁾.

O nosso modelo misto de CHC secundário à DHGNA, utilizando dieta hiperlipídica com deficiência de colina e dietilnitrosamina na água, é adequado para o estudo da hepatocarcinogênese por apresentar, semelhantemente aos seres humanos, a evolução de esteatose, passando por EHNA, cirrose, nódulos displásicos e CHC. E ainda mais porque esta evolução para CHC ocorreu em período mais rápido (16 semanas) do que outros modelos experimentais e houve ativação das células progenitoras hepáticas ⁽⁷²⁾.

A indução experimental do CHC pode ser analisada por técnicas de imagem como elastografia hepática e ultrassonografia com contraste, a qual demonstrou boa acurácia na detecção de CHC bem diferenciado e moderadamente diferenciado em modelos de roedores ⁽⁷³⁾. O PET pode ser empregado para a avaliação do desenvolvimento da neoplasia e é melhor marcador que a tomografia, ressonância nuclear magnética ou ultrassom na avaliação da viabilidade tumoral ^(69, 74).

1.6 PET e CHC

A tomografia por emissão de pósitrons (PET) é um método diagnóstico de imagem que usa compostos marcados com radioisótopos como sondas moleculares para visualizar e medir processos bioquímicos *in vivo* ^(75, 76). Alguns exemplos destes processos bioquímicos são: o fluxo do sangue, o uso do oxigênio e o metabolismo da glicose ⁽⁷⁷⁾. Pode-se

monitorar de forma não invasiva a instalação e progressão do CHC, quantificando a carga tumoral, identificando sítios metastáticos e quantificando a resposta ao tratamento por uma droga em teste ⁽⁷⁴⁾.

Todos os emissores de pósitrons compartilham o fato de terem seu núcleo enriquecido com prótons, composto da antimatéria com alguma massa e carregado positivamente. Para conseguirem se estabilizar, no processo que é conhecido como decaimento isobárico, eles podem ou emitir um pósitron (^{11}C , ^{13}N , ^{15}O e ^{18}F , por exemplo) ou capturar um elétron. Ao ser emitido, esse pósitron viaja pelo tecido adjacente por uma distância, conhecida como alcance, perdendo continuamente energia até se aniquilar completamente com um elétron e emitir um par de fótons de 511 KeV em direções opostas. Quando este par de fótons é detectado ao mesmo tempo pelo PET, forma-se um mapa de distribuição de pontos de aniquilação no objeto escaneado ⁽⁷⁵⁾.

Dentre os radiofármacos emissores de pósitron, destaca-se o uso da flúor-18-desoxiglicose, análoga da glicose com grande aplicação em estudos oncológicos. O PET com ^{18}F -FDG é capaz de fornecer cerca de uma hora após a injeção do radiotraçador imagens que refletem o metabolismo da glicose em todo o corpo ⁽⁷⁷⁻⁷⁹⁾.

O ^{18}F -FDG utiliza transportadores de glicose da membrana celular (GLUT) para entrar na célula. Ao ser levado para o citoplasma é fosforilado pela hexoquinase e a partir deste momento não consegue mais sair da célula, nem participa da via glicolítica. Inicialmente, GLUT 1 e 3 foram identificados nas células tumorais por sua significativa expressão. Os GLUT

5 e 12 apareceram como transportadores ativos neste processo metabólico, principalmente, no câncer de mama. Na linhagem celular de CHC, viu-se que nem sempre os GLUT 1 e 3 são responsáveis pela captação de ^{18}F -FDG, tendo o GLUT 12 papel ativo neste transporte ⁽⁸⁰⁾.

Há diferentes métodos de mensuração do acúmulo intracitoplasmático do ^{18}F -FDG. O PET é feito para medir a concentração da radioatividade *in vivo* em Bq/mL. Habitualmente, o que interessa é o valor relativo médio (SUVmédio) ou máximo (SUVmáx) da captação do ^{18}F -FDG pelo tecido na determinada região de interesse. Então, o SUV, ou valor de captação padronizado, é a concentração de atividade radioativa que foi captada pelo PET (Bq/mL) na região de interesse, dividida pela quantidade injetada de radiofármaco corrigida pela taxa de decaimento do mesmo (Bq/mL) e peso do sujeito da pesquisa (g). A meia vida do ^{18}F é de 110 minutos. ^(79, 81).

$$\text{SUV} = \frac{\text{Concentração radioativa (Bq/mL)}}{\text{Radioatividade injetada (Bq/mL) / Peso (g)}}$$

Fórmula 1 - Cálculo do SUV ⁽⁸¹⁾

A variabilidade da captação do ^{18}F -FDG entre as diferentes neoplasias malignas gera diferenças significativas de sensibilidade: no câncer de pâncreas varia de 70-100% e no CHC 50-70%. Essa menor sensibilidade provavelmente é causada pela captação do ^{18}F -FDG pelo tecido hepático circunjacente ao câncer ^(78, 80).

Na hepatocarcinogênese, o fornecimento de sangue arterial aumenta à medida que grau histológico avança. Contudo, o metabolismo do tumor e a angiogênese no CHC avançado ainda não foram bem avaliados e poderiam ser diferentes daqueles apresentados pelo CHC precoce, podendo afetar a resposta ao tratamento ^(80, 82-85).

Estudos anteriores realizados com pacientes com CHC tratados com sorafenibe demonstraram que valores maiores de SUVmax de ^{18}F -FDG foram correlacionados com menor sobrevida global e CHC avançado ^(74, 83-88). Isto também foi visto na linhagem celular de CHC, pois a ausência da expressão da p53 levou a maior captação do ^{18}F -FDG, sendo portanto indicativo de pior prognóstico ⁽⁸⁰⁾.

Ultimamente, viu-se que o estudo metabólico do CHC pelo PET ^{18}F -FDG é uma variável de prognóstico importante por estar correlacionada à sobrevida a longo prazo e recorrência precoce do CHC pós-transplante hepático ^(89, 90). Essa ferramenta diagnóstica poderá ser usada para identificar os tumores mais indiferenciados e agressivos, numa tentativa de melhor selecionar o paciente que será submetido a transplante hepático ⁽⁸⁴⁾.

1.7 Justificativa

Num momento em que a epidemia mundial da obesidade contribui sobremaneira ao CHC na DHGNA, este estudo original vem para avaliar o efeito do sorafenibe no modelo específico de carcinogênese secundária a DHGNA, utilizando o PET como ferramenta de diagnóstico ratificada pelo padrão ouro da anatomia patológica e imunohistoquímica.

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Avaliar o efeito do sorafenibe no CHC avançado secundário à DHGNA.

2.2 Objetivos Específicos

- Padronizar metodologia para imagens PET com ^{18}F -FDG como ferramenta de avaliação do modelo experimental de carcinogênese hepática secundária à DHGNA.
- Avaliar se há relação entre o grau de avidéz pelo ^{18}F -FDG e o grau de diferenciação tumoral do CHC.

3 MÉTODOS

3 MÉTODOS

3.1 Local

O estudo “in vivo” foi desenvolvido no Laboratório de Gastroenterologia Clínica e Experimental (LIM-07) da Disciplina de Gastroenterologia Clínica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP) em colaboração com Departamento de Radiologia e Oncologia da FMUSP, Laboratório de Medicina Nuclear (LIM-43) e Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP.

3.2 Animais

Esse estudo seguiu as orientações recomendadas da Declaração de Helsinki de 1975 [publicada por "US National Institute of Health-Guide for care and use of laboratory animals" (NIH Publication, nº 85-23, revisada em 1996)] e do Serviço de Experimentação em animais da FMUSP. O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da FMUSP, sob o número 108/14. Foram utilizados ratos Sprague-Dawley, machos, com 3 meses de vida, pesando entre 300-400 g, provenientes do Biotério do Laboratório de Gastroenterologia Clínica e Experimental da FMUSP. Os animais foram mantidos em local com temperatura, umidade e ventilação controlada, com ciclos de luz/escuro de 12 horas, 3 animais por caixa. A cada semana eram incluídos 3 animais, ou seja, uma caixa, para facilitar a

realização dos exames diagnósticos: USG e PET. Semanalmente, foi realizada a pesagem de cada rato, na mesma balança Filizola BPS-15 (Campo Grande, Brasil).

3.3 Delineamento do estudo

O CHC secundário à DHGNA foi induzido pela combinação de dieta hiperlipídica deficiente em colina [35% de gordura total, enriquecida com 54% de ácidos graxos trans (Rhoster Ltda, Brasil)] e DEN (Sigma Chemical, Missouri, EUA) na dose de 100 mg/ L na água de beber *ad libitum*, conforme descrito previamente ^(72, 73), por 16 semanas.

Após este período, foram suspensos os estímulos carcinogênicos e os animais foram divididos em dois grupos, segundo randomização, a qual foi realizada de forma eletrônica em um gerador de sequência aleatória no qual foi possível produzir uma sequência de números inteiros distribuídos em 2 colunas. A primeira coluna representando o grupo CONTROLE e a segunda o grupo SORAFENIBE. O gerador de sequência aleatória pode ser visualizado no link: <https://www.random.org/sequences/>. O grupo sorafenibe foi marcado com uma linha verde na cauda.

- Controle (n=10): Administrado soro fisiológico a 0,9% (1 mL), diariamente, por gavagem, durante 3 semanas;
- Sorafenibe (n=20): Administrado 0,2 mL da solução de sorafenibe e polietilenoglicol a cada 100 g de peso dos animais, diariamente, por gavagem, durante 3 semanas. Para o preparo do Sorafenibe

foi realizada diluição de 50 mg de tosilato de sorafenibe (pureza 99,1% - Bayer Healthcare Pharmaceuticals, Germany) em 20 mL de polietilenoglicol (ULTRAPEG 400 USP, Brenntag Química Brasil Ltda). A dose do sorafenibe utilizada foi de 5 mg/kg/dia, baseada em estudos anteriores ^(56, 91).

Na 16ª semana, os ratos foram submetidos a ultrassonografia abdominal para quantificação, mensuração e localização dos nódulos hepáticos. O exame foi realizado por ultrassonografista experiente, utilizando o equipamento da Philips Ultrasound IU 22 (Bothell, WA, USA) com transdutor VL13-5 (tireóide), após anestésiar os animais com cloridrato de dextrocetamina 50 mg/ mL (Cristália, Brasil), com a dose de 15 mg intramuscular e realizar a tricotomia do abdome. Foram considerados nódulos suspeitos aqueles que eram maiores que 0,2 cm, sendo então catalogados de acordo com sua distribuição no parênquima hepático: lobo direito, lobo esquerdo, lobo médio e lobo caudado. Quando os ratos despertaram da sedação para o USG, foi administrada a primeira dose do sorafenibe ou placebo por gavagem conforme seu grupo. Após três semanas de tratamento com doses diárias, os animais foram levados ao LIM-43 para realização do PET com ¹⁸F-FDG. O efeito do sorafenibe foi avaliado pela repercussão da droga entre os grupos sobre: a histologia do CHC, a diminuição de CHC e alteração na captação do ¹⁸F-FDG no PET. Resumidamente, é possível acompanhar o delineamento deste estudo no esquema apresentado na figura 4.

Figura 4 - Esquema ilustrativo do delineamento do estudo

3.4 PET

As imagens de PET com ^{18}F -FDG foram realizadas em dois momentos: basal (semana 0 – antes do início do experimento) e semana 19 (ao término do experimento). O equipamento utilizado para imagens foi o PET/SPECT/TC para pequenos animais, modelo LabPET4 (Gamma Medical Ideas, Northridge, CA, U.S.A.), conforme mostra a figura 5.

Os animais foram anestesiados com isoflurano na dose de indução de 5% e oxigênio 100%, mantidos em isoflurano 2-3% e oxigênio a 100% antes do início de qualquer procedimento, vide figura 5. Quando anestesiados, pela primeira vez, foram realizadas: pesagem do animal, medição glicemia capilar (grupo controle $111 \pm 13,5$ mg/dL e grupo sorafenibe $115 \pm 21,7$ mg/dL) e injeção endovenosa, acesso obtido através da veia peniana, de

^{18}F -FDG (média de $1,02 \pm 0,17$ mCi ou $37,7 \pm 6,29$ MBq). Os animais foram acondicionados em caixa aquecida, despertando calmamente.

Após 45 min da injeção do radiotraçador, os animais foram anestesiados, pela segunda vez, e posicionados com o fígado no centro do campo de visão do PET para aquisição de imagens que foram realizadas por 30 min (3 posições de maca de 10 min cada). Durante todo o experimento, os animais tiveram monitorização respiratória. Na sequência, realizou-se a aquisição da tomografia computadorizada (TC) com 65 kVp, 165 μA em 512 projeções e magnificação de 1.3 para correlação anatômica.

As imagens de PET foram reconstruídas com campo de visão transversal de 100 mm, matriz de 240 x 240 e pixel de 0,42 x 0,42 mm, pelo método iterativo OSEM-3D, 20 iterações e 4 subsets. Já as imagens de TC foram reconstruídas com o método de Retroprojeção Filtrada, matriz de 512 x 512 e pixel de 0,17 x 0,17 mm. Ambas as imagens foram exportadas em formato DICOM e analisadas no software PMOD[®] (PMOD Technologies Ltd., Zurich, Switzerland).

As regiões de interesse (ROI) dos tumores foram desenhadas com base nas imagens obtidas por uma biomédica experiente. Os valores de captação destas regiões de interesse foram expressos em SUV, sendo calculados o SUVmédio e SUVmáximo. As ROI no fígado, medindo 3,74 mm x 4,81 mm x 3,82 mm (largura x altura x profundidade, respectivamente), foram desenhadas longe dos tumores, em três regiões: lobo hepático direito, médio e esquerdo (figura 6). Em seguida foi calculada a média da SUVmax destas regiões, para então calcular a relação entre SUVmax do tumor e do

fígado, e a relação entre o SUVmax do tumor e do músculo. Após finalização das imagens, os animais foram encaminhados dentro de microisoladores ao Biotério de Experimentação de Ratos do LIM-43 através do “pass-trough”, e mantidos por 10 meias-vidas do radioisótopo (18 horas). Após este período, foram transportados para o LIM-07.

Ilustração dos procedimentos realizados no LIM-43

PET/SPECT/TC – modelo LabPET4

Figura 5 - Ilustração do modelo de PET/TC utilizado no estudo e das etapas do exame. 1- aparelho de anestesia inalatória, 2- rato anestesiado dentro da caixa de indução, 3- rato anestesiado na dose de manutenção de isoflurano e oxigênio a 100% com a seringa ilustrativa usada para injeção do radiofármaco a direita dele e a esquerda do mesmo o glicosímetro ilustrativo, 4- rato anestesiado e posicionado antes da realização do PET, 5- ilustração da monitorização da frequência respiratória do animal enquanto o mesmo era submetido ao PET/TC

Figura 6 - Ilustração de como foi padronizado o desenho das regiões de interesse (ROI) do fígado para cálculo da média do SUVmax. Respectivamente, observam-se as ROI dos lobos direito, médio e esquerdo

3.5 Eutanásia

Após três dias da realização do PET ^{18}F -FDG, os animais foram anestesiados com cloridrato de dextroetamina 50 mg/ mL (Cristália, Brasil) na dose de 120 mg/Kg, por via intraperitoneal. Em seguida, foi realizada eutanásia por exsanguinação através da punção da Aorta. Espécimes de fígado foram coletados sendo 2 fragmentos do lobo esquerdo e 1 do lobo direito. Os maiores e mais visíveis tumores hepáticos vistos pelo PET/TC foram coletados separadamente para correlação entre histologia e achados na imagem.

Após o procedimento cirúrgico de retirada dos órgãos, os animais foram acondicionados em sacos brancos fornecidos pela FMUSP, etiquetados com as informações do laboratório e data, mantidos em freezer a -20°C até o momento em que foram retirados pela empresa contratada pela FMUSP, o que ocorre a cada dois dias, para então, serem incinerados.

3.6 Análise histológica

Fragmentos de tecido hepático previamente fixado em solução de formol a 4% foram processados e submetidos às colorações de hematoxilina-eosina. As amostras de fígado foram avaliadas de maneira cega por um patologista hepático experiente utilizando um sistema modificado da classificação padronizada por Kleiner e colaboradores em 2005 ⁽⁹²⁾, conforme mostra abaixo a tabela 2.

Tabela 2 - Classificação de Kleiner para o estadiamento da fibrose hepática secundária a EHNA e cálculo do escore de atividade necroinflamatória de acordo com os achados encontrados

Classificação de Kleiner para EHNA			
Estadiamento	Esteatose	Balonização	Inflamação Lobular
1	0	0	0
2	1	1	1
3	2	2	2
4	3		3

As variáveis histológicas estudadas foram: esteatose macrovesicular e microvesicular (0-3), inflamação lobular (0-3), balonização hepatocelular (0-2) e fibrose (0-4). Após a graduação de cada variável, foi realizada a soma dos resultados para se obter o escore de atividade da DHGNA (NAS, do inglês *NALFD Activity Score*). Os valores maiores ou iguais a 5 deram diagnóstico definitivo de EHNA, se igual a 3 ou 4 diagnóstico provável, e por fim, 1 ou 2 como não EHNA ⁽⁹²⁾. O CHC foi diagnosticado de acordo com características definidas especificamente para ratos por Thoolen et al., em

2010⁽⁹³⁾ e graduado de acordo com a classificação de Edmonson & Steiner⁽⁴⁸⁾, como mostrado na tabela 3.

Tabela 3 - Classificação de Edmondson-Steiner para Carcinoma hepatocelular, de acordo com características microscópicas vista na coloração de hematoxilina e eosina

Classificação de Edmondson-Steiner	
Grau	Achados histológicos
1	Células pequenas, dispostas em trabéculas, com citoplasma abundante, pouca irregularidade nuclear e pouco distinguíveis dos hepatócitos normais.
2	Nucléolos hipercromáticos proeminentes e irregularidade nuclear.
3	Mais células pleomórficas que o grau 2, com núcleos angulados.
4	Pleomorfismo celular significativo, apresentando com frequência células gigantes anaplásicas.

3.7 Imunohistoquímica

A pesquisa imunohistoquímica para as proteínas glutamina sintetase (GS), Antígeno específico de hepatócitos 1 (HEP-PAR-1) e citoqueratina-19 (CK-19) foi realizada no Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e avaliada por patologista veterinário experiente. Foram considerados CHC, aqueles nódulos que se apresentavam com a marcação positiva para GS ou HEP-

PAR-1, sendo negativa para CK-19. A diluição dos autoanticorpos utilizada foi: GS 1:3000, HEP-PAR-1 1:500 e CK-19 1:200. O método imunohistoquímico usado foi o de imunoperoxidase com recuperação antigênica pelo calor úmido. A técnica seguiu a seguinte sequência: desparafinização e hidratação das lâminas, recuperação antigênica, bloqueio da peroxidase endógena, incubação do anticorpo primário, visualização, desidratação e montagem das lâmina (ver figura 9). A desparafinização e hidratação foi realizada na ordem mostrada pela figura 7. Em seguida, realizou-se a recuperação antigênica dos tecidos na panela de pressão com tampão de EDTA pH 9,0 diluído na água destilada por 30 minutos. Após término, enxaguaram-se as cubas em água corrente e água destilada. Posteriormente, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio a 20% e metanol por 30 minutos, seguido da retirada do excesso do bloqueador e nova lavagem com tampão durante 1 minuto. No bloqueio de proteína, aplicou-se o “*Protein Block*” (SPD-125, Spring Bioscience, California, USA) por 10 minutos na estufa temperatura (20 a 25°C). Na incubação do anticorpo primário, diluiu-se o anticorpo na titulação desejada em diluente de anticorpo de coelho (ADS-125, Spring Bioscience, California, USA) e foi deixado por 60 minutos na estufa. Já no sistema de visualização, seguiu-se a sequência: uma gota do reagente “*Reveal HRP*” (SPD-125, Spring Bioscience, California, USA) por 10 minutos na estufa e, então, foi pingado uma gota do segundo reagente “*Conjugate HRP*” (SPD 125, Spring Bioscience, California, USA) por mais 15 minutos. O DAB Líquido (SPD 125, Spring Bioscience, California, USA) foi diluído,

adicionando 1 gota para 1 mL do substrato do DAB, e colocado uma gota desta solução na lâmina por 5 minutos. Após incubação do DAB, tirou-se o excesso do cromógeno, lavou-se em água corrente, seguido de água destilada. Para contra coloração, corou-se com Hematoxilina (75290, EMD, Massachusetts, USA) por 1 min. A desidratação e montagem das lâminas foram realizadas com método inverso ao usado inicialmente e as lâminas foram montadas utilizando Bálsamo do Canadá dissolvido em Xilol.

Figura 7 - Protocolo de imunohistoquímica

3.9 Análise estatística

A análise estatística foi feita utilizando o Excel e GraphPad Prism versão 7. A depender do padrão de distribuição das variáveis foram calculadas média ou mediana com seus desvios padrões. Para variáveis com distribuição Gaussiana foi usado teste t-student. Já para aquelas que não eram Gaussianas foi usado o teste de Mann-Whitney. E, por fim, para comparação entre os achados histológicos e os do PET foram usados os testes de qui-quadrado e regressão linear. Considerou-se o valor de significância estatística quando este era menor que 0,05.

4 RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Fluxograma do estudo

No início do estudo foram randomizados 30 ratos em dois grupos: sorafenibe e controle. Todos os animais chegaram vivos à semana 16, na qual foram suspensos os estímulos carcinogênicos e foi realizada ultrassonografia hepática para caracterização dos nódulos e avaliação homogeneidade dos grupos. A partir da 16ª semana, foi iniciado o tratamento com sorafenibe ou salina por gavagem com duração prevista por 3 semanas. Na figura 8 demonstramos o fluxograma da evolução do estudo.

Os animais começaram a falecer nos dois grupos após o tratamento com sorafenibe ou soro fisiológico. No grupo sorafenibe, houve a seguinte distribuição de óbitos conforme a semana: 16ª semana – 2 animais, 17ª semana – 2 animais, 18ª semana – 2 animais, 19ª semana – 6 animais. Já no grupo controle: 16ª semana – 2 animais, 17ª semana – 2 animais, 18ª semana – 2 animais. As causas dos óbitos variaram entre: pneumonia, complicação respiratória por metástase hepática, ruptura tumoral levando a ascite hemorrágica e durante a anestesia inalatória antes do PET ^{18}F -FDG.

A mortalidade nos dois grupos foi de 60%, não havendo diferença estatística entre os grupos. O grupo sorafenibe teve média de vida de $130,7 \pm 4,9$ dias, mediana de 133 dias. Em contrapartida, o grupo controle viveu $126,3 \pm 8,5$ dias, mediana de 130 dias. O animal que morreu mais precocemente no grupo sorafenibe tinha 115 dias de estudo, enquanto que o

do grupo controle 108 dias. Na figura 9 abaixo, pode-se visualizar a curva de sobrevida dos dois grupos.

Figura 8 - Fluxograma do estudo

Figura 9 - Curva de sobrevida nos dois grupos estudados

4.2 Peso

O peso dos animais foi semelhante no início do experimento e após administração do tratamento, demonstrando a homogeneidade dos grupos. Já no momento da eutanásia, realizada três dias após o PET, observou-se: 486 g $\pm$ 38 g no grupo controle e 394 g $\pm$ 48,5 g no grupo sorafenibe (p=0,003). Não houve também diferença entre o peso do fígado entre os grupos (ver tabela 4).

Tabela 4 - Evolução do peso de acordo com os dois grupos estudados

Peso (g)	Média controle (n=10)	Média sorafenibe (n=20)	p
16ª semana	479,5 $\pm$ 45,4	463 $\pm$ 46,2	0,28
19ª semana	440,5 $\pm$ 67	420 $\pm$ 34,4	0,24
Eutanásia	486,3 $\pm$ 38	394 $\pm$ 48,5	0,003
Peso do fígado	35 $\pm$ 4,6	27,5 $\pm$ 11,6	0,13

4.3 Achados no USG

Os achados ultrassonográficos obtidos na 16ª semana mostraram que os grupos eram homogêneos por apresentar média de nódulos por animal semelhante: $4,88 \pm 2,75$ no controle e $4,95 \pm 3,11$ no sorafenibe. Em relação à distribuição hepática destes nódulos, notou-se que eles se encontravam predominantemente no lobo esquerdo/médio em ambos os grupos. E o tamanho do maior nódulo também foi semelhante entre os grupos, conforme mostra a tabela 5. Observou-se ainda presença de ascite em 11% e 10% dos animais do grupo controle e sorafenibe, respectivamente.

Tabela 5 - Achados ultrassonográficos realizados na 16ª semana do experimento, antes do início do tratamento com sorafenibe ou placebo

USG fígado 16ª semana	Controle (n=10)	Sorafenibe (n=20)	p
Maior nódulo (cm)	$1,04 \pm 0,69$	$0,72 \pm 0,92$	0,34
Mediana de nódulos por animal	5	5	
Média de nódulos por animal	$4,88 \pm 2,75$	$4,95 \pm 3,11$	0,48
Quantidade de nódulos	44	99	
% de nódulos no lobo esquerdo/caudado	75	61	0,14
% de nódulos no lobo direito/médio	25	39	0,22
% de ascite	11	10	0,46

4.4 Achados do PET ^{18}F -FDG

O PET foi realizado em dois momentos no início do estudo e na 19ª semana. No início do estudo, todos os animais fizeram o PET e não foi vista nenhuma lesão hepática. Na 19ª semana, quatro animais do grupo controle e oito animais do grupo sorafenibe fizeram o PET. Os dois grupos apresentaram o mesmo número de lesões hipercaptantes: 34. Mas se observou que a média de nódulos por animal foi de $4,37 \pm 1,59$ no grupo sorafenibe e $8,5 \pm 3,7$ no controle ($p=0,006$). A figura 19 ilustra esta diferença de lesões hipercaptantes entre os dois grupos.

As lesões observadas no PET foram classificadas como hipercaptante homogênea ou hipercaptante com centro hipocaptante, como ilustrado na figura 11. Não houve diferença quanto ao aspecto das lesões no PET hipercaptantes com centro hipocaptante nos dois diferentes grupos ($p=0,23$): controle (2/34) e sorafenibe (5/34), conforme mostra a figura 12.

Figura 10 - Imagens ilustrativas da TC, PET com ^{18}F -FDG e fusão PET/TC nos dois grupos estudados. Nota-se que o grupo sorafenibe apresenta 3 lesões hipercaptantes no fígado, enquanto que o grupo controle tem 6 lesões hipercaptantes no fígado e outra no pulmão direito (seta branca)

Figura 11 - Imagens ilustrativas da TC, PET com ^{18}F -FDG e fusão PET/TC. Os círculos azuis escuros são as áreas de interesse de estudo e a fusão entre PET e TC. Pode-se notar que as lesões hipercaptantes são visualmente diferentes das hipercaptantes com centro hipocaptante

Figura 12 - Comparação entre o número total de lesões hipercaptantes homogênea (n=34) e com centro hipocaptante (n=34) entre o grupo controle e sorafenibe

4.5 SUV médio

O valor padronizado de captação médio do ^{18}F -FDG (SUVmed) das lesões hipercaptantes não foi diferente entre os grupos estudados: $1,748 \pm 0,1719$ no sorafenibe e $2,186 \pm 0,1698$ no controle ($p=0,07$), como mostra a figura 13.

Figura 13 - Comparação do SUV médio entre as lesões do grupo controle (n=34) e as lesões do grupo sorafenibe (n=34)

4.6 SUV máximo

A avidéz máxima do ^{18}F -FDG (SUVmáx), ou seja ponto máximo de captação do radiotraçador na região de interesse das lesões hipercaptantes, foi diferente entre os grupos estudados: $2,4 \pm 1,98$ no sorafenibe e $3,8 \pm 1,74$ no controle ($p=0,01$), como mostra a figura 14.

Figura 14 - Comparação do SUV máximo entre as lesões do grupo controle (n=34) e as lesões do grupo sorafenibe (n=34)

4.7 Correlação entre o grau de diferenciação do CHC e variáveis encontradas no PET ^{18}F -FDG

As variáveis encontradas no PET ^{18}F -FDG foram correlacionadas com o grau de diferenciação tumoral do CHC visto na histologia e classificado segundo Edmondson-Steiner. Na figura 15 é possível observar quatro gráficos de dispersão, mostrando correlação direta entre o CHC pouco diferenciado/indiferenciado (graus 3 e 4) e os maiores valores de SUVmed ($R^2 = 0,34$, $p=0,04$), SUVmax ($R^2 = 0,44$, $p=0,01$), relação Tumor SUVmax/Fígado SUVmax ($R^2 = 0,42$, $p=0,02$) e relação Tumor SUVmax/Músculo SUVmax ($R^2 = 0,54$, $p=0,006$).

Figura 15 - Gráficos de dispersão sobre correlação entre variável do PET e grau de diferenciação do CHC. A - correlação entre o grau de diferenciação do CHC e o SUV médio (SUVmed) captado pelas lesões, B - correlação entre o grau de diferenciação do CHC e o SUV máximo (SUVmax) captado pelas lesões, C - correlação entre o grau de diferenciação do CHC e a relação entre o SUVmax do tumor e o SUVmax do fígado, D – correlação entre grau de diferenciação do CHC e a relação entre SUVmax do tumor e o SUVmax do músculo

4.8 Achados histológicos

A média de CHC por animal foi menor no grupo sorafenibe quando comparado com o controle ($5,5 \pm 1,5$ vs $3,3 \pm 0,48$, $p=0,01$). E o grupo tratado com sorafenibe apresentou mais CHC bem diferenciado – grau I/II de Edmondson-Steiner – que o controle (39% vs 5%, respectivamente, $p=0,01$), bem como menor presença de CHC pouco diferenciado – grau III/IV de Edmondson-Steiner – que o grupo controle (52% vs 81%, $p=0,003$), como mostra a tabela 7 e figura 16. Não foi observada diferença estatística entre os grupos no que tange: escore de atividade necroinflamatória, estadiamento da fibrose hepática, invasão vascular, hemorragia intranodular, necrose nodular ou nódulos displásicos de baixo grau, como mostram as tabelas 6 e 7. A figura 17 ilustra todas as etapas da DHGNA, desde seu aspecto macroscópico, passando pela EHNA, cirrose e CHC. Já a figura 18 mostra a invasão vascular a distância de células do CHC. Na figura 19, observa-se o aspecto pleomórfico dos núcleos e trabecular do CHC na coloração com hematoxilina-eosina, e também a imunohistoquímica com GS, HEP-PAR-1 e CK-19. Por fim, a figura 20 reúne todos os aspectos estudados neste trabalho, desde a macroscopia, sua imagem correlata no PET e a anatomia patológica.

Tabela 6 - Distribuição dos achados histológicos do escore de atividade necroinflamatória e fibrose hepática no grupo controle (n=4) e grupo sorafenibe (n=8)

	Controle (n=4)	Sorafenibe (n=8)	Valor de p
NAS 4	100%	72%	0,23
NAS 6	0%	28%	
Estadio 3	0%	28%	0,23
Estadio 4	100%	72%	

Tabela 7 - Distribuição do anatomopatológico dos nódulos hepáticos quanto à invasão vascular, hemorragia intranodular, necrose nodular, nódulos displásicos de baixo grau, CHC grau I/II, CHC grau III/IV

	Controle (n=22)	Sorafenibe (n=23)	Valor de p
Média de CHC por animal	5,5 ± 1,5	3,3 ± 0,48	0,01
Invasão vascular	75%	43%	0,30
Hemorragia intranodular	31% (7/22)	43% (10/23)	0,49
Necrose	41% (9/22)	47% (11/23)	0,51
Nódulos displásicos de baixo grau	14% (3/22)	9% (2/23)	0,24
CHC grau I/II	5% (1/22)	39% (9/23)	0,01
CHC grau III/IV	81% (18/23)	52% (12/23)	0,003

Influência do tratamento sobre grau de diferenciação tumoral

Figura 16 - Influência do tratamento com sorafenibe (n=8) ou salina (n=4) sobre o grau de diferenciação tumoral

Figura 17 - Ilustração de achado macroscópico do fígado cirrótico com vários nódulos alguns regenerativos e outros CHC (A), esteatohepatite no aumento de 50x – coloração HE (B), cirrose no aumento de 50x – coloração HE (C) e transição entre parênquima hepático e CHC moderadamente diferenciado no aumento de 50x – coloração HE (D)

Figura 18 - Ilustração da presença de células cancerígenas dentro de vaso a distância do tumor, caracterizando invasão vascular (seta preta) no aumento de 200x – coloração HE

Figura 19 - Imagens ilustrativas do carcinoma hepatocelular grau 3 de Edmondson-Steiner no aumento de 200x – coloração HE (A), glutamina sintetase com marcação positiva no aumento de 200x (B), HEP-PAR-1 com marcação positiva no aumento de 400x e CK-19 com marcação apenas ductal no aumento de 400x

Figura 20 - Ilustração dos achados da macroscopia, do PET ^{18}F -FDG e da histologia de um animal tratado com sorafenibe. A - Aspecto macroscópico do fígado esteatótico com vários nódulos hepáticos, em específico atentar para o nódulo na ponta do lobo direito apontado pela seta laranja. B - Imagem da TC, PET e fusão PET-TC. Observa-se a seta branca indicando o mesmo nódulo no lobo direito com hipercaptação periférica e centro hipocaptante. C – Achados histológicos deste nódulo, na coloração de Hematoxilina-Eosina (HE), com aumento de 50x: 1- cirrose e inúmeros cistos biliares, 2- nódulos regenerativos da cirrose demarcados por linha tracejada, 3- aspecto microscópico do nódulo hepático visto em A e B, denotando CHC grau III de Edmondson-Steiner com hemorragia e necrose intranodular

5 DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Nosso estudo foi o primeiro a avaliar o efeito do sorafenibe no modelo experimental misto de CHC avançado secundário à DHGNA. Demonstramos o efeito deste fármaco na diminuição da média de CHC por animal, maior proporção de lesões bem diferenciadas (grau I/II de Edmondson-Steiner) no grupo tratado e menor SUVmax destas neoplasias. Mostramos também que houve correlação entre maior grau de avides ^{18}F -FDG das lesões hipercaptantes no PET e pior diferenciação histológica do CHC, e padronizamos a técnica do PET neste modelo para usá-lo como marcador de prognóstico em futuros trabalhos.

O sorafenibe é o único inibidor multiquinase aprovado para tratamento do CHC avançado (BCLC C) mesmo com resposta em um número pequeno de pacientes ⁽⁹⁴⁾. O BCLC C é composto por grupo heterogêneo de pacientes, os quais apresentam variado grau de disfunção hepática e diferentes etiologias da hepatopatia de base. Esta heterogeneidade nos estudos clínicos de CHC, que usaram o sorafenibe, pode representar a diferença de resposta à droga, já que é difícil estabelecer um tratamento único para tumores cujas vias sinalizadoras iniciais diferem entre si. Por exemplo, a cirrose por etiologia alcoólica ativa a via do CTNNB1, enquanto na do VHB é a da TP53 ⁽⁴⁴⁾. Além disso, nos estudos SHARP e ASIA-PACIFIC, o número de pacientes incluídos com CHC secundário à DHGNA foi muito baixo, e não encontramos na literatura nenhum trabalho

experimental que avaliasse a ação do sorafenibe no modelo animal específico de CHC secundário à DHGNA ^(58, 59, 64).

Mattina et al., 2016 ⁽⁹⁵⁾, publicaram metanálise sobre a eficácia antitumoral do sorafenibe em estudos pré-clínicos. Eles viram que em 95% dos modelos utilizados para avaliar esta eficácia foram em xenotransplantes humanos. Apesar da maior parte das linhagens celulares mostrarem ação robusta do sorafenibe em camundongos, outras, como a McA-RH7777, não responderam a este fármaco ⁽⁷⁰⁾. No nosso estudo, ele foi capaz de diminuir o número médio de CHC por animal (sorafenibe $3,3 \pm 0,48$ vs controle $5,5 \pm 1,5$, $p=0,01$), bem como diminuir agressividade das lesões (CHC grau III/IV no grupo controle 81% vs no sorafenibe 52%, $p=0,003$), mas não promoveu a cura completa.

Outro estudo experimental, publicado por Gross et al., 2015 ⁽⁷⁰⁾, comparou diferenças na resposta do sorafenibe entre o modelo com uso isolado do DEN na água por 8 semanas com o de implante de células cancerígenas no fígado através da injeção delas na veia porta. O modelo com DEN teve variabilidade intra e intertumoral, da mesma forma que ocorre nos humanos, enquanto que o de células cancerígenas foi mais homogêneo. Além disto, o sorafenibe teve ação somente sobre células do modelo DEN, diminuindo o crescimento e perfusão tumoral ⁽⁷⁰⁾.

Achados semelhantes foram demonstrados em outro trabalho que observou uma baixa resposta objetiva (3%) pelos critérios do RECIST ⁽⁹⁶⁾. E este padrão de resposta mais citostático que citotóxico também foi

observado em outro estudo clínico no qual cerca de 42% dos pacientes a doença ficou estável ou tiveram resposta menor/parcial ⁽⁹⁷⁾.

O nosso modelo misto de CHC secundário à DHGNA usa a dieta hiperlipídica para imitar o estilo de vida ocidental, associada ao DEN, recriando as etapas da história natural da DHGNA e a evolução para CHC em um período mais curto (16 semanas) com ativação das células ovais ⁽⁷²⁾. Encontramos, no presente trabalho, presença de fibrose avançada ou cirrose em todos os animais, além de CHC avançado com invasão vascular em 75% dos animais do grupo controle (n=4) e 43% dos animais no grupo tratado (n=8). Estes nossos achados enaltecem nosso modelo, porque na metanálise publicada Mattina et al., 2016 ⁽⁹⁵⁾, os estudos os animais eram mais jovens e com doença pouco avançada, não refletindo o microambiente hepático observado em seres humanos.

A mortalidade dos dois grupos foi semelhante a despeito do tratamento com sorafenibe (p=0,07). Sua taxa alta (60%) se justifica por serem animais gravemente doentes com cirrose hepática e carcinoma hepatocelular avançado, algumas vezes já com descompensação em ascite (cerca de 10% nos dois grupos) e metástase pulmonar. Nos seres humanos, o prognóstico do CHC avançado é sombrio com mediana de sobrevida de 6 meses ou 25% em 1 ano ⁽⁹⁴⁾. E em estudo que avaliou o PET-TC com ¹⁸F-FDG em ratos expostos apenas a DEN intraperitoneal dado uma vez por semana durante 16 semanas obteve mortalidade semelhante ao nosso estudo, cerca de 65% na 19ª semana ⁽⁷⁴⁾.

Vale salientar que a avaliação mais precisa do efeito do sorafenibe na sobrevida ficou prejudicada porque a eutanásia de todos os animais foi feita no mesmo momento: 3 dias após a realização do PET. Dada a perda amostral ao longo do experimento não quisemos correr o risco de perder mais nenhum animal, pela possibilidade de ter que refazer todo o experimento por não ter poder amostral.

Os animais dos grupos controle e sorafenibe apresentaram evolução semelhante quanto ao ganho e perda ponderal durante o estudo. Contudo, no momento da eutanásia o grupo sorafenibe tinha tido uma perda ponderal maior que o controle (controle 486,3 g $\pm$ 38 versus sorafenibe 394 g $\pm$ 48,5, $p=0,003$). Acreditamos que isso seja secundário à própria ação do sorafenibe. No estudo SHARP, cerca de 10% dos pacientes apresentaram perda ponderal como efeito adverso da medicação ⁽⁵⁸⁾. Postula-se que haja ligação entre os efeitos colaterais e maior concentração plasmática da droga, tal qual ocorre na síndrome mão-pé ⁽⁵¹⁾.

Antes do início do tratamento houve a certificação de que havia homogeneidade entre os grupos por meio de ultrassonografia. As lesões nodulares sugestivas de CHC maiores que 2 mm foram documentadas e a maioria delas se localizava nos lobos esquerdo/caudado, tanto no grupo controle quanto no tratado. Avaliamos também o tamanho do maior nódulo, média e mediana de nódulos por animal, presença de ascite, entretanto não encontramos diferença estatística destas variáveis entre os dois grupos estudados.

O desenvolvimento de marcador bioquímico ou ferramenta diagnóstica para identificar os tumores mais indiferenciados e agressivos vem sendo estudado, numa tentativa de melhor selecionar o paciente que será submetido ao tratamento curativo, ou seja transplante hepático/ressecção, nos estágios muito precoce e precoce ^(84, 94). O PET ¹⁸F-FDG surge como potencial ferramenta porque já foi demonstrado que maiores valores de SUVmax de ¹⁸F-FDG estão correlacionados com menor sobrevida global, CHC avançado, histologia indiferenciada (perda da expressão da p53) e maior recorrência pós-transplante hepático ^(74, 80, 83-90).

Lee et al. avaliaram, retrospectivamente, pacientes que foram submetidos a transplante hepático intervivos por CHC e tinham feito PET/CT ¹⁸F-FDG antes da cirurgia. Eles observaram que os pacientes com CHC apresentando SUVmax baixo (<3,2) tinham CHC mais bem diferenciado (grau I/II de Edmondson-Steiner), alfafetoproteína menor que 400ng/mL, estavam em maior proporção dentro dos critérios de Milão, tinham menor taxa de invasão microvascular e não tiveram recorrência do CHC após 3 anos de acompanhamento ⁽⁸⁹⁾.

Contudo, a medida do SUV pode estar sujeita a erro de mensuração a depender de quem analisa e interpreta as imagens. Neste contexto, outros índices volumétricos e de atividade metabólica foram usados para dar mais robustez aos resultados encontrados. Em estudo publicado por Kim et al., a relação entre o SUV do tumor e do fígado adjacente teve maior acurácia que o SUVmax na predição da recorrência de CHC pós-transplantes (Tumor SUVmax/Fígado SUVmax 0,869 versus SUVmax 0,762) ⁽⁸⁴⁾.

Por isto, avaliamos diferentes variáveis metabólicas no PET ^{18}F -FDG (SUVmed, SUVmax, Tumor SUVmax/Fígado SUVmax e Tumor SUVmax/Músculo SUVmax) e a que melhor se correlacionou diretamente com os valores encontrados e indiferenciação do CHC foi a relação Tumor SUVmax/Músculo SUVmax ($R^2 = 0,54$, $p=0,006$). As outras variáveis também tiveram significância estatística: SUVmed ($R^2 = 0,34$, $p=0,04$), SUVmax ($R^2 = 0,44$, $p=0,01$), relação Tumor SUVmax/Fígado SUVmax ($R^2 = 0,42$, $p=0,02$). Nos gráficos de dispersão apresentados na figura 15 podemos ver que os nódulos tiveram diagnóstico ou de CHC grau 2 ou grau 3, acreditamos que foi este o motivo R^2 não ter sido maior, ainda que tenha sido estatisticamente significativa.

Outros achados do PET relevantes observados no nosso estudo: média de lesões hipercaptantes por animal foi de $4,37 \pm 1,59$ no grupo sorafenibe e $8,5 \pm 3,7$ no controle ($p=0,006$), e a média do SUVmáx de todas as lesões que captaram ^{18}F -FDG foi diferente entre os grupos ($2,4 \pm 1,98$ no sorafenibe e $3,8 \pm 1,74$ no controle - $p=0,01$). Essa diferença de média de lesões hipercaptantes e SUVmáx entre os grupos se deve à ação do próprio fármaco, pois houve diminuição da quantidade de lesões indiferenciadas (grau III/IV de Edmondson-Steiner) no grupo tratado e são estas lesões mais agressivas que captam mais o ^{18}F -FDG ^(89, 98).

Torizuka et al. descreveram que o PET também é um método útil na avaliação da viabilidade tumoral após tratamento do CHC, pois eles viram que os nódulos com mais de 90% de necrose eram aqueles que pouco ou não captavam ^{18}F -FDG (SUVmed 0,13-0,58) ⁽⁹⁹⁾. O efeito do sorafenibe foi

avaliado sobre a diferença entre o padrão de captação das lesões (hipercaptante homogênea ou hipercaptante com centro hipocaptante), hemorragia e necrose tumoral. Todavia, não encontramos diferença entre os grupos ($p=0,23$, $p=0,49$ e $p=0,51$, respectivamente). Pode ser que isso tenha sido causado pela interferência da renovação celular aumentada na DHGNA e da inflamação desencadeada pelo acúmulo de lipídio intrahepático sobre a captação de FDG ⁽¹⁰⁰⁾.

A ausência do PET pré-tratamento é limitação do nosso estudo, porque não conseguimos acompanhar a evolução do mesmo nódulo com a mesma ferramenta diagnóstica ao longo do experimento. Todavia, a USG pré-tratamento mostrou que os grupos eram homogêneos e assim a comparação entre grupos com o PET ao término do experimento é factível, pois se eles eram semelhantes antes do tratamento e após o mesmo, ficaram diferentes, sugere a ação do fármaco.

Outra limitação do nosso estudo está relacionada ao próprio modelo animal usado, pois nele há exposição de dieta e água com DEN *ad libitum*, e mesmo sendo três animais por gaiola, existe sempre uma dominância de um dos animais, o qual tende a desenvolver mais neoplasia que os demais. Esta heterogeneidade entre os animais foi vista na quantidade diferente e na diversidade de grau dos CHC que cada um deles apresenta ⁽⁷²⁾.

Em suma, nosso modelo animal de DHGNA com progressão para CHC avançado é útil para o estudo mais aprofundado desta carcinogênese hepática específica; o sorafenibe, como era esperado, teve efeito benéfico

sobre o CHC secundário à DHGNA e o PET pode ser usado como marcador não invasivo de lesões mais agressivas neste modelo experimental.

6 CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

- 1) O sorafenibe reduziu o número de nódulos e a agressividade do CHC (mais lesões grau I/II que III/IV de Edmondson-Steiner), assim como reduziu SUVmax dos tumores neste modelo de CHC secundário à DHGNA.
- 2) A metodologia do PET foi padronizada no modelo de CHC avançado relacionado a DHGNA.
- 3) O PET ^{18}F -FDG pode ser utilizado como ferramenta diagnóstica para avaliar o grau de diferenciação histológica do CHC, uma vez que valores maiores de SUVmed, SUVmax, Tumor SUVmax/Fígado SUVmax e Tumor SUVmax/ Músculo SUVmax foram correlacionados com CHC pouco diferenciado ou indiferenciado.

8 REFERÊNCIAS

8 REFERÊNCIAS

1. European Association for the Study of the Liver (EASL). Electronic address: easloffice@easloffice.eu; European Association for the Study of Diabetes (EASD); European Association for the Study of Obesity (EASO). EASL-EASD-EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol*. 2016;64(6):1388-402.
2. Zoller H, Tilg H. Nonalcoholic fatty liver disease and hepatocellular carcinoma. *Metabolism*. 2016;65(8):1151-60.
3. Machado MV, Diehl AM. Pathogenesis of Nonalcoholic Steatohepatitis. *Gastroenterology*. 2016;150(8):1769-77.
4. Lazo M, Hernaez R, Eberhardt MS, Bonekamp S, Kamel I, Guallar E, et al. Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease in the United States: the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. *Am J Epidemiol*. 2013;178(1):38-45.
5. Vernon G, Baranova A, Younossi ZM. Systematic review: the epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults. *Aliment Pharmacol Ther*. 2011;34(3):274-85.
6. Williams CD, Stengel J, Asike MI, Torres DM, Shaw J, Contreras M, et al. Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis among a largely middle-aged population utilizing ultrasound and liver biopsy: a prospective study. *Gastroenterology*. 2011;140(1):124-31.

7. Cotrim HP, Parise ER, Oliveira CP, Leite N, Martinelli A, Galizzi J, et al. Nonalcoholic fatty liver disease in Brazil. Clinical and histological profile. *Ann Hepatol.* 2011;10(1):33-7.
8. Ruhl CE, Everhart JE. Fatty liver indices in the multiethnic United States National Health and Nutrition Examination Survey. *Aliment Pharmacol Ther.* 2015;41(1):65-76.
9. Browning JD, Szczepaniak LS, Dobbins R, Nuremberg P, Horton JD, Cohen JC, et al. Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. *Hepatology.* 2004;40(6):1387-95.
10. Younossi ZM, Stepanova M, Afendy M, Fang Y, Younossi Y, Mir H, et al. Changes in the prevalence of the most common causes of chronic liver diseases in the United States from 1988 to 2008. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2011;9(6):524-30 e1; quiz e60.
11. Yilmaz Y, Younossi ZM. Obesity-associated nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Liver Dis.* 2014;18(1):19-31.
12. Feijo SG, Lima JM, Oliveira MA, Patrocinio RM, Moura-Junior LG, Campos AB, et al. The spectrum of non alcoholic fatty liver disease in morbidly obese patients: prevalence and associate risk factors. *Acta Cir Bras.* 2013;28(11):788-93.
13. Batista Filho M, Rissin A. [Nutritional transition in Brazil: geographic and temporal trends]. *Cad Saude Publica.* 2003;19 Suppl 1:S181-91.
14. Rtveldadze K, Marsh T, Webber L, Kilpi F, Levy D, Conde W, et al. Health and economic burden of obesity in Brazil. *PLoS One.* 2013;8(7):e68785.

15. McCullough AJ. Pathophysiology of nonalcoholic steatohepatitis. *J Clin Gastroenterol*. 2006;40(Suppl 1):S17-S29.
16. Rinella ME. Nonalcoholic fatty liver disease: a systematic review. *JAMA*. 2015;313(22):2263-73.
17. Kikuchi L, Oliveira CP, Carrilho FJ. Nonalcoholic fatty liver disease and hepatocellular carcinoma. *Biomed Res Int*. 2014;2014:106247.
18. Tsatsoulis A, Mantzaris MD, Bellou S, Andrikoula M. Insulin resistance: an adaptive mechanism becomes maladaptive in the current environment - an evolutionary perspective. *Metabolism*. 2013;62(5):622-33.
19. Xu A, Wang Y, Keshaw H, Xu LY, Lam KS, Cooper GJ. The fat-derived hormone adiponectin alleviates alcoholic and nonalcoholic fatty liver diseases in mice. *J Clin Invest*. 2003;112(1):91-100.
20. Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, Jessurun J, Boldt MD, Parks EJ. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest*. 2005;115(5):1343-51.
21. Sun B, Karin M. Obesity, inflammation, and liver cancer. *J Hepatol*. 2012;56(3):704-13.
22. Muse ED, Obici S, Bhanot S, Monia BP, McKay RA, Rajala MW, et al. Role of resistin in diet-induced hepatic insulin resistance. *J Clin Invest*. 2004;114(2):232-9.
23. Satoh H, Nguyen MT, Miles PD, Imamura T, Usui I, Olefsky JM. Adenovirus-mediated chronic "hyper-resistinemia" leads to in vivo insulin resistance in normal rats. *J Clin Invest*. 2004;114(2):224-31.

24. Wigg AJ, Roberts-Thomson IC, Dymock RB, McCarthy PJ, Grose RH, Cummins AG. The role of small intestinal bacterial overgrowth, intestinal permeability, endotoxaemia, and tumour necrosis factor alpha in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *Gut*. 2001;48(2):206-11.
25. Miele L, Valenza V, La Torre G, Montalto M, Cammarota G, Ricci R, et al. Increased intestinal permeability and tight junction alterations in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2009;49(6):1877-87.
26. Brun P, Castagliuolo I, Di Leo V, Buda A, Pinzani M, Palu G, et al. Increased intestinal permeability in obese mice: new evidence in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2007;292(2):G518-25.
27. Arrese M, Cabrera D, Kalergis AM, Feldstein AE. Innate immunity and inflammation in NAFLD/NASH. *Dig Dis Sci*. 2016;61(5):1294-303.
28. Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*. 2006;444(7122):1027-31.
29. Backhed F, Ding H, Wang T, Hooper LV, Koh GY, Nagy A, et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(44):15718-23.
30. Cope K, Risby T, Diehl AM. Increased gastrointestinal ethanol production in obese mice: implications for fatty liver disease pathogenesis. *Gastroenterology*. 2000;119(5):1340-7.
31. Ding L, Yang L, Wang Z, Huang W. Bile acid nuclear receptor FXR and digestive system diseases. *Acta Pharm Sin B*. 2015;5(2):135-44.

32. Merry TL, Tran M, Dodd GT, Mangiafico SP, Wiede F, Kaur S, et al. Hepatocyte glutathione peroxidase-1 deficiency improves hepatic glucose metabolism and decreases steatohepatitis in mice. *Diabetologia*. 2016 Sep 15.
33. Llovet J, Villanueva A, Lachenmayer A, Finn R. Advances in targeted therapies for hepatocellular carcinoma in the genomic era. *Nature Reviews Clinical Oncology*. 2015;12(7):408-24.
34. Bruix J, Han KH, Gores G, Llovet JM, Mazzaferro V. Liver cancer: Approaching a personalized care. *J Hepatol*. 2015;62(1 Suppl):S144-56.
35. Goossens N, Sun X, Hoshida Y. Molecular classification of hepatocellular carcinoma: potential therapeutic implications. *Hepat Oncol*. 2015;2(4):371-9.
36. Committee ACPRW, Sawyers CL, Abate-Shen C, Anderson KC, Barker A, Baselga J, et al. AACR Cancer Progress Report 2013. *Clin Cancer Res*. 2013;19(20 Suppl):S4-98.
37. Baffy G, Brunt EM, Caldwell SH. Hepatocellular carcinoma in non-alcoholic fatty liver disease: an emerging menace. *J Hepatol*. 2012;56(6):1384-91.
38. Bittencourt PL, Farias AQ, Couto CA. Liver Transplantation in Brazil. *Liver Transpl*. 2016;22(9):1254-8.
39. Paranagua-Vezozzo DC, Ono SK, Alvarado-Mora MV, Farias AQ, Cunha-Silva M, Franca JI, et al. Epidemiology of HCC in Brazil: incidence and risk factors in a ten-year cohort. *Ann Hepatol*. 2014;13(4):386-93.

40. Signorelli IV, Goncalves PL, Goncalves LL, Ferreira LS, Mendonca AT, Franklin GL, et al. Socioeconomic disparities in access to a hepatocellular carcinoma screening program in Brazil. *Clinics (Sao Paulo)*. 2016;71(7):361-4.
41. Aravalli RN, Cressman EN, Steer CJ. Cellular and molecular mechanisms of hepatocellular carcinoma: an update. *Arch Toxicol*. 2013; 87(2):227-47.
42. Goossens N, Hoshida Y. Is hepatocellular cancer the same disease in alcoholic and nonalcoholic fatty liver diseases? *Gastroenterology*. 2016; 150(8):1710-7.
43. Cabillic F, Corlu A. Regulation of transdifferentiation and retrodifferentiation by inflammatory cytokines in hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 2016;151(4):607-15.
44. Schulze K, Imbeaud S, Letouze E, Alexandrov L, Calderaro J, Rebouissou S, et al. Exome sequencing of hepatocellular carcinomas identifies new mutational signatures and potential therapeutic targets. *Nat Genet*. 2015;47(5):505-11.
45. Starley BQ, Calcagno CJ, Harrison SA. Nonalcoholic fatty liver disease and hepatocellular carcinoma: a weighty connection. *Hepatology*. 2010;51(5):1820-32.
46. Hu W, Feng Z, Eveleigh J, Iyer G, Pan J, Amin S, et al. The major lipid peroxidation product, trans-4-hydroxy-2-nonenal, preferentially forms DNA adducts at codon 249 of human p53 gene, a unique mutational hotspot in hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis*. 2002;23(11):1781-9.

47. Younossi Z, Otgonsuren M, Henry L, Venkatesan C, Mishra A, Erario M, et al. Association of Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) with Hepatocellular Carcinoma (HCC) in the United States from 2004 to 2009. *Hepatology*. 2015;62(6):1723-30.
48. Schlageter M, Terracciano LM, D'Angelo S, Sorrentino P. Histopathology of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*. 2014; 20(43):15955-64.
49. Salomao M, Yu WM, Brown RS, Jr., Emond JC, Lefkowitz JH. Steatohepatic hepatocellular carcinoma (SH-HCC): a distinctive histological variant of HCC in hepatitis C virus-related cirrhosis with associated NAFLD/NASH. *Am J Surg Pathol*. 2010;34(11):1630-6.
50. Campos PB. Caracterização histológica e imunohistoquímica do carcinoma hepatocelular secundário à esteato-hepatite não alcoólica (EHNA). São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2016.
51. Edginton AN, Zimmerman EI, Vasilyeva A, Baker SD, Panetta JC. Sorafenib metabolism, transport, and enterohepatic recycling: physiologically based modeling and simulation in mice. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2016;77(5):1039-52.
52. Mussunoor S, Murray GI. The role of annexins in tumour development and progression. *J Pathol*. 2008;216(2):131-40.
53. Zhang M, Dai C, Zhu H, Chen S, Wu Y, Li Q, et al. Cyclophilin A promotes human hepatocellular carcinoma cell metastasis via regulation of MMP3 and MMP9. *Mol Cell Biochem*. 2011;357(1-2):387-95.

-
54. Peck-Radosavljevic M, Greten TF, Lammer J, Rosmorduc O, Sangro B, Santoro A, et al. Consensus on the current use of sorafenib for the treatment of hepatocellular carcinoma. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2010;22(4):391-8.
55. Wilhelm SM, Adnane L, Newell P, Villanueva A, Llovet JM, Lynch M. Preclinical overview of sorafenib, a multikinase inhibitor that targets both Raf and VEGF and PDGF receptor tyrosine kinase signaling. *Mol Cancer Ther*. 2008;7(10):3129-40.
56. Yoshiji H, Noguchi R, Namisaki T, Moriya K, Kitade M, Aihara Y, et al. Combination of sorafenib and angiotensin-II receptor blocker attenuates preneoplastic lesion development in a non-diabetic rat model of steatohepatitis. *J Gastroenterol*. 2014;49(10):1421-9.
57. Wilhelm SM, Carter C, Tang L, Wilkie D, McNabola A, Rong H, et al. BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis. *Cancer Res*. 2004;64(19):7099-109.
58. Llovet J, Ricci S, Mazzaferro V, Hilgard P, Gane E, Blanc J, et al. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med*. 2008;359(4):378-90.
59. Cheng A, Kang Y, Chen Z, Tsao C, Qin S, Kim J, et al. Efficacy and safety of sorafenib in patients in the Asia-Pacific region with advanced hepatocellular carcinoma: a phase III randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Oncol*. 2009;10(1):25-34.
60. Chen J, Jin R, Zhao J, Liu J, Ying H, Yan H, et al. Potential molecular, cellular and microenvironmental mechanism of sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett*. 2015;367(1):1-11.

61. Stefano J, Pereira I, Torres M, Bida P, Coelho A, Xerfan M, et al. Sorafenib prevents liver fibrosis in a non-alcoholic steatohepatitis (NASH) rodent model. *Braz J Med Biol Res.* 2015;48(5):408-14.
62. Yang Y, Liu R, Lee P, Yeh Y, Huang Y, Lee W, et al. Anti-VEGFR agents ameliorate hepatic venous dysregulation/microcirculatory dysfunction, splanchnic venous pooling and ascites of NASH-cirrhotic rat. *Liver Int.* 2014;34(4):521-34.
63. Hoshida Y, Fuchs BC, Tanabe KK. Prevention of hepatocellular carcinoma: potential targets, experimental models, and clinical challenges. *Curr Cancer Drug Targets.* 2012;12(9):1129-59.
64. Wu J. Utilization of animal models to investigate non-alcoholic steatohepatitis-associated hepatocellular carcinoma. *Oncotarget.* 2016 Apr 7.
65. Asgharpour A, Cazanave SC, Pacana T, Seneshaw M, Vincent R, Banini BA, et al. A diet-induced animal model of non-alcoholic fatty liver disease and hepatocellular cancer. *J Hepatol.* 2016;65(3):579-88.
66. Tetri LH, Basaranoglu M, Brunt EM, Yerian LM, Neuschwander-Tetri BA. Severe NAFLD with hepatic necroinflammatory changes in mice fed trans fats and a high-fructose corn syrup equivalent. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2008;295(5):G987-95.
67. Dowman JK, Hopkins LJ, Reynolds GM, Nikolaou N, Armstrong MJ, Shaw JC, et al. Development of hepatocellular carcinoma in a murine model of nonalcoholic steatohepatitis induced by use of a high-fat/fructose diet and sedentary lifestyle. *Am J Pathol.* 2014;184(5):1550-61.
68. Sanches SC, Ramalho LN, Augusto MJ, da Silva DM, Ramalho FS. Nonalcoholic steatohepatitis: a search for factual animal models. *Biomed Res Int.* 2015;2015:574832.

69. Park JH, Kang JH, Lee YJ, Kim KI, Lee TS, Kim KM, et al. Evaluation of diethylnitrosamine- or hepatitis B virus X gene-induced hepatocellular carcinoma with 18F-FDG PET/CT: a preclinical study. *Oncol Rep.* 2015; 33(1):347-53.
70. Gross C, Steiger K, Sayyed S, Heid I, Feuchtinger A, Walch A, et al. Model matters: differences in orthotopic rat hepatocellular carcinoma physiology determine therapy response to sorafenib. *Clin Cancer Res.* 2015;21(19):4440-50.
71. Kornek M, Raskopf E, Tolba R, Becker U, Klockner M, Sauerbruch T, et al. Accelerated orthotopic hepatocellular carcinomas growth is linked to increased expression of pro-angiogenic and prometastatic factors in murine liver fibrosis. *Liver Int.* 2008;28(4):509-18.
72. de Lima VM, Oliveira C, Alves VAF, Charnmas MC, Oliveira EP, Stefano JT, et al. A rodent model of NASH with cirrhosis, oval cell proliferation and hepatocellular carcinoma. *J Hepatol.* 2008;49(6):1055-61.
73. Carvalho CF, Chammas MC, Souza de Oliveira CP, Cogliati B, Carrilho FJ, Cerri GG. Elastography and contrast-enhanced ultrasonography in the early detection of hepatocellular carcinoma in an experimental model of nonalcoholic steatohepatitis. *J Clin Exp Hepatol.* 2013;3(2):96-101.
74. Park SI, Lee JH, Ham HJ, Jung YJ, Park MS, Lee J, et al. Evaluation of 2-[18F]-fluoro-2-deoxy-D-glucose positron emission tomography/computed tomography in rat models with hepatocellular carcinoma with liver cirrhosis. *Biomed Mater Eng.* 2015;26 Suppl 1:S1669-76.
75. Basu S, Kwee TC, Surti S, Akin EA, Yoo D, Alavi A. Fundamentals of PET and PET/CT imaging. *Ann N Y Acad Sci.* 2011;1228:1-18.

-
76. LeBlanc A, Peremans K. PET and SPECT imaging in veterinary medicine. *Semin Nucl Med.* 2014;44(1):47-56.
77. Wadsak W, Mitterhauser M. Basics and principles of radiopharmaceuticals for PET/CT. *Eur J Radiol.* 2010;73(3):461-9.
78. Lan BY, Kwee SA, Wong LL. Positron emission tomography in hepatobiliary and pancreatic malignancies: a review. *Am J Surg.* 2012; 204(2):232-41.
79. Fine E, Herbst L, Jelicks L, Koba W, Theele D. Small-animal research imaging devices. *Semin Nucl Med.* 2014;44(1):57-65.
80. Brito AF, Abrantes AM, Ribeiro M, Oliveira R, Casalta-Lopes J, Goncalves AC, et al. Fluorine-18 fluorodeoxyglucose uptake in hepatocellular carcinoma: correlation with glucose transporters and p53 expression. *J Clin Exp Hepatol.* 2015;5(3):183-9.
81. Kinahan PE, Fletcher JW. Positron emission tomography-computed tomography standardized uptake values in clinical practice and assessing response to therapy. *Semin Ultrasound CT MR.* 2010;31(6):496-505.
82. Lee J, Park J, Kim D, Ahn S, Han K, Seo H, et al. Prognostic value of 18F-FDG PET for hepatocellular carcinoma patients treated with sorafenib. *Liver Int.* 2011;31(8):1144-9.
83. Cho E, Jun CH, Kim BS, Son DJ, Choi WS, Choi SK. 18F-FDG PET CT as a prognostic factor in hepatocellular carcinoma. *Turk J Gastroenterol.* 2015;26(4):344-50.

-
84. Kim YI, Paeng JC, Cheon GJ, Suh KS, Lee DS, Chung JK, et al. Prediction of posttransplantation recurrence of hepatocellular carcinoma using metabolic and volumetric indices of 18F-FDG PET/CT. *J Nucl Med*. 2016;57(7):1045-51.
85. Sun DW, An L, Wei F, Mu L, Shi XJ, Wang CL, et al. Prognostic significance of parameters from pretreatment (18)F-FDG PET in hepatocellular carcinoma: a meta-analysis. *Abdom Radiol (NY)*. 2016;41(1):33-41.
86. Lee SD, Lee B, Kim SH, Joo J, Kim SK, Kim YK, et al. Proposal of new expanded selection criteria using total tumor size and (18)F-fluorodeoxyglucose - positron emission tomography/computed tomography for living donor liver transplantation in patients with hepatocellular carcinoma: The National Cancer Center Korea criteria. *World J Transplant*. 2016;6(2):411-22.
87. Detry O, Govaerts L, Deroover A, Vandermeulen M, Meurisse N, Malenga S, et al. Prognostic value of (18)F-FDG PET/CT in liver transplantation for hepatocarcinoma. *World J Gastroenterol*. 2015;21(10):3049-54.
88. Cho Y, Lee DH, Lee YB, Lee M, Yoo JJ, Choi WM, et al. Does 18F-FDG positron emission tomography-computed tomography have a role in initial staging of hepatocellular carcinoma? *PLoS One*. 2014;9(8):e105679.
89. Lee SD, Kim SH, Kim YK, Kim C, Kim SK, Han SS, et al. (18)F-FDG-PET/CT predicts early tumor recurrence in living donor liver transplantation for hepatocellular carcinoma. *Transpl Int*. 2013;26(1):50-60.

-
90. Kornberg A, Kupper B, Tannapfel A, Buchler P, Krause B, Witt U, et al. Patients with non-[18 F]fludeoxyglucose-avid advanced hepatocellular carcinoma on clinical staging may achieve long-term recurrence-free survival after liver transplantation. *Liver Transpl.* 2012;18(1):53-61.
91. Chen KF, Tai WT, Liu TH, Huang HP, Lin YC, Shiau CW, et al. Sorafenib overcomes TRAIL resistance of hepatocellular carcinoma cells through the inhibition of STAT3. *Clin Cancer Res.* 2010;16(21):5189-99.
92. Kleiner D, Brunt E, Van Natta M, Behling C, Contos M, Cummings O, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology.* 2005;41(6):1313-21.
93. Thoolen B, Maronpot RR, Harada T, Nyska A, Rousseaux C, Nolte T, et al. Proliferative and nonproliferative lesions of the rat and mouse hepatobiliary system. *Toxicol Pathol.* 2010;38(7 Suppl):5S-81S.
94. Llovet J, Lencioni R, Di Bisceglie A, Gaile P, Dufour J, Greten T, et al. EASL-EORTC Clinical Practice Guidelines: management of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol.* 2012;56(4):908-43.
95. Mattina J, MacKinnon N, Henderson VC, Fergusson D, Kimmelman J. Design and reporting of targeted anticancer preclinical studies: a meta-analysis of animal studies investigating sorafenib antitumor efficacy. *Cancer Res.* 2016;76(16):4627-36.
96. Villanueva A, Llovet JM. Targeted therapies for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology.* 2011;140(5):1410-26.
97. Abou-Alfa GK, Schwartz L, Ricci S, Amadori D, Santoro A, Figer A, et al. Phase II study of sorafenib in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol.* 2006;24(26):4293-300.

98. Seo S, Hatano E, Higashi T, Hara T, Tada M, Tamaki N, et al. Fluorine-18 fluorodeoxyglucose positron emission tomography predicts tumor differentiation, P-glycoprotein expression, and outcome after resection in hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2007;13(2 Pt 1):427-33.

99. Torizuka T, Tamaki N, Inokuma T, Magata Y, Yonekura Y, Tanaka A, et al. Value of fluorine-18-FDG-PET to monitor hepatocellular carcinoma after interventional therapy. *J Nucl Med.* 1994;35(12):1965-9.

100. Bural GG, Torigian DA, Burke A, Houseni M, Alkhawaldeh K, Cucchiara A, et al. Quantitative assessment of the hepatic metabolic volume product in patients with diffuse hepatic steatosis and normal controls through use of FDG-PET and MR imaging: a novel concept. *Mol Imaging Biol.* 2010;12(3):233-9.