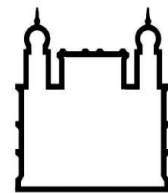




**UFBA**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**



**FIOCRUZ**

**Curso de Pós-Graduação em Patologia Humana**

**TESE DE DOUTORADO**

**PARTICIPAÇÃO DA VIA HEDGEHOG E CARCINOGENESE  
ESPONTÂNEA NA DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO  
ALCOÓLICA**

**JULIANA RIBEIRO DE FREITAS**

**Salvador – Bahia  
2017**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Patologia Humana**

**PARTICIPAÇÃO DA VIA HEDGEHOG E CARCINOGENESE  
ESPONTÂNEA NA DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO  
ALCOÓLICA**

**JULIANA RIBEIRO DE FREITAS**

Orientadora: Dra. Patrícia Sampaio Tavares Veras

Tese apresentada ao Curso de  
Pós-Graduação em Patologia  
Humana para a obtenção do grau  
de Doutor.

**Salvador – Bahia  
2017**

Fontes de Financiamento:

Instituto Gonçalo Moniz/FIOCRUZ  
CNPq- Edital 15

## **DEDICATÓRIA**

Para Rafael e Marcelo, claro!



## AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora, Dra. Patrícia Veras, pela confiança e orientação presente e cuidadosa, desde a Iniciação Científica.

À Yan Mueller, pelo amor, companheirismo, compreensão e ao “siga em frente” sempre.

À Marcelo Mueller e Rafael Mueller por existirem, pelo amor que “dói” de tão grande e que me faz tentar ser uma pessoa melhor a cada dia.

À meu pai, Luiz Freitas, pela amizade, ouvinte de todas as horas, incentivo na Medicina e na vida Acadêmica. Pelos conselhos, críticas e por ler esse texto tantas vezes...

À minha mãe, Nelmacy Freitas, pelo amor, amizade e pelo apoio durante a execução desse trabalho e em todos os outros momentos, sempre disponível.

À minha irmã, Mariana Freitas, pela amizade e apoio sempre. Ao pequeno Heitor Lobo por trazer tanta alegria à minha vida e à Antonio César Lobo, pela amizade e presença.

À Nataly Silva, Alexandre Carneiro, Estefane Evelyn Gaspar e Eduardo Marques, alunos de Iniciação Científica que contribuíram para a realização desse trabalho e que hoje já são médicos! Em especial à Nataly, minha primeira aluna de iniciação científica que seguiu os passos da Anatomia Patológica e hoje é minha colega e amiga de especialidade.

À Luana Palma, Beatriz Dias, Niara Almeida, Carlos Eduardo Guedes e Manoela Solcà amigos do LPBI que contribuíram para a execução desse trabalho de forma fundamental e com afinco. Sem vocês não seria possível concluí-lo.

À Maria da Conceição, Maria Amélia Sodré e toda a equipe técnica do IMAGEPAT pelo auxílio e cuidado com as amostras para processamento técnico.

À Thiago Almeida pela colabora o fundamental em diversas etapas desse trabalho, sempre com aten o e disponibilidade, mesmo   distância.

À Marta Machado, pela colaboração na imuno-histoquímica com perfeccionismo e dedicação.

À Siane Souza, Alice Kiperstok e ao grupo do Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia do IGM, pelo auxílio e orientações sobre a reprodução do modelo e cuidado com os animais.

À equipe do Biotério do Instituto Gonçalo Moniz, em especial a Rejane Marcia Menezes, pelo cuidado com os animais.

À Dr. Ricardo David Couto e à sua equipe, em especial à Felipe Miranda pelo auxílio nas dosagens bioquímicas no Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia.

À Dr. Paulo Saldiva e à Dra. Thais Mauad e a toda equipe do Laboratório de Poluição Ambiental da Faculdade de Medicina USP, cuja parceria foi fundamental para realização desse trabalho.

Aos amigos do LPBI, José Geraldo Bomfim, Antonio Petersen, Lairton Borja, Juliana Perrone e Débora Fraga pelo convívio amigável.

À Dr. Washington Luis dos Santos pelo convívio e pelas ideias e orientações sempre marcantes.

Aos amigos e colegas do IMAGEPAT, Nathanael Pinheiro, Marcos Vinícius Pinheiro, Daniel Athanazio, Christiana Vinhas, Paulo Athanazio, Carlos Leonardo Guimarães, Marcia Helena Castro, Fabiane Sarmento, Nataly Silva, Isabela Pimenta e Aristides Cheto pela amizade e convívio agradável e feliz. Em especial a Nathanael e Marcos Vinícius, por assumirem parte do meu trabalho para que eu pudesse me dedicar ao Doutorado e a Daniel, pelo incentivo e sugestões valiosas.

Aos colegas do Instituto Médico Legal Nina Rodrigues, em especial a Dra. Renée Amorim Félix pela ajuda na rotina e no dia-a-dia para que eu pudesse finalizar o Doutorado. Agradeço também à Diretoria e Coordenação Médica do IML pelas licenças concedidas para finalização desse trabalho.

À minha amiga Daniela Frazão pelo apoio, amizade e incentivo constantes.

Às minhas amigas queridas: Dulce Viana, Sheili Franco, Ticiane Almeida, Eny Dórea, Ana Paula Sena, Maria Soledad Gonzalez, Ana Cláudia Cabral, Camila Veloso pela amizade verdadeira e referências, sempre.

À todos os funcionários do Instituto Gonçalo Moniz, em especial à Flávia Paixão, Simone Fortunato e Ana Carolina Sodré pelo auxílio durante o Doutorado.

À Ana Maria Fiscina Vaz Sampaio pelo auxílio na formatação do texto, sempre com extrema gentileza.

À Maria Miranda, Rosália da Paixão e Eleilza Ramos, pessoas cujo trabalho foi fundamental para que eu pudesse me dedicar a esse projeto.

Aos meus avós queridos, Luiz Antonio de Freitas Neto, Ruth Freitas, Nivalda Vaz Ribeiro dos Santos e Zequias Andrade, exemplos de amor, dedicação e incentivo.

FREITAS, Juliana Ribeiro de. Participação da via Hedgehog e carcinogênese espontânea na doença hepática gordurosa não alcoólica. 91 f. il. Tese (Doutorado em Patologia) – Universidade Federal da Bahia. Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, Salvador, 2017.

## RESUMO

**INTRODUÇÃO:** A doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) é uma condição associada à obesidade, que afeta adultos e crianças em todo o mundo. Atualmente, é considerada como manifestação hepática da síndrome metabólica e estima-se que nas duas próximas décadas será a doença hepática mais prevalente no mundo. Na patologia, a DHGNA varia de esteatose pura à esteato-hepatite (EHNA), quando a esteatose é acompanhada de balonização hepatocelular e/ou inflamação lobular e/ou fibrose peri-sinusoidal. Pacientes com EHNA têm maior risco de desenvolvimento de cirrose. Estudos mostram que um percentual menor de pacientes com esteatose pura podem também evoluir para cirrose. Pacientes com EHNA têm risco maior de desenvolvimento de carcinoma hepatocelular (CHC), mesmo sem cirrose estabelecida. Os mecanismos envolvidos na progressão da DHGNA e carcinogênese não são bem conhecidos. A via de sinalização Hedgehog (Hh) parece estar envolvida na agressão e regeneração hepáticas na DHGNA. **OBJETIVO:** avaliar a participação da via Hh no parênquima hepático e no CHC em modelo de camundongos com DHGNA induzido por dieta. **METODOLOGIA:** Camundongos C57BL/6 foram alimentados com dieta hipercalórica por 11 meses. Após eutanásia, foi colhido soro para dosagem bioquímica e retirado fígado para exame anatomopatológico, imuno-histoquímica e avaliação de expressão gênica. O grupo controle foi alimentado com ração regular do biotério. **RESULTADOS:** Os animais alimentados com dieta hipercalórica desenvolveram obesidade, diabetes, elevação de colesterol e de enzimas hepáticas. Todos os animais obesos apresentaram EHNA, sendo que 40% desses animais desenvolveram CHC, do tipo esteato-hepatítico. A avaliação da via Hh mostrou ativação da via no parênquima dos animais obesos e nos CHC, com intensa produção de osteopontina (OPN). Houve maior ativação da via Hh no parênquima não neoplásico dos animais que desenvolveram CHC do que nos animais obesos sem CHC. **CONCLUSÃO:** O modelo de indução de DHGNA por dieta em camundongos resultou em EHNA em todos os animais obesos, com desenvolvimento de CHC espontâneo. Foi detectada ativação da via Hh nos fígados dos animais com EHNA e nos CHC. A ativação da via Hh no parênquima hepático dos animais obesos precede o surgimento do CHC, indicando que essa ativação com produção de OPN é um evento precoce nesse modelo de carcinogênese espontânea em DHGNA.

**Palavras-chave:** Esteato-Hepatite; Carcinoma Hepatocelular; Hedgehog, Osteopontina.

FREITAS, Juliana Ribeiro de. Hedgehog pathway activation and spontaneous carcinogenesis in non alcoholic fatty liver disease. il. Tese (Doutorado em Patologia) – Universidade Federal da Bahia. Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, Salvador, 2017. (Colocar o título em inglês)

## ABSTRACT

**INTRODUCTION:** Fatty liver disease is a medical condition associated with obesity, which affects adults and children worldwide. It is considered the hepatic counterpart of the metabolic syndrome and it is estimated that it will be the most prevalent form of liver disease within the next two decades. The pathological aspects of fatty liver disease varies from pure steatosis to steatohepatitis (steatosis with hepatocellular ballooning, and/or lobular inflammation and/or perisinusoidal fibrosis). Patients with steatohepatitis are at increased risk of developing cirrhosis. Data show that a smaller percentage of patients with pure steatosis may develop cirrhosis as well. Patients with steatohepatitis are at increased risk of developing hepatocellular carcinoma, even in the absence of established cirrhosis. The mechanisms involved in fatty liver disease progression and carcinogenesis are not well known. Hedgehog signaling appears to be involved in liver damage and regeneration in fatty liver disease. **OBJECTIVES:** to evaluate Hedgehog signaling in liver parenchyma and occurrence of hepatocellular carcinoma in mouse model with NAFLD induced by diet. **METHODS:** C57BL/6 mouse were fed with hyper caloric chaw for 11 months. After euthanasia, blood was collected for biochemical assays and the liver was sampled for pathology, immunohistochemistry and gene expression analysis. Control mice were fed with regular chaw. **RESULTS:** mice fed with hyper caloric diet developed obesity, diabetes, elevated cholesterol and liver enzymes levels. All obese mice developed steatohepatitis and 40% of them presented spontaneous hepatocellular carcinoma of the steatohepatitic type. Activation of Hedgehog signaling occurred in the liver parenchyma of obese animals and in the hepatocellular carcinomas, with great production of osteopontin. There was hyper activation of Hedgehog signaling in the non-neoplastic liver parenchyma of animals that developed cancer in comparison to liver parenchyma of mice that did not developed cancer. **CONCLUSION:** the model of diet induced fatty liver disease in mice presented resulted in steatohepatitis in all obese mice, with spontaneous hepatocellular carcinoma development. Hedgehog signaling activation was detected in the liver of all obese animals with steatohepatitis and in the carcinomas. Hedgehog signaling in liver parenchyma precedes hepatocellular carcinoma development, indicating that this activation with osteopontin production is an early event in this model of spontaneous carcinogenesis in fatty liver disease.

**Keywords:** Steatohepatitis; Hepatocellular Carcinoma; Hedgehog, Osteopontin.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Via Hedgehog	24
<b>Figura 2.</b> Peso e aspecto dos animais após 11 meses de diet	35
<b>Figura 3.</b> Glicemia dos animais após 11 meses de acompanhamento	36
<b>Figura 4.</b> Colesterol sérico dos animais após 11 meses de acompanhamento	37
<b>Figura 5.</b> Níveis de triglicérides sérico dos animais após 11 meses de acompanhamento	37
<b>Figura 6.</b> Níveis de ALT e AST séricos dos animais após 11 meses de acompanhamento	38
<b>Figura 7.</b> Avaliação da esteatose	39
<b>Figura 8.</b> Avaliação anátomo-patológica do fígado de animal do grupo obeso	40
<b>Figura 9.</b> Avaliação da inflamação	41
<b>Figura 10.</b> Avaliação da fibrose	42
<b>Figura 11.</b> Quantificação relativa da expressão de RNA mensageiro de TNF- $\alpha$	43
<b>Figura 12.</b> Quantificação relativa da expressão de RNA mensageiro de IL-6	44
<b>Figura 13.</b> Quantificação relativa da expressão de RNA mensageiro de Colágeno 1a	44
<b>Figura 14.</b> Carcinomas hepatocelulares	46
<b>Figura 15.</b> Microscopia de carcinoma em fígado de animal do grupo obeso	47
<b>Figura 16.</b> Carcinoma em fígado de animal do grupo obeso	48
<b>Figura 17.</b> Avaliação da expressão de Ihh por imuno-histoquímica no parênquima hepático	49, 50
<b>Figura 18.</b> Avaliação da expressão de Gli2 por imuno-histoquímica no parênquima hepático	51
<b>Figura 19.</b> Avaliação da expressão de OPN por imuno-histoquímica no parênquima hepático	52
<b>Figura 20.</b> Avaliação da expressão de SOX-9 por imuno-histoquímica no parênquima hepático	53
<b>Figura 21.</b> Quantificação relativa da expressão de RNA mensageiro de Ihh e Shh no parênquima hepático	54
<b>Figura 22.</b> Quantificação relativa da expressão de RNA mensageiro de Ptc e Hhip no parênquima hepático	55

<b>Figura 23.</b> Quantificação relativa da expressão de RNA mensageiro de Gli1 e Gli2 no parênquima hepático	56
<b>Figura 24.</b> Quantificação relativa da expressão de RNA mensageiro de OPN no parênquima hepático	57
<b>Figura 25.</b> Avaliação por imuno-histoquímica de expressão de Ihh nos CHC	58, 59
<b>Figura 26.</b> Avaliação por imuno-histoquímica de expressão de Gli2 nos CHC	60
<b>Figura 27.</b> Avaliação por imuno-histoquímica de expressão de OPN nos CHC	61,62
<b>Figura 28.</b> Avaliação por imuno-histoquímica de expressão de SOX-9 nos CHC	63,64
<b>Figura 29.</b> Quantificação relativa da expressão de RNA mensageiro de Ihh nos CHC	65
<b>Figura 30.</b> Quantificação relativa da expressão de RNA mensageiro de Shh nos CHC	67
<b>Figura 31.</b> Quantificação relativa da expressão de RNA mensageiro de Ptc nos CHC	68,69
<b>Figura 32.</b> Quantificação relativa da expressão de RNA mensageiro de Hhip nos CHC	69,70
<b>Figura 33.</b> Quantificação relativa da expressão de RNA mensageiro de Gli1 nos CHC	71
<b>Figura 34.</b> Quantificação relativa da expressão de RNA mensageiro de Gli2 nos CHC	72, 73
<b>Figura 35.</b> Quantificação relativa da expressão de RNA mensageiro de OPN nos CHC	74

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFP	Alfa-fetoproteína
ALT	Alanina aminotransferase
AP-1	Adaptor Protein complex 1
AST	Aspartato aminotransferase
CHC	Carcinoma hepatocelular
CPqGM	Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz
DHGNA	Doença hepática gordurosa não alcoólica
EHNA	Esteato-hepatite não alcoólica
Ets-1	<i>ETS proto-oncogene 1</i>
FAK	<i>Focal adhesion kinase</i>
GAPDH	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
Gli1	Zinc finger protein GLI1/ glioma-associated oncogene
Gli2	Zinc finger protein GLI2
HE	Hematoxilina e eosina
HGF	<i>Hepatocyte Growth Factor</i>
Hh	Hedgehog
Hhip	<i>Hedgehog interacting protein</i>
IGM	Instituto Gonçalo Moniz
Ihh	Indian Hedgehog
IL-1 $\beta$	<i>Interleucina 1<math>\beta</math></i>
IL-6	<i>Interleucina 6</i>
iNOS	<i>Inducible Nitric Oxide Synthetase</i>
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinases</i>
MAP3K14	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase 14</i>
MAPK	<i>Mitogen Activated Protein Kinases</i>
MET	<i>MET Proto-Oncogene, Receptor Tyrosine Kinase</i>
mmp9	<i>Matrix metallopeptidase 9</i>
NF-kB	<i>Nuclear factor kappa B subunit 1</i>
OPN	Osteopontina
PI3K	<i>Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase</i>
Shh	Sonic Hedgehog



SOX-9	<i>SRY (sex determining region Y)-box 9</i>
Src	<i>Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src</i>
TEM	Transição epitélio-mesênquima
TGF- $\beta$	<i>Transforming growth factor beta</i>
timp1	<i>Tissue inhibitor of metalloproteinase 1</i>
TLR4	<i>Toll like receptor 4</i>
TNF- $\alpha$	<i>Tumor necrosis factor <math>\alpha</math></i>
VHB	Vírus da hepatite B
VHC	Vírus da hepatite C

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b>	16
1.1	DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO ALCOÓLICA	16
1.2	AVALIAÇÃO ANATOMOPATOLÓGICA DA DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO ALCOÓLICA	19
1.3	CARCINOMA HEPATOCELULAR E DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO ALCOÓLICA	20
1.4	MECANISMOS DE PROGRESSÃO DA DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO ALCOÓLICA	21
1.5	VIAS DE SINALIZAÇÃO EM DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO ALCOÓLICA	22
1.6	OSTEOPONTINA E FÍGADO	25
1.7	OSTEOPONTINA E CARCINOMA HEPATOCELULAR	26
1.8	MODELOS EXPERIMENTAIS DE DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO ALCOÓLICA	27
2	<b>JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE</b>	28
3	<b>OBJETIVOS</b>	29
3.1	OBJETIVO GERAL	29
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
4	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	30
4.1	ANIMAIS	30
4.2	DIETA	30
4.3	AFERIÇÃO DE PESO E GLICEMIA DOS ANIMAIS	30
4.4	EUTANÁSIA E COLETA DE AMOSTRAS	30
4.5	DOSAGEM BIOQUÍMICA	31
4.6	AVALIAÇÃO ANATOMO-PATOLÓGICA	31
4.7	IMUNO-HISTOQUÍMICA	32
4.8	EXTRAÇÃO DE RNA, TRANSCRIÇÃO REVERSA E PCR EM TEMPO REAL	32
4.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA	34
5	<b>RESULTADOS</b>	35
5.1	EFEITO DA DIETA NOS CAMUNDONGOS C57BL6	35
5.1.1	Peso	35
5.2	AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA	36
5.2.1	Glicemia	36
5.2.2	Colesterol	36
5.2.3	Triglicérides	37

5.2.4	ALT e AST	38
5.3	AVALIAÇÃO ANÁTOMO-PATOLÓGICA	39
5.4	AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA RELACIONADA À INFLAMAÇÃO E FIBROSE	43
5.4.1	TNF- $\alpha$	43
5.4.2	IL-6	43
5.4.3	Colágeno 1a	44
5.5	OCORRÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO DE CARCINOMA HEPATOCELULAR	45
5.6	AVALIAÇÃO DA VIA HEDGEHOG NO PARÊNQUIMA HEPÁTICO	49
5.6.1	Avaliação da via Hedgehog por imuno-histoquímica no parênquima hepático	49
5.6.1.1	<i>Indian Hedgehog</i>	49
5.6.1.2	<i>Gli2</i>	51
5.6.1.3	<i>Osteopontina</i>	52
5.6.1.4	<i>SOX-9</i>	53
5.6.2	Avaliação da expressão gênica da via Hedgehog no parênquima hepático	54
5.6.2.1	<i>Indian Hedgehog e Sonic Hedgehog</i>	54
5.6.2.2	<i>Patched e Hhip</i>	55
5.6.2.3	<i>Gli1 e Gli2</i>	56
5.6.2.4	<i>Osteopontina</i>	57
5.7	AVALIAÇÃO DA VIA HEDGEHOG NOS CARCINOMAS HEPATOCELULARES	57
5.7.1	Avaliação da via Hedgehog por imuno-histoquímica nos carcinomas	57
5.7.1.1	<i>Indian Hedgehog</i>	57
5.7.1.2	<i>Gli2</i>	59
5.7.1.3	<i>Osteopontina</i>	61
5.7.1.4	<i>SOX-9</i>	62
5.7.2	Avaliação da expressão gênica da via Hedgehog nos carcinomas hepatocelulares	64
5.7.2.1	<i>Indian Hedgehog</i>	64
5.7.2.2	<i>Sonic Hedgehog</i>	66
5.7.2.3	<i>Patched</i>	68
5.7.2.4	<i>Hhip</i>	69
5.7.2.5	<i>Gli1</i>	70
5.7.2.6	<i>Gli2</i>	72
5.7.2.7	<i>Osteopontina</i>	73
6	<b>DISCUSSÃO</b>	75
7	<b>CONCLUSÃO</b>	84
8	<b>REFERÊNCIAS</b>	85

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO ALCOÓLICA

A doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) vem se tornando um problema crescente de saúde pública devido ao aumento de incidência de obesidade em adultos e crianças em todo o mundo. Trata-se de uma doença de apresentação espectral do ponto de vista histológico, variando de esteatose simples, sem inflamação e sem fibrose no parênquima hepático à esteato-hepatite, forma que apresenta inflamação lobular, balonização de hepatócitos, podendo causar fibrose e/ou cirrose, na ausência de consumo abusivo de álcool. Pacientes com esteato-hepatite têm risco aumentado para desenvolvimento de carcinoma hepatocelular, mesmo na ausência de cirrose estabelecida. Atualmente, a esteato-hepatite não alcoólica (EHNA) é a segunda causa de indicação de transplante hepático no mundo e estima-se que será a primeira causa nas próximas duas décadas (SAYINER *et al.*, 2016). Pacientes com esteatose simples raramente progridem para formas avançadas, porém, cerca de 20% dos pacientes com EHNA progridem com fibrose hepática e cirrose em até 15 anos. (THAN e NEWSOME, 2015).

Fatores de risco conhecidos para DHGNA e EHNA incluem obesidade e diabetes. A DHGNA é considerada o componente hepático da síndrome metabólica e está fortemente associada à resistência periférica à insulina, diabetes *mellitus*, obesidade central (abdominal) e dislipidemia. DHGNA é um fator de risco independente para doença cardiovascular e representa risco aumentado para mortalidade de causa hepática e não hepática, como diabetes, doença arterial coronariana e câncer (ARMSTRONG *et al.*, 2014).

Atualmente, na América do Norte, a ocorrência de DHGNA e de EHNA atingiu níveis epidêmicos. Em um estudo recente de base populacional nos Estados Unidos da América, que considerou como critério diagnóstico para DHGNA a presença de esteatose hepática moderada ou intensa detectada ao ultrassom na ausência de outras doenças hepáticas, estimou-se a prevalência de DHGNA em 18,8%. No mesmo estudo, pacientes com esteatose hepática e elevação de enzimas hepáticas na presença de diabetes *mellitus* ou resistência periférica à insulina tiveram diagnóstico presuntivo de EHNA, com prevalência de 2,6%. Esses dados foram semelhantes em outro estudo de base populacional nos EUA (CLARK *et al.*, 2002).

O diagnóstico de certeza de EHNA depende da avaliação histopatológica. A prevalência de EHNA é difícil de ser determinada devido à necessidade de biópsia hepática e

os dados disponíveis na literatura representam características de populações selecionadas. Em um estudo de autópsia (WANLESS e LENTZ, 1990), EHNA ocorreu em 18,5% dos obesos e em 2,7% dos fígados de pessoas com peso normal. A prevalência de EHNA em doadores de fígado nos EUA é em torno de 1,1%. (YAMAMOTO e TAKADA *et al.*, 2007). Sugere-se que a prevalência de EHNA na população dos EUA seja de 1 a 3%.

A prevalência DHGNA aumenta com a idade, de menos de 20% na população com menos de 20 anos para mais de 40% na população de pessoas acima dos 60 anos (BREA e PUZO, 2013). Gênero masculino está associado com maior risco de fibrose e progressão da doença (ATTAR e VAN THIEL, 2013).

A etnia também parece ser importante quando avaliada a prevalência de DHGNA. Em um estudo com 6814 pacientes levando-se em consideração a etnia, com uso de tomografia computadorizada para determinar presença de esteatose hepática, a prevalência de DHGNA foi de 29% (FOSTER *et al.*, 2013). A análise de subgrupo mostrou prevalência maior entre hispânicos de origem mexicana (33%) do que entre hispânicos da República Dominicana (16%) e de Porto Rico (18%). A prevalência entre afro-americanos foi de 11% e 15% em brancos. Outro estudo mostrou prevalência de 45% em hispânicos, 33% em brancos e 24% em afro-americanos, utilizando ressonância nuclear magnética para detecção de esteatose hepática (BROWNING *et al.*, 2004).

No Brasil, um estudo demonstrou que a prevalência de DHGNA é de 35,2% (KARNIKOWSKI *et al.*, 2007). Em outro estudo, no qual homens e mulheres assintomáticos foram examinados por ultrassonografia, a prevalência de DHGNA foi de 36%, sendo 74% em pessoas com síndrome metabólica e 73% entre os obesos (ONI *et al.*, 2015). Um estudo na Bahia mostrou ocorrência de esteatose em 18% de 11474 ultrassonografias de abdome em um serviço de referência (MATTEONI e COTRIM, 2011). A avaliação de 32,5% dos pacientes com esteatose por ultrassonografia mostrou que 65,4% dos indivíduos tinham critérios para diagnóstico de DHGNA. Sobrepeso ou obesidade ocorreram em 45,5% dos pacientes, dislipidemia em 42,2%, intolerância a glicose ou diabetes ocorreu em 15,7% dos indivíduos.

A história natural e a patogênese da DHGNA não são totalmente compreendidas. Algumas dificuldades incluem o estabelecimento de critérios diagnósticos e o tempo de evolução da doença. Dados na literatura diferem quanto aos parâmetros clínicos definidos para o diagnóstico (aumento de enzimas hepáticas, ultrassonografia hepática, índices utilizados para determinação de conteúdo de gordura hepática). Há consenso na literatura que a biópsia hepática é o padrão ouro para o diagnóstico de DHGNA e de EHNA. No entanto, não há consenso entre os patologistas em relação aos critérios mínimos para o diagnóstico de

EHNA (BRUNT, 2016). Existem alguns sistemas de avaliação e gradação anatomopatológicas, mas nenhum desses sistemas é universalmente aceito, nem mesmo para fins de pesquisa (BRUNT *et al.*, 2011), (BEDOSSA *et al.*, 2012), (KLEINER *et al.*, 2005). Além disso, existe uma dificuldade em obtenção de biópsias pareadas dos pacientes, uma vez que pacientes assintomáticos podem sofrer com desfechos adversos do procedimento de biópsia, não justificando realização de biópsias por questões médicas e éticas.

A causa mais frequente de morte em pacientes com DHGNA é cardiovascular, seguida por câncer e em terceiro lugar, mortes relacionadas a causas hepáticas. Em estudos que seguiram pacientes com DHGNA por 15 anos, a prevalência de cirrose em pacientes com EHNA é em torno de 10,8% e em pacientes com esteatose pura, 0,9% (SODERBERG *et al.*, 2010), (EKSTEDT *et al.*, 2006). Em um estudo sueco (SODERBERG *et al.*, 2010), que seguiu 256 pacientes por um período de 28 anos, 40% dos indivíduos com DHGNA morreram. Comparado com a população geral sueca, pacientes com esteatose pura tiveram mortalidade 55% maior que a população geral e pacientes com EHNA, 86% maior. O estudo, surpreendentemente, mostrou a mesma mortalidade geral e mortalidade relacionada à causa hepática nos grupos de pacientes com NAFLD e EHNA. Cerca de 67% dos pacientes com DHGNA desenvolveram fibrose. No entanto, o escore histológico utilizado para graduar a DHGNA utilizado foi o “*NAFLD Activity Score, NAS*”, que não inclui a fibrose como parâmetro. Um estudo mais recente (YOUNOSSI *et al.*, 2011) mostrou que a mortalidade relacionada a causas hepáticas em pacientes com EHNA está relacionada à presença de fibrose ou cirrose. Esses dados sugerem que a fibrose é o determinante histológico mais importante para valor prognóstico na biópsia hepática de pacientes com DHGNA.

A taxa de progressão da fibrose na DHGNA é geralmente lenta, podendo haver regressão da fibrose. No entanto, um subgrupo de pacientes com esteatose simples ou EHNA pode desenvolver fibrose mais rapidamente. Em uma meta-análise com 411 pacientes avaliados por biópsia (SINGH *et al.*, 2015), sendo que 63% tinham EHNA na primeira biópsia, 33,6% dos pacientes tiveram progressão da fibrose, 43,1% tiveram fibrose estável e 22,3% tiveram melhora do estadiamento. A taxa de progressão anual de fibrose nos pacientes com EHNA foi maior do que a dos pacientes com esteatose pura (7,1 anos versus 14,3 anos). No entanto, a proporção de pacientes que progrediram rapidamente de estadio 0 para estadio avançado (3 ou 4) foi igual nos dois subgrupos histológicos (17% dos pacientes no grupo com esteatose pura e 18% no grupo dos pacientes com EHNA). Em outro estudo no Reino Unido (MCPHERSON *et al.*, 2015), subgrupos de pacientes com DHGNA e EHNA, progrediram a fibrose rapidamente com taxas semelhantes (37% versus 43%). Dos pacientes com esteatose

pura que progrediram com fibrose, 44% desenvolveram EHNA ao longo do seguimento, no entanto, o restante dos pacientes teve uma piora do estadiamento (fibrose), mesmo sem demonstrar lesão necro-inflamatória na biópsia hepática (sem EHNA). Esses dados apontam que a esteatose pura, pelo menos em alguns grupos de pacientes, pode não ter evolução benigna e que é possível que outros mecanismos além da lesão necro-inflamatória e balonização podem estar relacionados ao desenvolvimento de fibrose nos pacientes com DHGNA.

## 1.2 AVALIAÇÃO ANATOMOPATOLÓGICA DA DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO ALCOÓLICA

A primeira descrição oficial do que se identifica hoje como EHNA foi feita por um patologista, Dr. Jurgen Ludwig, da *Mayo Clinic*, em 1980 (LUDWIG *et al.*, 1980). Sua publicação apresentou achados de biópsia hepática de uma série de 20 pacientes de uma doença “ainda sem nome”, segundo o trabalho. Dentre os pacientes, havia predomínio de mulheres e 90% deles apresentavam obesidade, sem consumo abusivo de álcool. Ao exame anatomopatológico, todos os fígados mostravam esteatose e inflamação lobular, critérios necessários para que os autores classificassem a doença como esteato-hepatite não alcoólica, dada a semelhança dos achados anatomopatológicos com a hepatite alcoólica.

Desde a descrição inicial da EHNA, alguns sistemas de classificação anatomopatológica foram propostos, com aceitação variável entre os patologistas especialistas em fígado. Em 2005, o *Clinical Research Network for NASH* (CRN) sugeriu o *NAFLD Activity Score*, NAS (KLEINER *et al.*, 2005). O NAS leva em consideração presença de esteatose, inflamação lobular e balonização para definir atividade da doença. Há críticas ao NAS, principalmente, no que tange à inclusão de esteatose em um sistema de pontuação com balonização, que tem valor prognóstico conhecido. Não se sabe ao certo o valor prognóstico da esteatose. O peso dado a cada critério de pontuação também é desigual, sendo a menor pontuação atribuída à balonização hepatocelular.

O escore SAF (*steatosis, activity, fibrosis*) foi proposto em 2012 (BEDOSSA *et al.*, 2012). Esteatose é critério mínimo para o escore, com mínimo de 5% de esteatose para o diagnóstico de DHGNA. O escore leva em consideração esteatose, balonização, inflamação e inclui a avaliação da fibrose. Esse escore foi validado em uma série de pacientes com obesidade mórbida, mas é passível a críticas pela validação ter sido realizada em um grupo

selecionado de pacientes e pelo fato de pacientes com fibrose avançada, com pouca ou nenhuma esteatose, mas com balonização e inflamação lobular não terem sido incluídos.

Uma das grandes dificuldades em desenvolver um sistema de classificação, que apresenta um escore anatomopatológico está relacionada à natureza e à progressão da DHGNA. Trata-se de uma doença de evolução lenta, com tempo de progressão de fibrose de até 15 anos. Não existem marcadores sorológicos de atividade e os exames de imagem contribuem pouco para a avaliação da fibrose devido à natureza delicada e discreta da fibrose perissinusoidal. Os estudos de validação dos escores acima foram baseados em séries retrospectivas, o que enfraquece a correlação estatística. É uma doença na qual o desfecho final em ensaios clínicos não pode ser determinado precisamente para definir tempo de biópsia hepática, além de questões éticas, de custo e de segurança que envolve realização de biópsia hepática com intuito de fornecer dados científicos.

### 1.3 CARCINOMA HEPATOCELULAR E DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO ALCOÓLICA

Uma das complicações bem documentadas em pacientes com cirrose secundária a EHNA é o surgimento de carcinoma hepatocelular (CHC). É estimado que CHC ocorra em 5% dos casos de cirrose secundária a DHGNA. (CALDWELL *et al.*, 1999). Diabetes e obesidade, duas condições fortemente associadas à DHGNA são fatores de risco para desenvolvimento de CHC, demonstrado em diversos estudos. (REGIMBEAU *et al.*, 2004), (DAVILA *et al.*, 2005). Estudos de base populacional apontam que síndrome metabólica aumenta o risco de CHC independente de outros fatores de risco (WELZEL *et al.*, 2011). Dados recentes de estudos clínicos e de modelos experimentais têm mostrado associação entre DHGNA sem cirrose e CHC (STARLEY *et al.*, 2010), (HILL-BASKIN *et al.*, 2009). No Brasil, um estudo de nove centros de hepatologia no país com 110 pacientes com CHC e DHGNA mostrou obesidade em 52,7% dos casos, diabetes em 73,6%, dislipidemia em 41% e síndrome metabólica em 57,2% (COTRIM e CARRILHO, 2016). Em 47,2% dos pacientes houve estudo anatomopatológico dos carcinomas. Desses, 29,8% tinham CHC com EHNA sem cirrose.

Alexander *e cols* mostraram uma correlação positiva entre grau de esteatose no parênquima hepático não neoplásico e a ocorrência de CHC em pacientes com CHC e DHGNA sem cirrose (ALEXANDER *et al.*, 2013). Nos casos descritos, os CHC exibem alterações histopatológicas semelhantes às encontradas no parênquima hepático de indivíduos



com EHNA: esteatose, balonização hepatocelular, fibrose perissinusoidal e focos de infiltrado inflamatório misto. Sugere-se classificar este tipo de CHC como CHC variante esteato-hepatítica (SALOMAO *et al.*, 2011).

Pouco se sabe sobre as vias moleculares envolvidas na carcinogênese hepática em fígado gordo. São necessários estudos prospectivos para determinar a real associação entre CHC e DHGNA em fígado não cirrótico. Em relação às vias moleculares envolvidas na carcinogênese nesse cenário, há poucos dados na literatura. Não se sabe se a variante esteato-hepatítica representa um tipo especial de CHC, com vias carcinogênicas próprias relacionadas a um perfil etiológico ou se o fenótipo esteato-hepatítico reflita as alterações que ocorrem no parênquima hepático de um indivíduo com DHGNA.

#### 1.4 MECANISMOS DE PROGRESSÃO DA DOENÇA GORDUROSA NÃO ALCOÓLICA DO FÍGADO

Os mecanismos envolvidos na progressão da DHGNA não são conhecidos. A hipótese dos dois “hits” elaborada em 1998 por Day *e cols* propunha que o primeiro “hit” seria o acúmulo de triglicérides e ácidos graxos livres nos hepatócitos (esteatose) ocorresse como consequência à resistência periférica à insulina, grande aporte na dieta e aumento da lipogênese hepática (DAY e JAMES, 1998). O segundo “hit” resultaria em inflamação e, consequente, fibrose devido à peroxidação de lipídios e disfunção mitocondrial decorrente de estresse oxidativo no hepatócito (levando à esteato-hepatite). Possíveis causas do segundo “hit” seriam piora da resistência periférica à insulina, dieta rica em frutose, perda de peso rápida, drogas e toxinas ambientais. Apesar de alguns desses fatores estarem implicados no risco de desenvolvimento de EHNA, a hipótese dos dois “hits” não explica porque alguns pacientes com DHGNA progridem lentamente, outros progridem rapidamente ou têm risco aumentado para carcinoma hepatocelular. Atualmente, entende-se que a progressão da doença é multifatorial.

Em muitos estudos já se mostrou que idade, índice de massa corporal aumentado, diabetes *mellitus* tipo 2, síndrome metabólica e resistência periférica à insulina são fatores de risco para progressão da fibrose em pacientes com DHGNA (MARENGO *et al.*, 2016). Entre os fatores genéticos, identificou-se que a homozigose para o alelo 148M da “patatin-like phospholipase domain-containing protein” (PNPLA3) é um fator de risco para desenvolvimento de EHNA e fibrose em DHGNA, com risco 3,3 vezes maior, independente de índice de massa corporal, diabetes mellitus tipo 2 e EHNA para fibrose (ROTMAN *et al.*,

2010). A associação entre PNPLA3 148M e intensidade da fibrose já foi demonstrada em alguns trabalhos, nas populações adulta e pediátrica. Fatores genéticos podem estar relacionados em parte com a ocorrência de DHGNA em pacientes magros, com índice de massa corporal normal e sem síndrome metabólica.

Outros fatores podem estar relacionados à progressão da DHGNA e vem sendo investigados, como o papel da microbiota intestinal, fatores dietéticos e endócrinos (KIRPICH *et al.*, 2015), (KIRPICH *et al.*, 2015). Estudos em camundongos utilizando transplante fecal mostraram que a microbiota intestinal pode induzir DHGNA (LE ROY *et al.*, 2013). Quando fezes de animais que desenvolvem EHNA induzida por dieta são transplantadas para animais com flora intestinal estéril que são engordados em seguida com dieta hipercalórica, esses desenvolvem mais esteatose, piores níveis glicêmicos e pior resistência periférica a insulina comparado a animais com flora intestinal estéril que receberam transplante fecal de animais que não desenvolveram EHNA induzida por dieta. Alguns trabalhos avaliaram a influência da composição da microbiota intestinal em humanos. Todos mostraram disbiose em pacientes de DHGNA. A expressão de genes relacionados à inflamação no tecido adiposo se correlacionou com conteúdo hepático de gordura e microbiota intestinal disbiótica. (MUNUKKA *et al.*, 2014), (WONG *et al.*, 2013), (ZHU *et al.*, 2013).

A composição da microbiota intestinal está relacionada com o tipo de dieta. A dieta também influencia a patogênese da DHGNA. Dietas ricas em frutose e gordura saturada estimulam o acúmulo de gordura no fígado e progressão para EHNA, que são atenuados pelo tratamento de pacientes com antibiótico. (DE WIT *et al.*, 2012). A influência da dieta e microbiota intestinal na DHGNA se dão provavelmente pelos produtos intestinais que chegam ao fígado pela veia porta, causando endotoxemia hepática. Esses produtos poderiam ativar macrófagos via Toll-like receptors, induzindo a resposta inflamatória e esteatose (TLR4 e TN- $\alpha$ ) (SPRUSS *et al.*, 2009). Mais estudos são necessários para avaliar o real papel da microbiota e da dieta na patogênese da DHGNA.

## 1.5 VIAS DE SINALIZAÇÃO EM DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO ALCOÓLICA

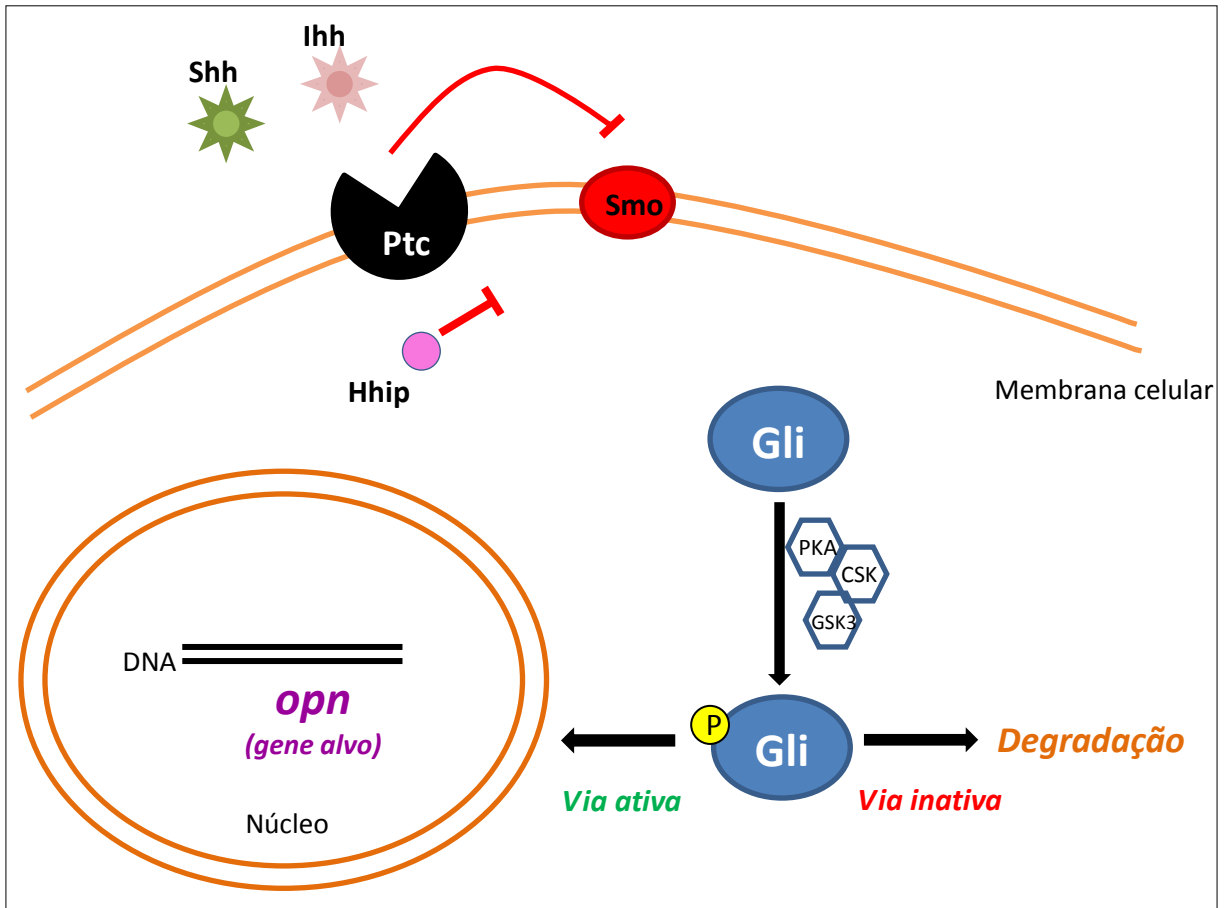
A via de sinalização Hedgehog (Hh) vem sendo estudada no fígado e há evidências que ela possa estar envolvida nos mecanismos de lesão hepática na DHGNA (OMENETTI *et*

*al.*, 2011). Esta é uma via de sinalização bem preservada entre as espécies e está ativa durante a embriogênese humana, além de também participar nos processos de reparo e regeneração de diversos tecidos endodérmicos. A via canônica de sinalização Hh é ativada por ligantes específicos, o Sonic Hedgehog (Shh), Indian Hedgehog (Ihh) e Desert Hedgehog (Dhh). A sinalização Hh pode ser ativada de modo parácrino, autócrino e endócrino. No fígado, Shh e Ihh são preferencialmente expressos em hepatócitos, células biliares e células estrelares hepáticas. Os ligantes têm um receptor de membrana, o Patched (Ptc). Após a ligação com o Ptc, há liberação do receptor de membrana, o Smoothened (Smo), que normalmente está inativo. Isso resulta em propagação de sinais que culminam com a ativação das proteínas da família do glioblastoma (Gli), que são fatores de transcrição (Gli1, Gli2 e Gli3). Os genes alvos de Gli incluem osteopontina (*opn*), *Hh interacting protein* (Hhip) e SNAIL. Existe uma via de ativação não canônica, na qual a ativação direta de Gli pode se dar por fatores como: *insulin-like growth factor* (Gli1), *transforming growth factor beta* (Gli2), regulação epigenética dos genes alvos da via Hh, com mudança do estado de metilação dos mesmos. (Figura 1).

A via Hh é inativa em fígados de adultos sem lesão. Várias evidências demonstram que no fígado com lesão aguda ou crônica, há ativação da via Hh, que leva à diminuição da expressão de Hhip (supressor natural da via). Células estrelares quiescentes, via sinalização Hh, mudam seu fenótipo para miofibroblastos, tornando-se células produtoras de colágeno. Vários estudos mostram que a via Hh está envolvida na reparação e regeneração hepáticas (OCHOA *et al.*, 2010). A expressão hepática de Shh e Ihh aumenta cerca de 70% após hepatectomia parcial.

A via Hh também está envolvida na ativação de células progenitoras hepáticas nas agressões hepáticas agudas e crônicas. As células progenitoras recrutadas participam dos processos de regeneração e reparo hepáticos; podem diferenciar-se em hepatócitos ou células ductulares e participam da transição epitélio-mesênquima (TEM). A TEM ativada pela via Hh é importante no processo de reparo hepático que envolve as células progenitoras e as células estrelares.

A via Hh parece participar de eventos celulares que culminam com morte de hepatócitos. Estudos experimentais mostram que em fígados de camundongos com EHNA induzida por dieta, a sinalização Hh participa na morte de hepatócitos, contribuindo para a inflamação e ativação de resposta imune. Hepatócitos humanos balonizados mostram intensa marcação para o Shh (ligante da via) (VERDELHO MACHADO e DIEHL, 2016).



**Figura 1: Via Hedgehog.** Shh: *Sonic Hedgehog*; Ihh: *Indian Hedgehog*; Ptc: *Patched*; Smo: *Smoothened*; Hhip: *Hh interacting protein*; Gli: proteína Glioblastoma; *opn*: osteopontina.

## 1.6 OSTEOPONTINA E FÍGADO

A OPN, também chamada de “secreted phosphoprotein 1 (SPP1)”, é uma glicoproteína que se liga à integrina e que foi inicialmente descrita em 1979, em osteoblastos e osteoclastos. Apresenta uma forma intracelular e uma forma secretada e participa em processos patológicos em diversos órgãos. No fígado, é expressa normalmente nas células do ducto biliar. Em 1999, foi descrita a expressão de OPN em células de Kupffer e células estrelares hepáticas em áreas necróticas secundárias à intoxicação por tetracloreto de carbono. (WEN *et al.*, 2016). OPN é secretada por macrófagos e também atrai e ativa macrófagos. (LIANG e YEH, 2014). Esta proteína foi descrita como participante em diversas doenças hepáticas, incluindo insuficiência hepática aguda, EHNA, doença alcoólica do fígado, fibrose hepática e hepatites virais B e C.

Diversos estudos mostraram a participação da OPN como citocina pró-inflamatória, porém pode também agir como citocina protetora em lesão hepática inflamatória. Na lesão de isquemia-reperfusão em modelo experimental (PATOURAUX *et al.*, 2014), OPN atua limitando a produção de IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e iNOS por macrófagos, contribuindo para diminuir a lesão hepática. Além disso, OPN parece estar envolvida na regeneração hepática, com aumento dos níveis de OPN na regeneração hepática com participação das células ovais (célula progenitora hepática) (ARAI *et al.*, 2004).

O gene da OPN é alvo da sinalização Hh e também está envolvida em fibrogênese. No fígado, é sintetizada também por fibroblastos, células endoteliais, além de macrófagos. Há evidências que a OPN pode ser uma importante glicoproteína no processo de fibrogênese hepática (SYN, 2013) (COOMBES *et al.*, 2015). Além disso, OPN participa como citocina ativadora da célula estrelar hepática na produção de colágeno I, agindo conjuntamente com TGF- $\beta$ . Atua na transição epitélio-mesênquima da células ovais, modulando a resposta dessas células a TGF- $\beta$  em cultura (COOMBES *et al.*, 2015). Na doença alcoólica do fígado, OPN sérica aumenta progressivamente com os estádios de fibrose (PATOURAUX *et al.*, 2012). Camundongos knockout para OPN com EHNA induzida por dieta desenvolvem menos fibrose quando comparados com os animais controle (KIEFER *et al.*, 2011).

Na DHGNA, os níveis séricos de OPN estão elevados. Índícios mostram que OPN contribui para a fibrogênese hepática em EHNA via ativação de células estrelares. Em camundongos deficientes para OPN, o acúmulo de células inflamatórias em camundongos

obesos é bloqueado e apresentam menor intensidade de esteatose do que os animais controle (SYN *et al.*, 2011).

## 1.7 OSTEOPONTINA E CARCINOMA HEPATOCELULAR

A relação entre OPN e CHC vem sendo intensamente estudada. OPN sérica está acentuadamente elevada em pacientes com VHC e VHB (KIM *et al.*, 2006). Juntamente com alfafetoproteína, OPN melhora a sensibilidade para detectar recorrências em pacientes operados para CHC. Em CHC AFP negativos, OPN tem boa sensibilidade e é melhor marcador sérico do que alfafetoproteína em CHC inicial (SHANG *et al.*, 2012). Alguns estudos mostraram que a expressão de OPN tem correlação com infiltração de cápsula, ocorrência de metástase, invasão vascular e estadiamento TNM em pacientes com CHC e hepatite crônica por VHB e VHC (XIE *et al.*, 2007). Super-expressão de OPN está associada a metástases intra-hepáticas, recorrência precoce e pior prognóstico em pacientes operados por CHC (PAN *et al.*, 2003).

Os mecanismos envolvidos na relação entre OPN e CHC são relacionados com proliferação celular, transição epitélio-mesênquima, invasão e metástase. OPN, ao interagir com CD44 aumenta a expressão de “hepatocyte growth factor - HGF” (proliferação) e ativa c-MET, que promove progressão do CHC (PHILLIPS *et al.*, 2012). OPN também atua no CHC aumentando espécies reativas de oxigênio, ativação de sinalização relacionada ao  $Ca^{2+}$  e ativando cascatas de sinalização como MAPK, JNK, PI3K, FAK e Src, que promovem aparecimento da transição epitélio-mesênquima, migração celular e invasão em CHC. OPN também se liga à vimentina, impedindo a degradação dessa proteína e favorecendo a transição epitélio-mesênquima em CHC (IQBAL *et al.*, 2014) (IQBAL *et al.*, 2013). A supressão de OPN em CHC leva à apoptose. (ZHAO *et al.*, 2008).

## 1.8 MODELOS EXPERIMENTAIS DE DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO ALCOÓLICA

Alguns modelos experimentais foram desenvolvidos para estudar a patogênese da DHGNA. Um modelo experimental ideal seria aquele que reproduzisse os aspectos clínicos, histopatológicos e etiopatogênicos da doença humana. Os modelos disponíveis são os modelos que utilizam animais geneticamente modificados, modelos que induzem DHGNA por dieta (dieta deficiente em metionina e colina, rica em colesterol e colato, rica em frutose) e modelos combinados, como animais geneticamente modificados e aqueles submetidos a dietas especiais (TAKAHASHI *et al.*, 2012), (SCHATTENBERG e GALLE, 2010).

Os modelos genéticos (*SREBP-1 transgenic mice*, *Ob/ob mice*, *KK-A mice*, *PTEN null mice*, *PPAR- $\alpha$  knockout mice*, *AOX null mice*, *MAT1A null mice*) mostram como vantagem a possibilidade de poder estudar aspectos da doença de forma mais rápida, uma vez que não é necessário tempo de alimentação para ganho de peso ou surgimento de esteatose, como ocorre com os modelos de dieta. Estes mostram como desvantagem a não ocorrência de todos os aspectos da doença humana e a ocorrência de co-morbidades relacionadas às mutações nos animais (HILL-BASKIN *et al.*, 2009).

Os modelos experimentais de DHGNA/EHNA induzidos por dieta podem ser do tipo dieta modificada ou dieta hipercalórica. Têm como vantagem a reprodução mais fidedigna de aspectos da doença humana. Os modelos que usam dieta modificada não causam obesidade nos animais. O modelo de dieta hipercalórica reproduz todos os aspectos clínicos e histopatológicos da doença humana, com o inconveniente de tempo prolongado para a ocorrência das alterações, gerando alto custo para manutenção dos animais em biotério. Vários grupos de pesquisa já demonstraram a indução de DHGNA em camundongos com uso de dieta hipercalórica (NAKAMURA e TERAUCHI, 2013).

Anteriormente, foi desenvolvido no Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia do IGM um modelo de DHGNA utilizando camundongos da linhagem C57BL/6 (SOUZA, 2010). Foi demonstrado que esses camundongos alimentados por vários meses com dieta hipercalórica reproduzem aspectos clínicos, bioquímicos e anátomo-patológicos de DHGNA, muito semelhante à doença humana (SOUZA, 2010; PALMA, 2012).

## **2 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE**

Levando-se em consideração a importância da doença hepática gordurosa não alcoólica como causa de morbidade e mortalidade na população brasileira e mundial, torna-se justificável o desenvolvimento de estudos que possam esclarecer mecanismos relacionados à sua patogênese e progressão da doença. Uma forma de se estudar esses mecanismos é utilizar modelos experimentais em camundongos com DHGNA que possibilitem a avaliação anatomopatológica do fígado dos animais, aliado à exploração de vias moleculares.

A hipótese do presente trabalho é que, utilizando o modelo anteriormente descrito por SOUZA (2010), camundongos da linhagem C57BL/6 que desenvolvem DHGNA por dieta hipercalórica irão apresentar carcinoma hepatocelular espontâneo na ausência de cirrose, com participação da via Hedgehog.



### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

O objetivo geral do presente estudo é verificar a ocorrência de carcinoma hepatocelular espontâneo e investigar a ativação da via Hedgehog em um modelo de DHGNA induzido por dieta hipercalórica em camundongos.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Os objetivos específicos são:

- 1) Verificar a ocorrência de carcinoma hepatocelular espontâneo em fígados não cirróticos de camundongos com síndrome metabólica;
- 2) Avaliar a participação da via Hedgehog nas alterações do parênquima hepático de camundongos com esteato-hepatite não alcoólica;
- 3) Avaliar a participação da via Hedgehog nos carcinomas hepatocelulares de camundongos com esteato-hepatite não alcoólica em fígados não cirróticos.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 ANIMAIS

Camundongos machos C57BL/6 foram divididos em dois grupos: grupo controle e grupo obeso. Para desenvolvimento de DHGNA, camundongos do grupo teste (n=10 por grupo, 3 experimentos) foram alimentados com a ração n° 12330 da empresa *Research Diets*<sup>®</sup>, enquanto os camundongos do grupo controle (n = 10 por grupo, 3 experimentos) foram alimentados com a ração Nuvilab CR-81, ração regular do biotério do Instituto Gonçalo Moniz (CPqGM). Como descrito anteriormente, os dois grupos de animais foram mantidos no biotério durante 11 meses, em caixas grandes com no máximo cinco animais por caixa até a data da eutanásia. A água e a ração foram oferecidas *ad libitum* (SOUZA, 2010). O trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no uso de Animais da Fundação Oswaldo Cruz, protocolo 29/29-04.

### 4.2 DIETA

A ração Nuvilab CR-81, ração regular dos camundongos mantidos no biotério do IGM é constituída por baixo teor de gordura e de carboidrato, com mínimo de 22% de proteína bruta por quilo de ração, conforme o fabricante. A ração n° 12330 da empresa *Research Diets*<sup>®</sup>, é uma dieta hipercalórica, com altos níveis de carboidrato e gordura. Apresenta 23% de proteína, 35,5% de carboidrato e 35,8% de gordura por quilo de ração na composição de sua fórmula.

### 4.3 AFERIÇÃO DE PESO E GLICEMIA DOS ANIMAIS

No início do experimento e a cada dois meses, até o dia da eutanásia, foram feitas as aferições do peso e da glicemia de todos os animais. O peso foi aferido utilizando-se uma balança digital, a mesma para todas as pesagens. As glicemias foram aferidas utilizando-se monitor de glicemia *ACCU-Check Active Kit*<sup>®</sup>. Obteve-se uma gota de sangue da cauda após pequeno corte em cada animal. A gota foi colocada na fita de glicosímetro do aparelho, procedendo-se a leitura. Os dados foram registrados em planilhas *Excel*<sup>®</sup>.

### 4.4 EUTANÁSIA E COLETA DE AMOSTRAS

A eutanásia foi realizada com injeção intraperitoneal de Xelasina e Ketamina. Após a injeção, foi feita a abertura da pele na região do plexo braquial, com incisão no referido plexo e coleta de sangue para dosagens de aspartato aminotransferase (AST), alanina

aminotransferase (ALT), colesterol total e triglicérides. Após coleta do sangue, foi feita abertura da cavidade peritoneal e retirada do fígado do animal. Foi feito exame macroscópico de cada fígado por um patologista, com atenção especial quanto à presença de cirrose e de nódulos tumorais. Foram feitas secções do órgão, com obtenção de pequeno fragmento para extração de RNA (os fragmentos foram congelados em freezer  $-80^{\circ}\text{C}$ ). O restante do órgão foi fixado em solução de formalina à 10% para posterior processamento em laboratório de histotecnologia.

#### 4.5 DOSAGEM BIOQUÍMICA

A quantificação de AST, ALT, colesterol total e triglicérides no soro dos animais foi realizada de forma automatizada no Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia, utilizando-se o equipamento *LabMax 240* (Labtest Diagnostica, Minas Gerais, Brasil).

#### 4.6 AVALIAÇÃO ANATOMO-PATOLÓGICA

Depois de fixados em solução de formalina a 10%, os fragmentos de fígado foram colocados em cassetes plásticos para processamento histológico convencional. Os blocos de parafina foram cortados em micrótomo em cortes de  $4\mu\text{m}$ . As lâminas contendo os cortes histológicos foram coradas em Hematoxilina e Eosina (HE) para Sírius Vermelho (*Picro Sirius Red*) para avaliação anátomo-patológica e da fibrose. As lâminas foram avaliadas por dois patologistas de forma que o grupo ao qual o animal pertencia não era conhecido. Foram avaliadas semi-quantitativamente (classificação em ausente, discreta, moderada intensa) a ocorrência de esteatose, balonização hepatocelular, inflamação lobular (infiltrado inflamatório misto, com células mononucleares e neutrófilos) e fibrose (classificados em ausente ou presente, se perissinusoidal ou subcapsular).

Foi considerado critério para o diagnóstico de esteato-hepatite a presença de esteatose, balonização hepatocelular e fibrose peri-sinusoidal ou inflamação lobular.

Como critérios para o diagnóstico de carcinoma hepatocelular, foram considerados os achados macroscópicos (presença de nódulo) e achados microscópicos: maior celularidade do nódulo em relação ao parênquima hepático adjacente, presença de borda compressiva, presença de atipia citológica e presença de vasos arteriais desacompanhados de ramos de veia porta e de ducto biliar dentro do nódulo.

#### 4.7 IMUNO-HISTOQUÍMICA

Foi realizada marcação por imuno-histoquímica para as proteínas Gli-2 (fator de transcrição da via Hedgehog), osteopontina (alvo da sinalização Hh), SOX-9 (marcador de células progenitora hepática), Indian Hedgehog (Ihh – ligante da via Hh). Os clones dos anticorpos estão listados na Tabela 1. Os cortes em lâminas de vidro foram tratados para reação de imuno-histoquímica com peróxido de hidrogênio 3% em 90% de metanol por 15 min para bloquear a peroxidase endógena. Foi feita recuperação antigênica em microondas por 10min. As lâminas foram incubadas com Protein Block (Dako) por 30min. Foi utilizado o sistema EnVision TM Dual Link (Dako) para visualização e foi utilizado DAP- substrato HRP para revelação. As lâminas foram contracoradas com hematoxilina e, posteriormente, foi realizada uma análise semi-quantitativa das reações de imuno-histoquímica ao microscópio por dois patologistas, sem que os mesmos soubessem previamente a qual grupo experimental pertencia a amostra avaliada. A análise avaliou o número de células marcadas por campo de 20X.

**Tabela 1-** Anticorpos utilizados na técnica de imuno-histoquímica

<b>Proteína</b>	<b>Anticorpo</b>	<b>Diluição</b>
Gli-2	Genway Biotech GWB-30A9/DC	2000
Osteopontina	R&D Systems AF808	5µg/mL
Ihh	Abcam Ab39634	750
SOX-9	Abcam 118892	1500

#### 4.8 EXTRAÇÃO DE RNA, TRANSCRIÇÃO REVERSA E PCR EM TEMPO REAL (QRT-PCR)

O RNA foi extraído a partir de 20mg de fígado utilizando o *Rneasy protect mini kit* (QIAGEN) de acordo com as recomendações do fabricante. O RNA foi armazenado a -80 °C. A transcrição reversa foi realizada a partir de 3µg de RNA utilizando o *kit SuperScript™III First-strand synthesis system* (Life Technologies), seguindo o protocolo de iniciadores randômicos, de acordo com as recomendações do fabricante.

O PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR) foi realizado no equipamento ABI 7500 (Life Technologies) utilizando o *SYBR green* (Life Technologies) e analisado pelo software do fabricante. A reação foi feita a partir de 5µl de cDNA e o controle utilizado para quantificação foi o gene constitutivo GAPDH. Foram utilizados os *primers* e sondas já

desenhadas e testadas pela Life Technologies para os seguintes genes: *colágeno 1a*, *interleucina 6 - il-6*, *tnf alfa*, *gli-1*, *gli-2*, *indian hedgehog (ihh)*, *sonic hedgehog (shh)*, *patched (ptc)*, *hedgehog interacting protein (hhp)*, *osteopontina (opn)*, *gapdh*. Os primers utilizados estão descritos na Tabela 2.

A análise dos dados do qRT-PCR foi feita por meio de quantificação relativa, utilizando o método do  $2^{-\Delta\Delta CT}$ .

**Tabela 2-** Sequências dos *primers* utilizados na PCR quantitativo em tempo real (SYBR green)

Gene	Direção	Sequência dos primers 5'-3'
<i>colageno 1a</i>	Senso	TTCACCTACAGCACGCTTGTG
	Anti-senso	GATGACTGTCTTGCCCCAAGTT
<i>il-6</i>	Senso	TTTCCTCTGGTCTTCTGGAG
	Anti-senso	CTGAAGGACTCTGGCTTTGT
<i>tnf alfa</i>	Senso	CCAACGCCCTCCTGGCCAAC
	Anti-senso	GAGCACGTAGTCGGGGCAGC
<i>gli-1</i>	Senso	CCTCCTCCTCTCATTCCACA
	Anti-senso	CTCCCACAACAATTCCTGCT
<i>gli-2</i>	Senso	CCCCATCACCATTCATAAGC
	Anti-senso	CTGCTCCTGTGTCAGTCCAA
<i>indian hedgehog (ihh)</i>	Senso	CGCTGCAAGGACCGTCTGAA
	Anti-senso	CGTGGGCCTTGGACTCGTAA
<i>sonic hedgehog (shh)</i>	Senso	CTGGCCAGATGTTTTCTGGT
	Anti-senso	GATGTCTGGGGTTGTAATTGG
<i>patched (ptc)</i>	Senso	AAGCAGACTACCCGAATATCCA
	Anti-senso	CAGGAGTTTGTAAGCGAGGAC
<i>hedgehog interacting protein (hhp)</i>	Senso	TGGCTCCCATCGGCTCTT
	Anti-senso	CGGTGGAGCTCTGCGACT
<i>osteopontina (opn)</i>	Senso	CTGGCTGAATTCTGAGGGACT
	Anti-senso	TTCTGTGGCGCAAGGAGATT
<i>gapdh</i>	Senso	CGACTTCAACAGCAACTCCACTC
	Anti-senso	CACCCTGTTGCTGTAGCCGTATTC

#### 4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a realização das análises estatísticas foi utilizado o programa GraphPad 5.0. Os dados foram submetidos ao teste de normalidade (Kolmogorov-Smirnov) para determinar o uso de testes paramétricos ou não paramétricos. Foram utilizados os testes *t* de *Student* e o teste exato de Fisher para dados paramétricos e o teste de *Mann-Whitney* para os dados não paramétricos. Os resultados foram considerados estatisticamente significantes quando o valor de  $p < 0,05$ .

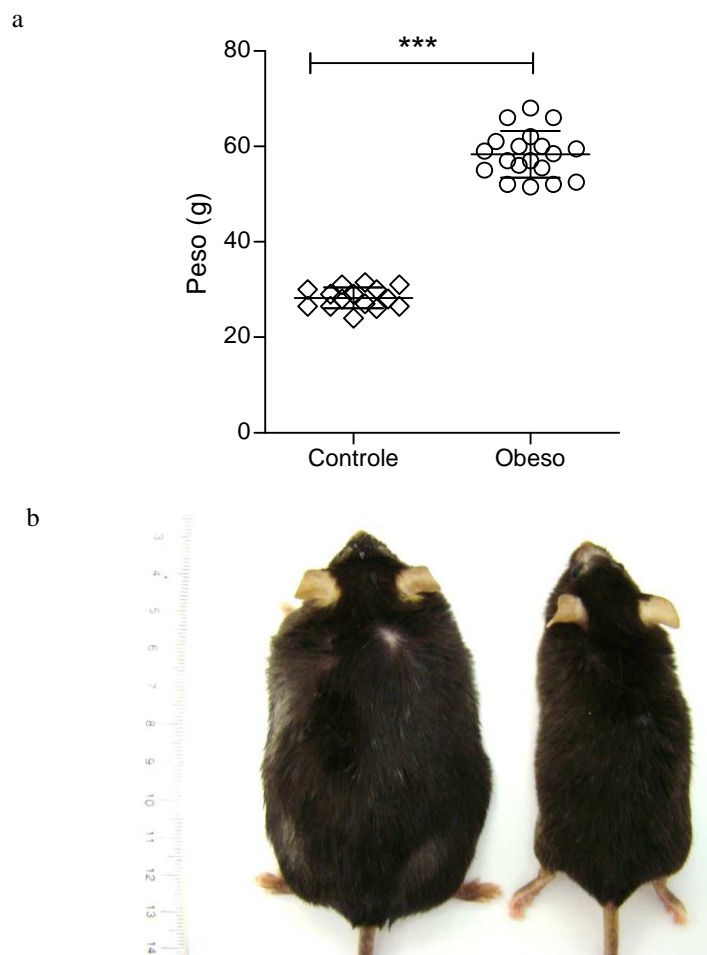
## 5 RESULTADOS

### 5.1 EFEITO DA DIETA NOS CAMUNDONGOS C57BL/6

Em um primeiro momento, alimentamos camundongos C57BL/6 com dieta hipercalórica, com o objetivo de desencadear DHGNA e carcinoma hepatocelular espontâneo (SOUZA, 2010).

#### 5.1.1 Peso

Como descrito anteriormente (SOUZA, 2010), dieta hipercalórica induziu maior ganho de peso nos camundongos do que a dieta do biotério. A média de peso dos animais do grupo controle após 11 meses de acompanhamento foi 28,27g e a média de peso do grupo obeso foi 58,34g (Figura 2).

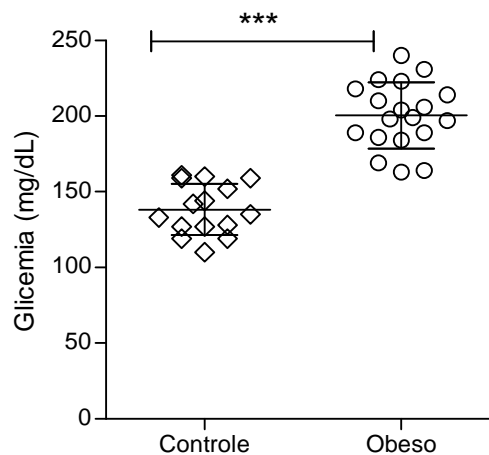


**Figura 2:** Peso e aspecto dos animais após 11 meses de dieta. a. Os animais do grupo controle foram alimentados com a ração regular do biotério e os animais do grupo obeso foram alimentados com a ração hipercalórica e pesados. b. Aspecto dos animais após acompanhamento, sendo um animal da esquerda do grupo obeso, alimentado com ração hipercalórica e o da direita do grupo controle, alimentado com ração regular do biotério. Teste *t* de Student \*\*\* $p < 0,0001$ .

## 5.2 AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA

### 5.2.1 Glicemia

Como esperado, os animais do grupo obeso apresentaram maiores níveis de glicemia em jejum do que os animais do grupo controle após 11 meses de acompanhamento com dieta hipercalórica e regular do biotério. A média de glicemia do grupo controle foi 138,3mg/dl e a média de glicemia do grupo obeso foi 200,4mg/dl. Valores iguais e superiores a 150mg/dl de glicose foram considerados níveis diabéticos. (Figura 3).

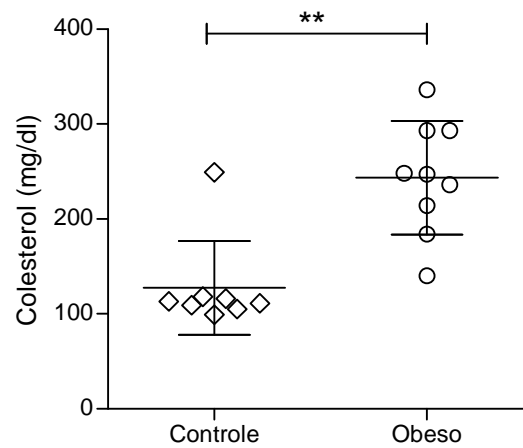


**Figura 3:** Glicemia dos animais após 11 meses de acompanhamento. Foram determinados os níveis séricos de glicose dos animais obesos e do grupo controle. Teste *t* de Student \*\*\* $p < 0,0001$ .

### 5.2.2 Colesterol

Ao final de 11 meses de acompanhamento, o grupo de animais obesos apresentou níveis de colesterol sérico significativamente mais alto do que os animais do grupo controle, como similarmente descrito (SOUZA, 2010). A média de colesterol sérico do grupo controle foi 127,5mg/dl e a média do grupo obeso foi 243,4 mg/dl. (Figura 4).

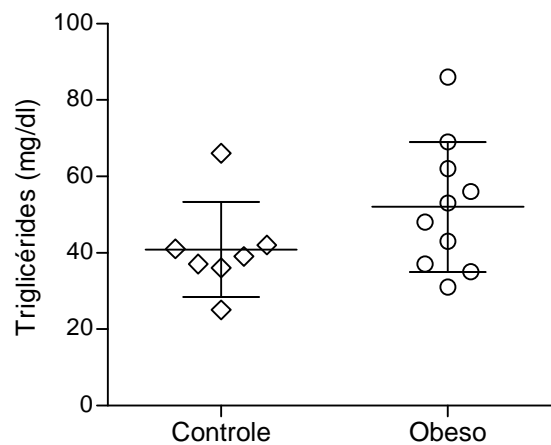




**Figura 4:** Colesterol sérico dos animais após 11 meses de acompanhamento. Foram determinados os níveis os séricos de colesterol dos animais obesos e do grupo controle. Teste *t* de Student  $**p=0,0025$ .

### 5.2.3 Triglicérides

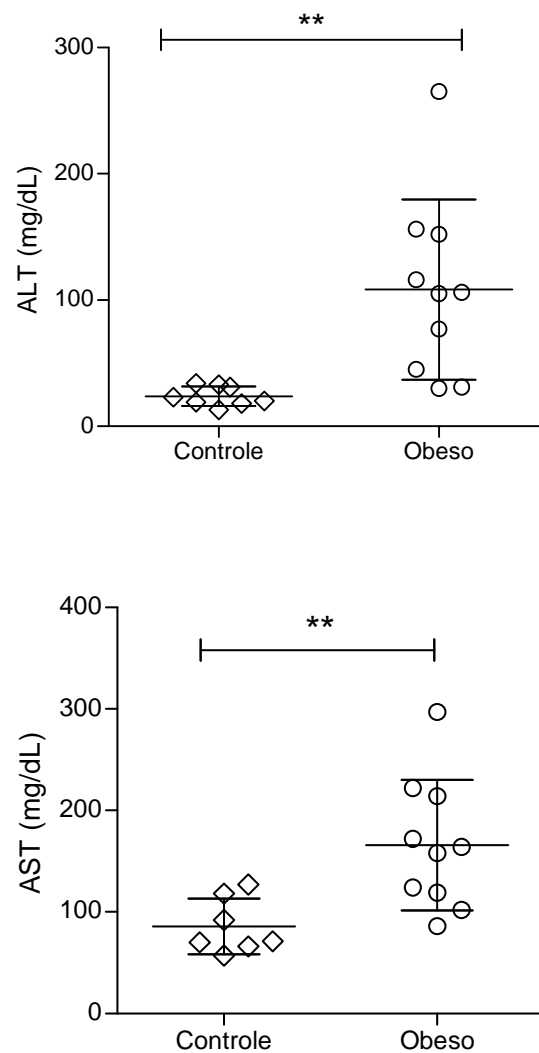
Não houve diferença significativa nos níveis de triglicérides entre os animais de grupo controle e os animais do grupo obeso. A média de triglicérides do grupo de animais controle foi 40,86 mg/dl e a média de triglicérides do grupo obeso foi 52,0 mg/dl. (Figura 5).



**Figura 5:** Níveis de triglicérides sérico dos animais após 11 meses de acompanhamento. Teste *t* de Student  $p= 0,2043$ .

### 5.2.4 ALT e AST

Os níveis séricos de ALT e AST foram mais elevados no grupo dos animais obesos do que no grupo dos animais controle, indicando lesão hepatocelular, como mostrado por SOUZA (2010). O valor médio de ALT no grupo controle foi 23,88mg/dl e no grupo obeso foi 108,3 mg/dl. O valor médio de AST no grupo controle foi 85,86mg/dl e no grupo obeso foi 165,85 mg/dl. (Figura 6).



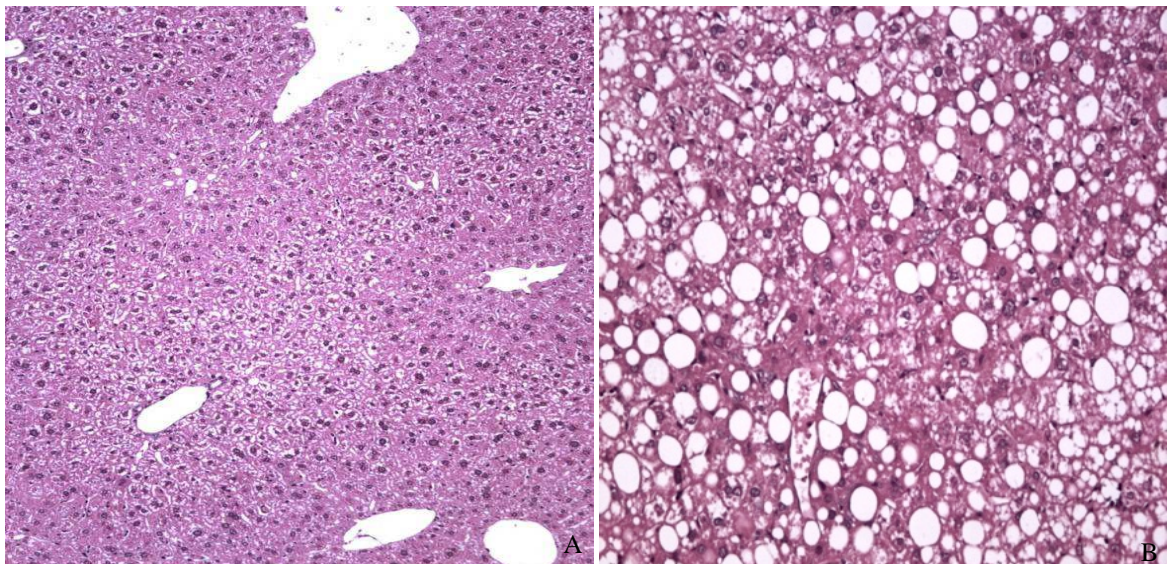
**Figura 6:** Níveis de ALT e AST séricos dos animais após 11 meses de acompanhamento. a. ALT, Teste *t* de Student  $p^{**}= 0,0045$ . b. AST, Teste *t* de Student  $p^{**}= 0,0076$ .

### 5.3 AVALIAÇÃO ANÁTOMO-PATOLÓGICA

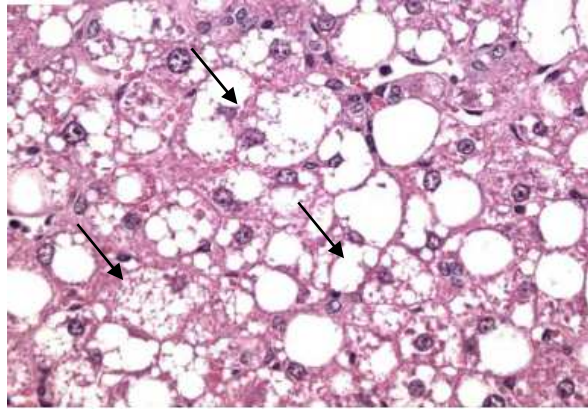
Como esperado, todos os fígados dos animais do grupo obeso apresentaram esteatose, balonização hepatocelular, inflamação lobular e fibrose peri-sinusoidal, critérios para o diagnóstico de esteato-hepatite (SOUZA, 2010, PALMA 2012).

A esteatose foi do tipo macrovacuolar, difusa, mais intensa na região peri-central, como ocorre na doença humana. Nenhum animal do grupo controle apresentou esteatose. (Figuras 7, 8).

A balonização hepatocelular ocorreu em todos os fígados dos animais do grupo obeso. A balonização foi moderada a intensa em todos os fígados, com concentração maior nas zonas pericentrais (Figura 8). Muitos hepatócitos exibiam corpúsculos de Mallory-Denk (SOUZA, 2010, PALMA 2012).

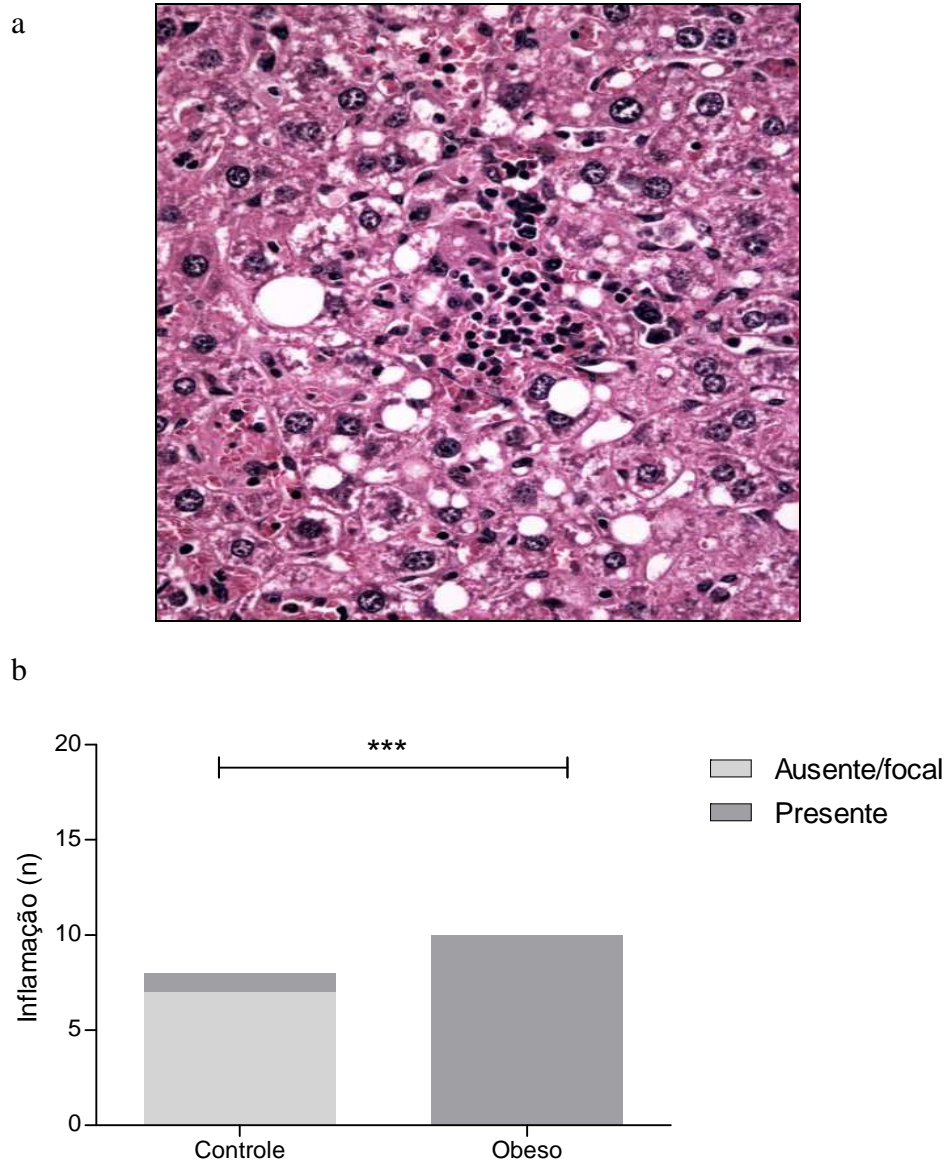


**Figura 7:** Avaliação da esteatose. Fígado de animal do grupo controle (A) (HE, 100X) e do grupo obeso (B) (HE, 200X).



**Figura 8:** Avaliação anátomo-patológica do fígado de animal do grupo obeso. Esteatose macrovacuolar em zona 3 e balonização hepatocelular (setas. (HE, 400X).

A inflamação lobular, caracterizada por pequenos focos de infiltrado inflamatório no parênquima, com células mononucleares e polimorfonucleares, ocorreu predominantemente nos fígados de animais do grupo obeso. (Figura 9). Apenas um animal do grupo controle apresentou em área focal inflamação lobular.



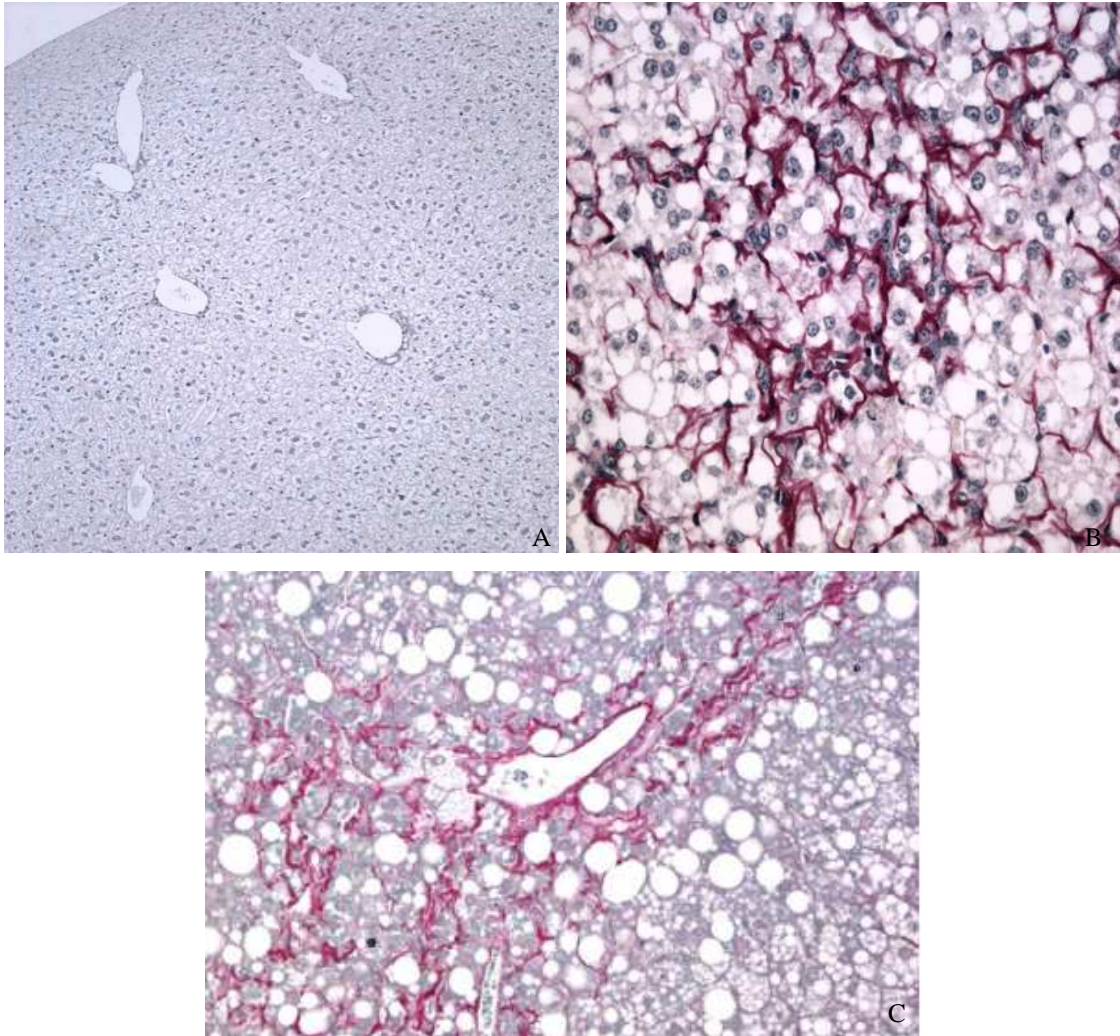
**Figura 9.** Avaliação da inflamação. a. Inflamação lobular no fígado de animal obeso. (HE, 400X). b. Avaliação semi-quantitativa da inflamação lobular. Teste exato de *Fisher* \*\*\* $p=0,0003$ . Um experimento representativo de três realizados.

A presença de fibrose peri-sinusoidal ocorreu apenas no grupo dos animais obesos (Figura 10). A fibrose se caracterizou por ocorrer em zonas peri-centrais. Nenhum animal apresentou cirrose. Apenas um animal mostrou fibrose peri-sinusoidal com septos finos. No grupo controle, observou-se ocorrência de discreta fibrose subcapsular em três animais. Esse tipo de fibrose está relacionado ao envelhecimento e é diferente do padrão descrito na esteato-hepatite.

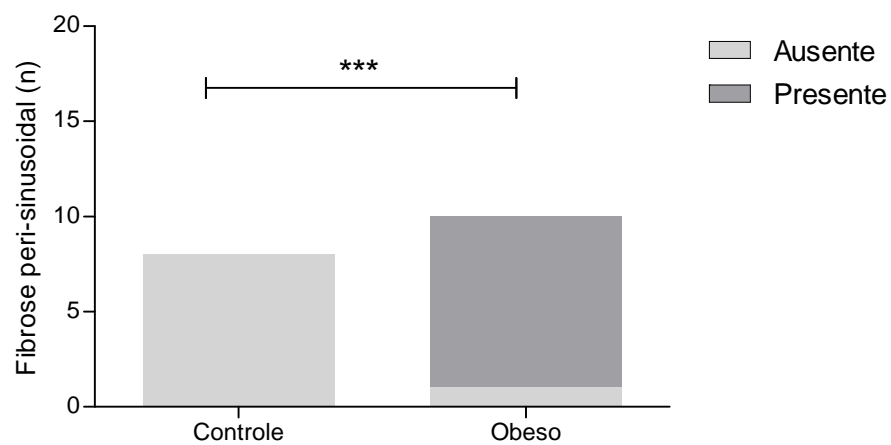
Esses achados evidenciam que nesse estudo, os camundongos C57BL/6 alimentados com dieta hipercalórica reproduziram os achados clínicos, laboratoriais e histopatológicos anteriormente descritos (SOUZA, 2010, PALMA 2012).



a



b



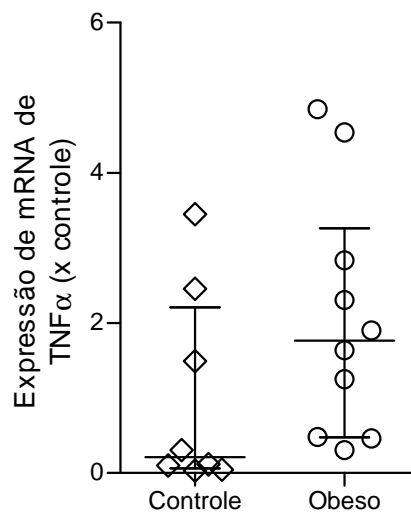
**Figura 10.** Avaliação da fibrose. a. Fígado de animal do grupo controle (A) (Picro Sírius Vermelho, 100X) e do grupo obeso (B e C). (Picro Sírius Vermelho, 400X). b. Avaliação semi-quantitativa da fibrose. Teste exato de *Fisher* \*\*\* $p=0,0004$ . Um experimento representativo de três realizados.

## 5.4 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA RELACIONADA À INFLAMAÇÃO E FIBROSE

Em seguida, fomos avaliar a resposta inflamatória no tecido que desenvolveu estaetio-hepatite secundária a dieta.

### 5.4.1 TNF- $\alpha$

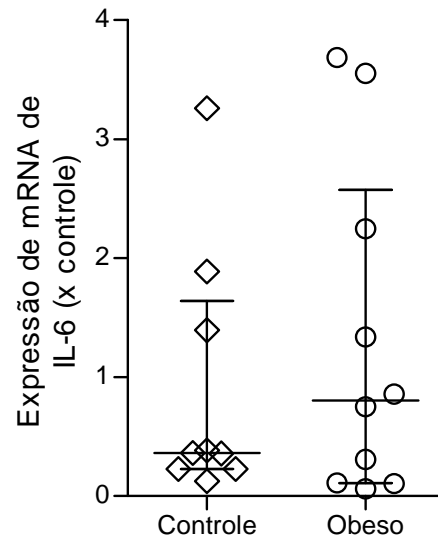
A quantificação relativa da expressão de TNF- $\alpha$  mostrou expressão de RNA mensageiro de TNF- $\alpha$  2,0 vezes maior no grupo de animais obesos em relação ao grupo controle, reforçando os resultados da avaliação semi-quantitativa, que mostrou mais inflamação no parênquima hepático dos animais obesos. (Figura 11).



**Figura 11.** Quantificação relativa da expressão de RNA mensageiro de TNF- $\alpha$ . Teste *t*,  $p=0,15$ .

### 5.4.2 IL-6

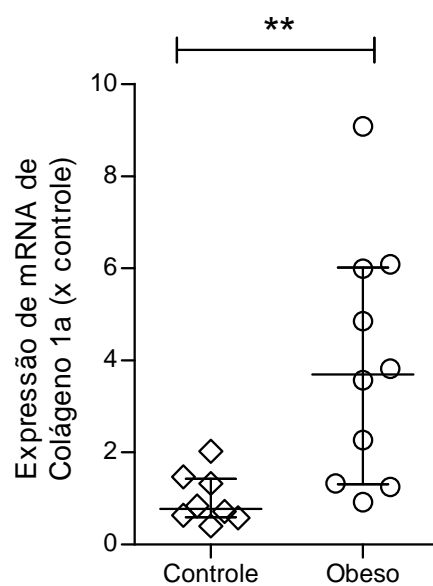
A quantificação relativa da expressão de IL-6 mostrou expressão de RNA mensageiro de IL-6 1,3 vezes maior no grupo de animais obesos em relação ao grupo controle, reforçando os resultados da avaliação semi-quantitativa, que mostrou mais inflamação no parênquima hepático dos animais obesos. (Figura 12).



**Figura 12.** Quantificação relativa da expressão de RNA mensageiro de IL-6. Teste *t*,  $p=0,5$ .

#### 5.4.3 Avaliação da expressão de Colágeno 1a

A quantificação relativa da expressão de Colágeno 1a mostrou expressão de RNA mensageiro de Colágeno 1a 3,9 vezes maior no grupo de animais obesos em relação ao grupo controle, confirmando os resultados da avaliação semi-quantitativa, que mostrou maior presença de fibrose nos fígados dos animais obesos em relação aos animais do grupo controle. (Figura 13).



**Figura 13.** Quantificação relativa da expressão de RNA mensageiro de Colágeno 1a. Teste *t*,  $**p=0,0074$ .

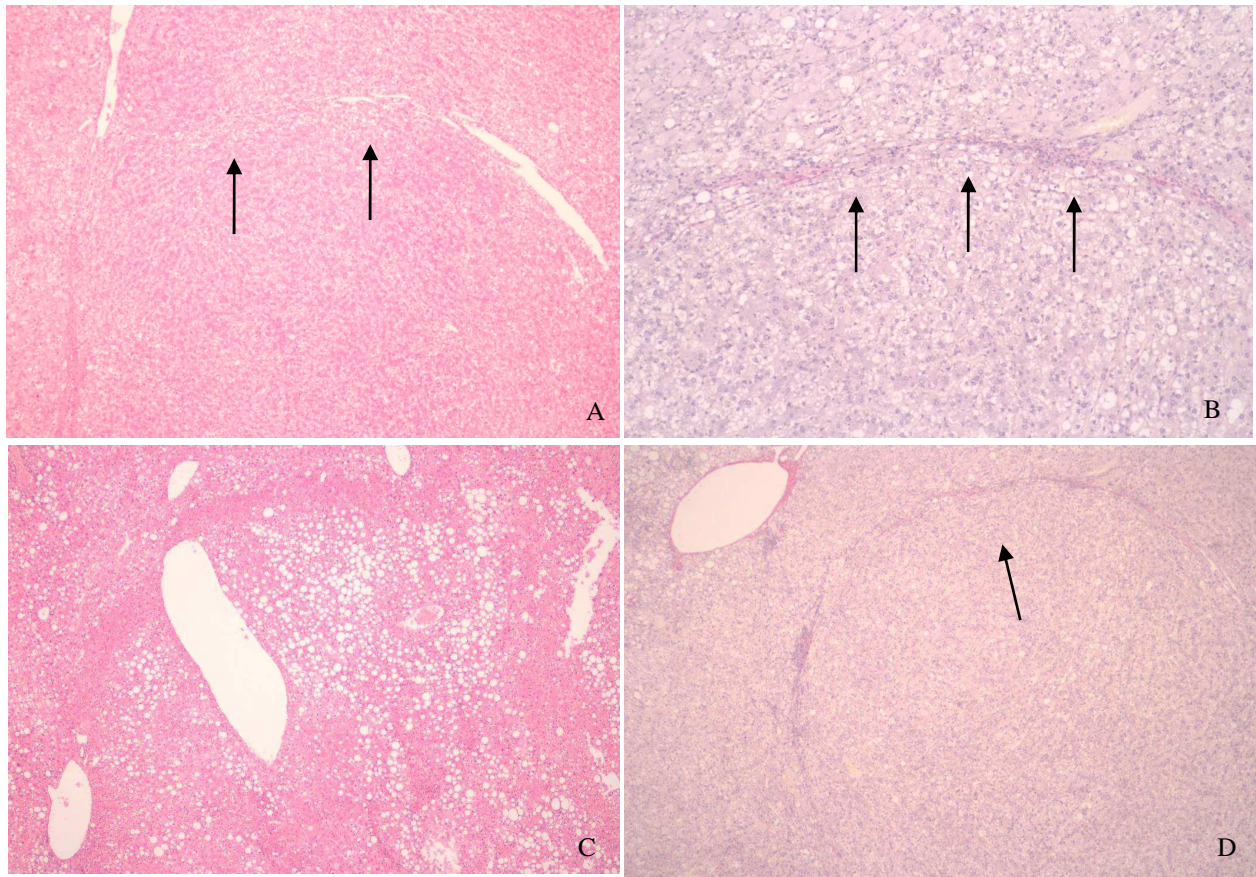


## 5.5 OCORRÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO DE CARCINOMA HEPATOCELULAR

Em 40% dos animais do grupo obeso (4 de 10 animais) observou-se à macroscopia a ocorrência de CHC. Todos os carcinomas eram bem delimitadas e tinham coloração esbranquiçada, mais clara que o parênquima hepático adjacente. (Figura 14). À microscopia, as neoplasias eram constituídas por hepatócitos com discretas atipias nucleares, mostravam celularidade maior que o fígado adjacente, além de borda expansiva, com efeito de compressão no parênquima ao lado. Frequentemente, eram observados vasos arteriais desacompanhados de ramos de veia porta ou de ducto biliar. Os hepatócitos malignos frequentemente mostravam esteatose macrovacuolar e balonização, além da presença de focos de infiltrado inflamatório misto na neoplasia e alguns corpúsculos de Mallory-Denk. As características apresentadas pelas neoplasias são consistentes com carcinoma hepatocelular, variante esteato-hepatítica, descrita em humanos. (Figuras 15, 16).

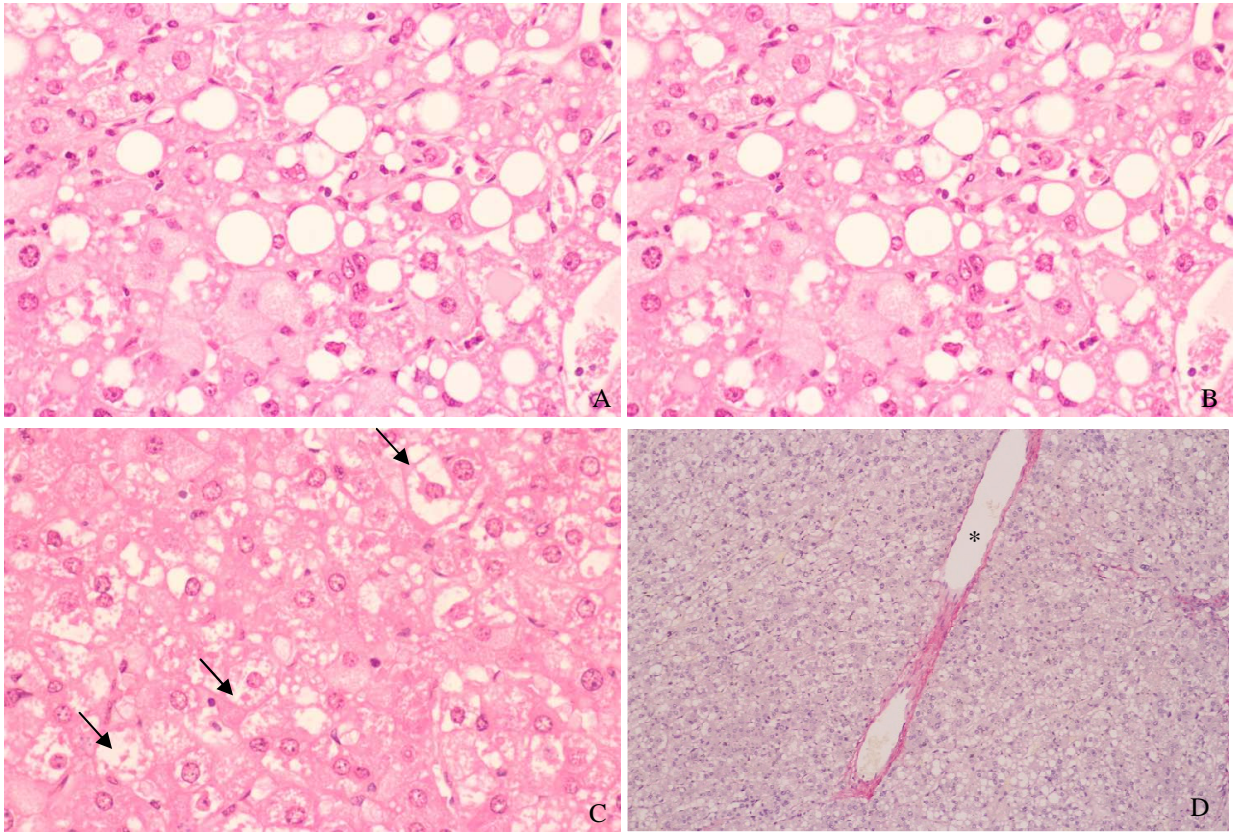


**Figura 14.** Carcinomas hepatocelulares. Macroscopia dos carcinomas em fígados dos animais do grupo obeso.



**Figura 15.** Microscopia de carcinoma em fígado de animal do grupo obeso. A neoplasia exibe borda compressiva (setas) (A, HE, 100X e B,D Picro Sírius Vermelho, 100X ). Esteatose no carcinoma hepatocelular (C) (HE 100X).





**Figura 16.** Carcinoma em fígado de animal do grupo obeso. A neoplasia exibe esteatose macrovacuolar, balonização hepatocelular (A, B) e corpúsculos de Mallory-Denk (setas). (C) (HE, 400X). Vaso arterial (\*) desacompanhado de ramo da veia porta e de ducto biliar na neoplasia (D) (Picro Sírius Vermelho, 100X).

## 5.6 AVALIAÇÃO DA VIA HEDGEHOG NO PARÊNQUIMA HEPÁTICO

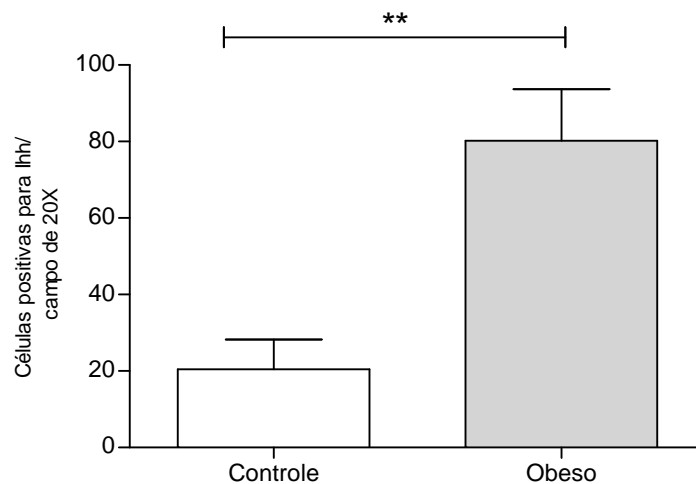
### 5.6.1 Avaliação da via Hedgehog por imuno-histoquímica no parênquima hepático

Inicialmente, para avaliar se havia ativação da via Hh no modelo, foi feita marcação imuno-histoquímica para o ligante da via Hh, Indian Hedgehog, o fator de transcrição da via, Gli2, e osteopontina (alvo final da sinalização Hh). Foi feita marcação para células progenitoras hepáticas com o marcador SOX-9.

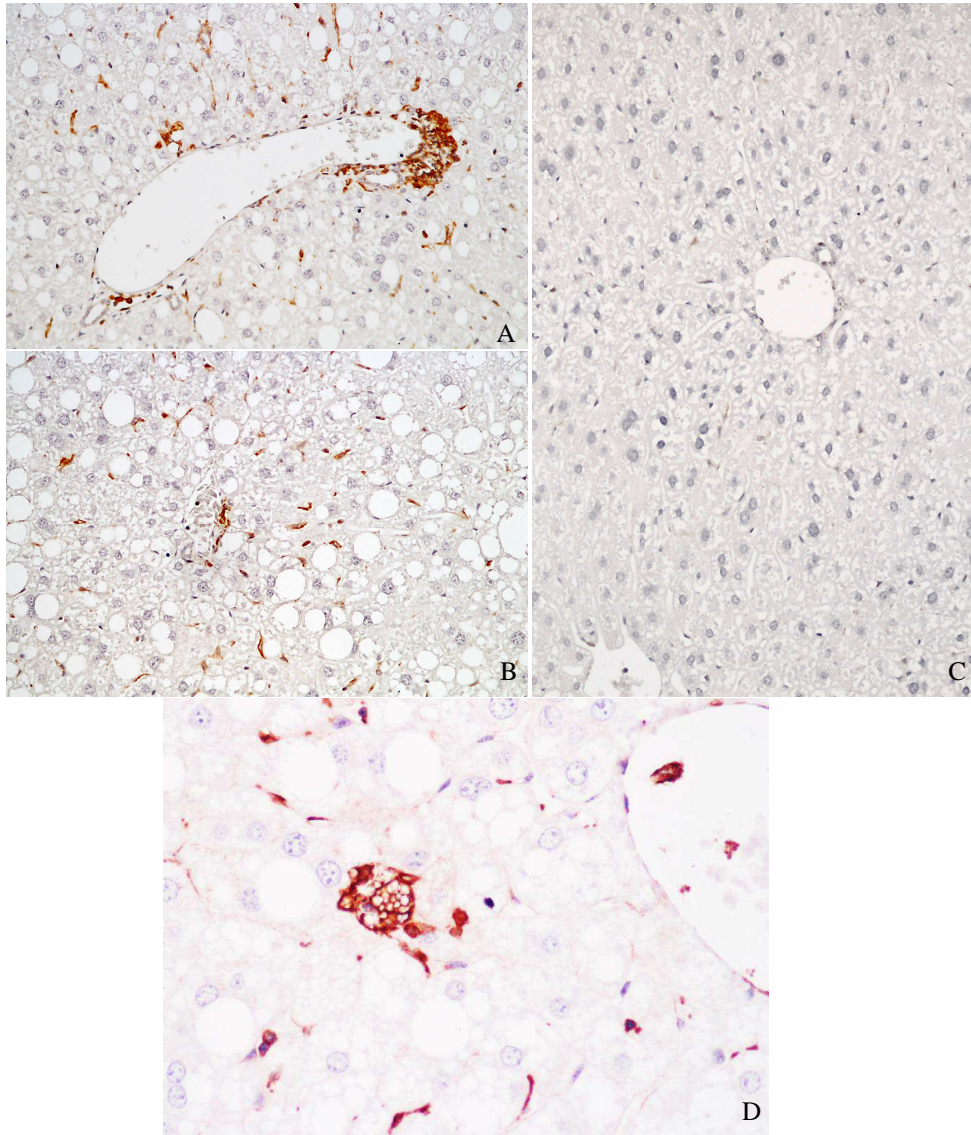
#### 5.6.1.1 *Indian Hedgehog*

Houve maior número de células marcadas por imuno-histoquímica para Ihh no grupo obeso do que no grupo controle. A média de células positivas para Ihh no grupo controle foi  $20.48 \pm 7.75$  células e a média de células positivas no grupo obeso foi  $80.24 \pm 13.46$  células. (Figura 17). A imuno-histoquímica mostrou marcação positiva para Ihh em linfócitos, macrófagos, células estelares hepática e em hepatócitos balonizados no fígado de animais obesos.

a



b



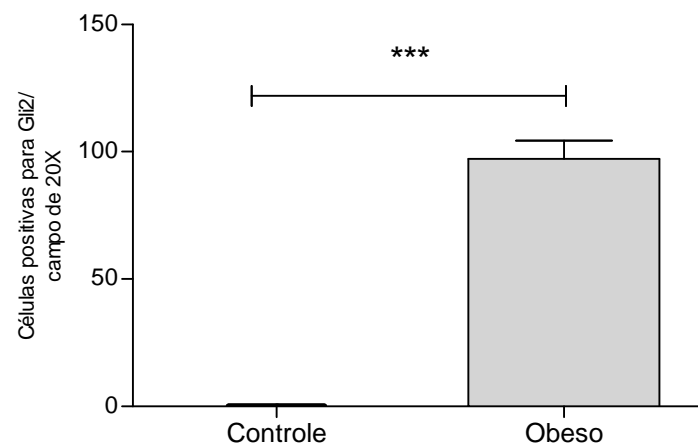
**Figura 17. Avaliação da expressão de Ihh.** a. Avaliação semi-quantitativa da expressão de Ihh por imuno-histoquímica. Teste *t*,  $**p=0,0049$ . b. Marcação por imuno-histoquímica para Ihh em linfócitos, macrófagos e em células estelares hepática em fígado de animal obeso (A, B, 200X). Marcação positiva para Ihh em hepatócito balonizado (D, 400X).



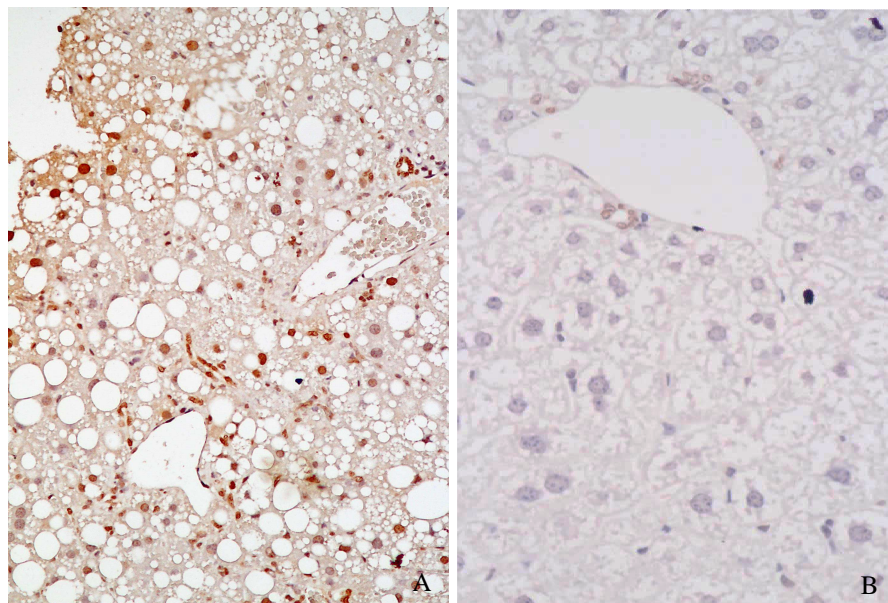
### 5.6.1.2 Gli2

Houve maior número de células marcadas por imuno-histoquímica para Gli2 no grupo obeso do que no grupo controle. A média de células positivas para Gli2 no grupo controle foi  $0.04 \pm 0.04$  células e a média de células positivas no grupo obeso foi  $97.16 \pm 7.31$  células. (Figura 18). A marcação para Gli2 ocorreu em hepatócitos e células ductulares em fígado de animal obeso.

a



b

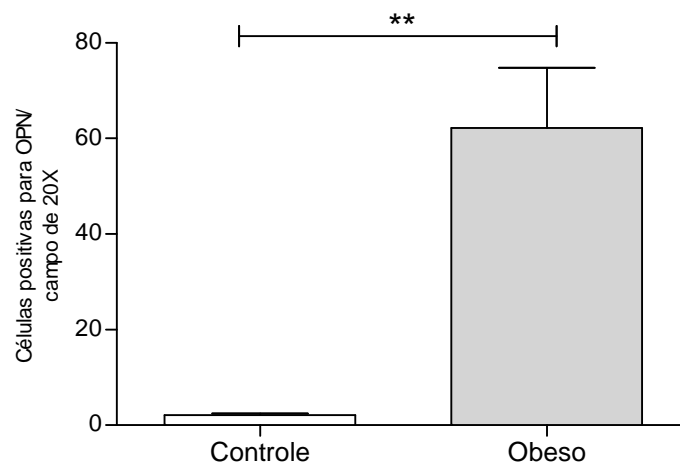


**Figura 18.** Avaliação da expressão de Gli2. a. Avaliação semi-quantitativa da expressão de Gli2. Teste  $t$  \*\*\* $p < 0,0001$ . b. Marcação positiva por imuno-histoquímica para Gli2 em hepatócitos e células ductulares em fígado de animal obeso (A, B, 200X).

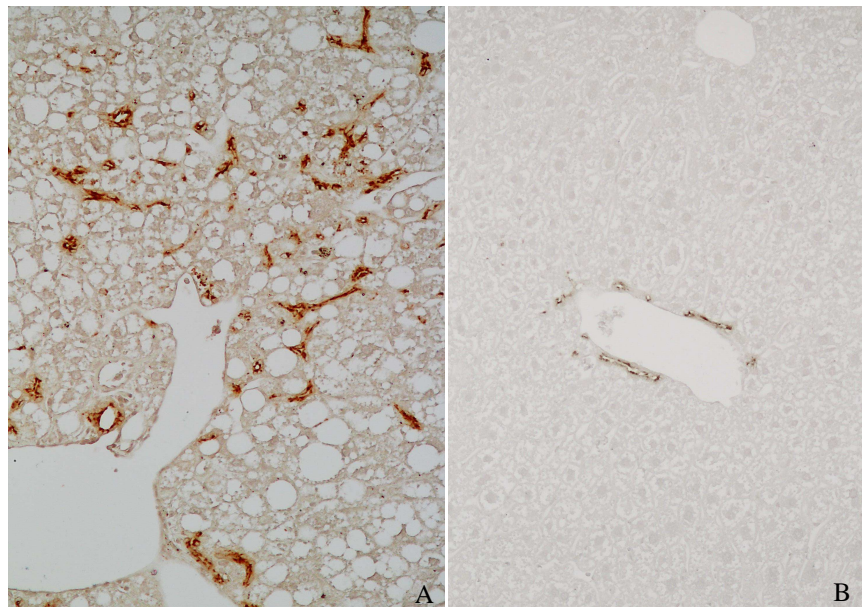
### 5.6.1.3 Osteopontina

Houve maior número de células marcadas por imuno-histoquímica para OPN no grupo obeso do que no grupo controle. A média de células positivas para OPN no grupo controle foi  $2.16 \pm 0.33$  células e a média de células positivas no grupo obeso foi  $62.16 \pm 12.6$  células. (Figura 19). A marcação positiva por imuno-histoquímica para OPN ocorreu em células ductulares e em células estelares nos fígados dos animais obesos.

a



b



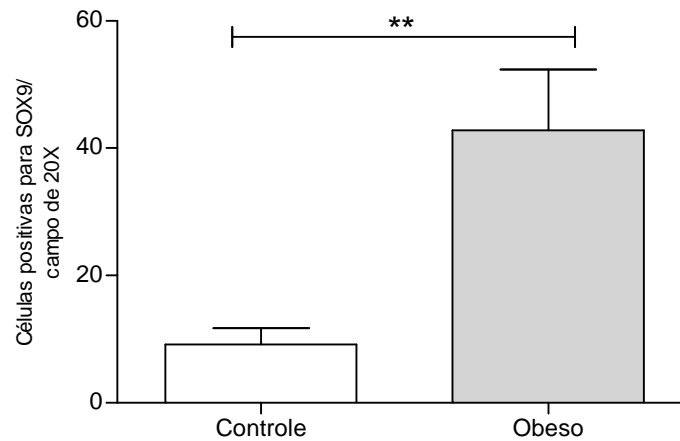
**Figura 19.** Avaliação da expressão de OPN. a Avaliação semi-quantitativa da expressão de OPN. Teste  $t^{***}p=0,0014$ . b. Marcação positiva por imuno-histoquímica para OPN em células ductulares e em células estelares em fígado de animal obeso (A, B, 200X).



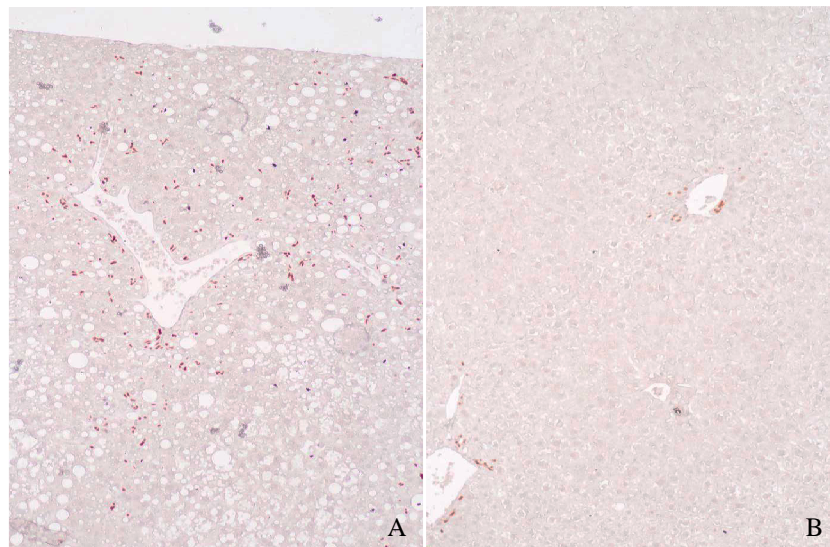
#### 5.6.1.4 SOX-9

Houve maior número de células marcadas por imuno-histoquímica para SOX-9 (marcador de célula progenitora hepática) no grupo obeso do que no grupo controle. A média de células positivas para SOX-9 no grupo controle foi  $9.2 \pm 2.55$  células e a média de células positivas no grupo obeso foi  $42.84 \pm 9.56$  células. (Figura 20).

a



b

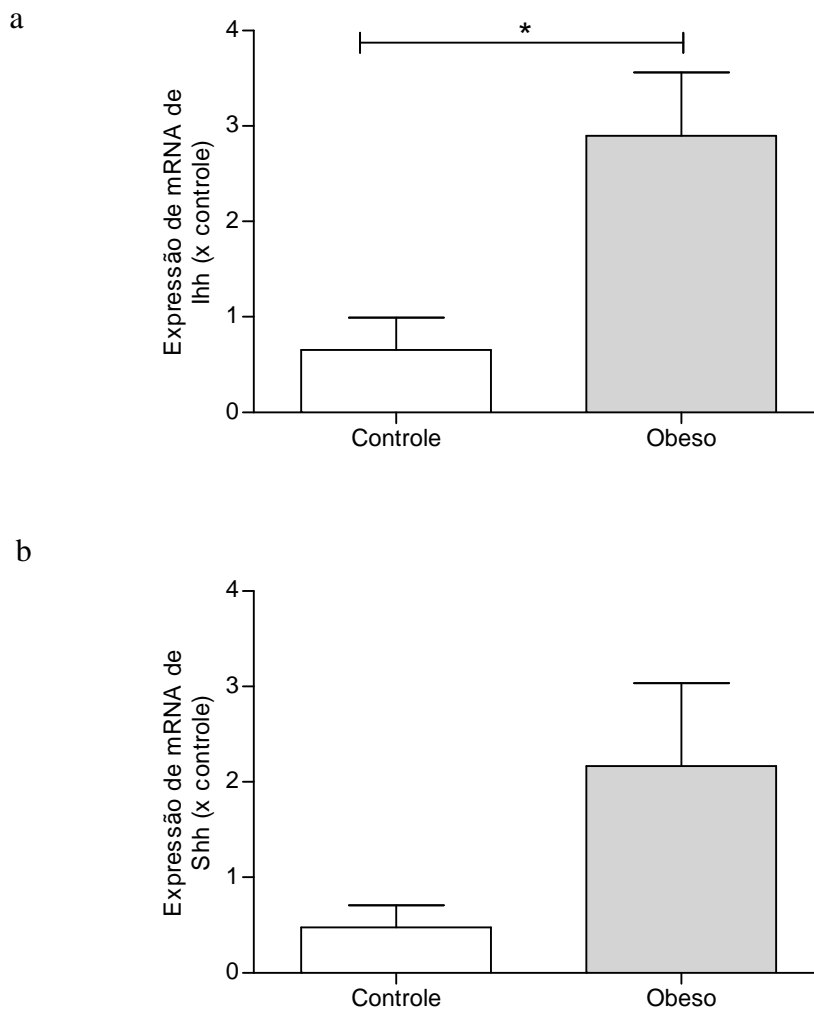


**Figura 20.** Avaliação da expressão de SOX-9. a. Avaliação semi-quantitativa da expressão de SOX-9. Teste  $t$   $**p=0,0094$ . b. Marcação positiva por imuno-histoquímica para SOX-9 em células em fígado de animal obeso (A, 200X) e em animal controle (B, 200X).

## 5.6.2 Avaliação da expressão gênica da via Hedgehog no parênquima hepático

### 5.6.2.1 Indian Hedgehog e Sonic Hedgehog

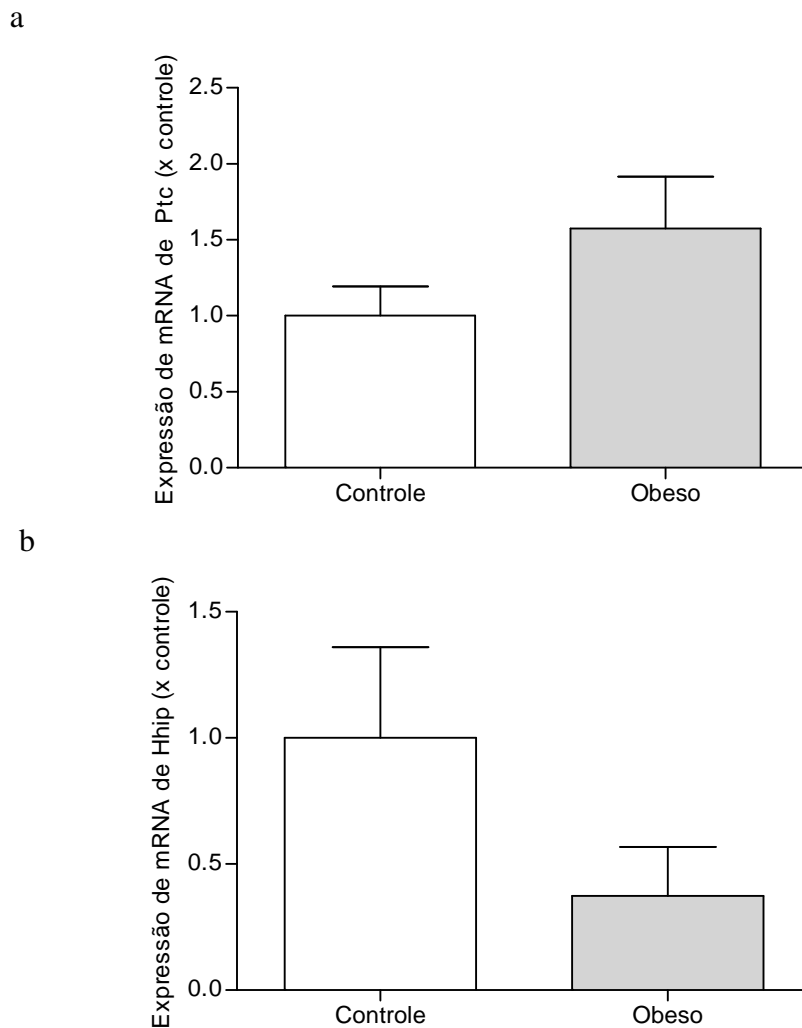
A quantificação relativa da expressão de Indian Hedgehog, ligante da via Hh no fígado, mostrou expressão de RNA mensageiro de *Ihh* 3,9 vezes maior no grupo de animais obesos em relação ao grupo controle, confirmando os resultados da avaliação semi-quantitativa da imuno-histoquímica, que mostrou maior presença de *Ihh* no parênquima hepático dos animais obesos. A quantificação relativa da expressão de Sonic Hedgehog, outro ligante da via Hh no fígado, mostrou expressão de RNA mensageiro de *Shh* 2,1 vezes maior no grupo de animais obesos em relação ao grupo controle. (Figura 21).



**Figura 21.** Quantificação relativa da expressão de RNA mensageiro. a. *Ihh* Teste  $t$  \* $p=0,015$ . b. *Shh* Teste  $t$   $p=0,13$ .

### 5.6.2.2 Patched e Hhip

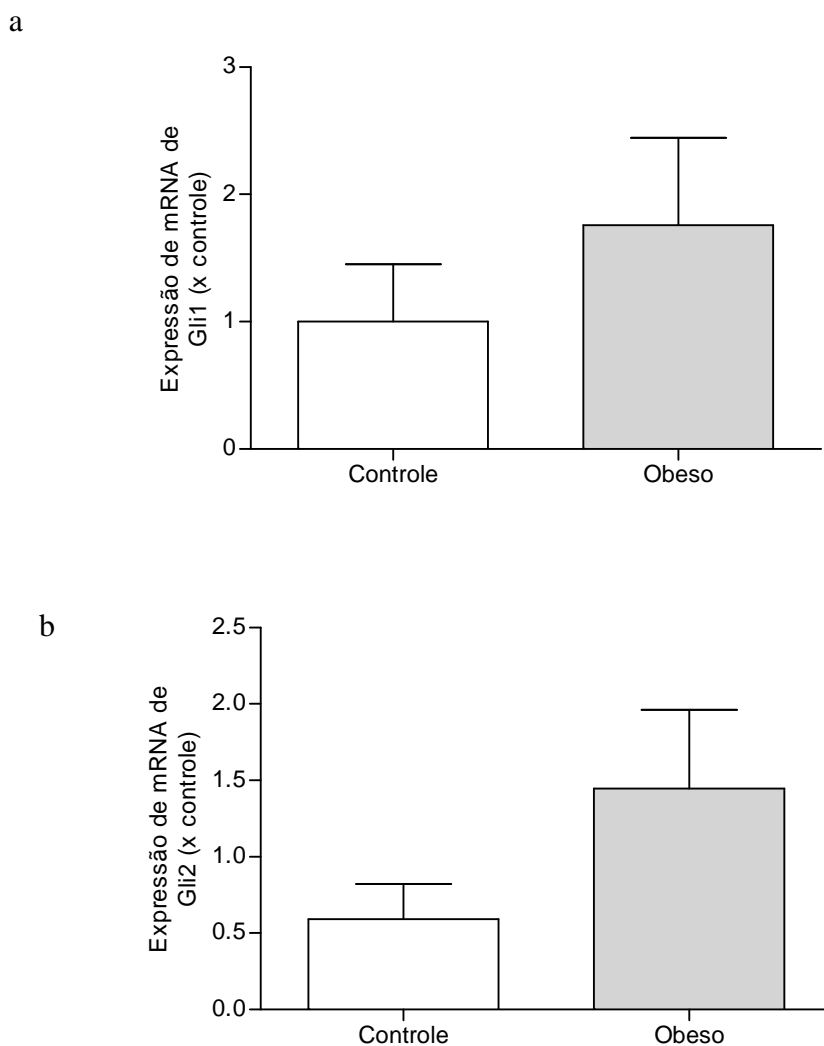
A quantificação relativa da expressão de Patched, o receptor de membrana da via Hh no fígado, mostrou expressão de RNA mensageiro de *ptc* 2,0 vezes maior no grupo de animais obesos em relação ao grupo controle. A quantificação relativa da expressão de Hhip, molécula inibitória da via Hh, mostrou menor expressão de RNA mensageiro de *hhip* no grupo de animais obesos em relação ao grupo controle. Em 30% dos animais do grupo obeso não foi detectada expressão de *hhip*. (Figura 22).



**Figura 22.** Quantificação relativa da expressão de RNA mensageiro. a. Ptc Teste  $t$   $p=0,17$ . b. Hhip Teste  $t$   $p=0,12$ .

### 5.6.2.3 *Gli1* e *Gli2*

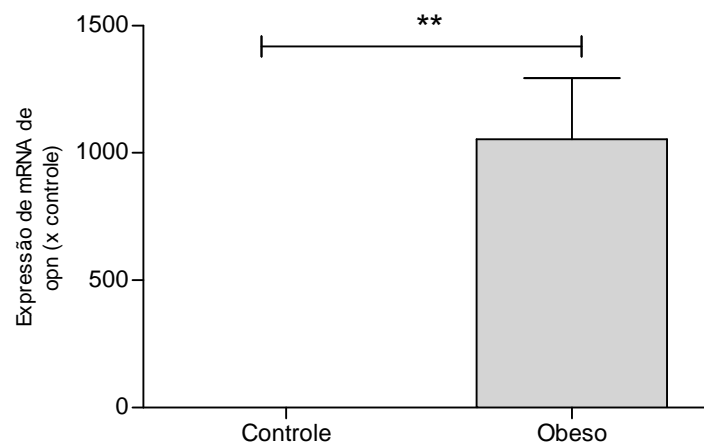
A quantificação relativa da expressão de *Gli1*, fator de transcrição da via Hh no fígado, mostrou expressão de RNA mensageiro de *gli1* 1,7 vezes maior no grupo de animais obesos em relação ao grupo controle. A quantificação relativa da expressão de *Gli2*, outro fator de transcrição da via Hh ativado por *Gli1*, mostrou expressão de RNA mensageiro de *gli2* 1,4 vezes maior no grupo de animais obesos em relação ao grupo controle, confirmando os resultados da avaliação semi-quantitativa da imuno-histoquímica, que mostrou maior presença de *Gli2* no parênquima hepático dos animais obesos. (Figura 23).



**Figura 23.** Quantificação relativa da expressão de RNA mensageiro. a. *Gli1* Teste  $t p=0,39$ . b. *Gli2* Teste  $t p=0,22$ .

#### 5.6.2.4 Osteopontina

A quantificação relativa da expressão de Osteopontina, gene alvo da via Hh, mostrou expressão de RNA mensageiro de OPN 1054 vezes maior no grupo de animais obesos em relação ao grupo controle, confirmando os resultados da avaliação semi-quantitativa da imuno-histoquímica, que mostrou maior presença de OPN no parênquima hepático dos animais obesos. (Figura 24).



**Figura 24.** Quantificação relativa da expressão de RNA mensageiro. OPN. Teste  $t$   $**p=0,0013$ .

## 5.7 AVALIAÇÃO DA VIA HEDGEHOG NOS CARCINOMAS HEPATOCELULARES

### 5.7.1 Avaliação da via Hedgehog por imuno-histoquímica nos carcinomas hepatocelulares

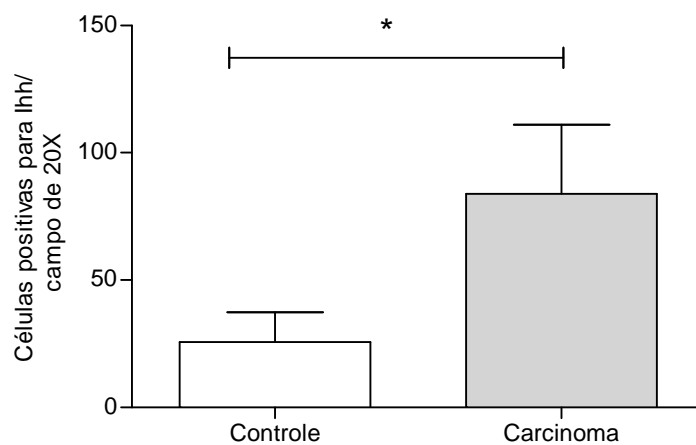
Para complementar a avaliação da expressão gênica da via Hedgehog, foi feita a avaliação semi-quantitativa da expressão das proteínas dessa via nos carcinomas hepatocelulares.

#### 5.7.1.1 Indian Hedgehog

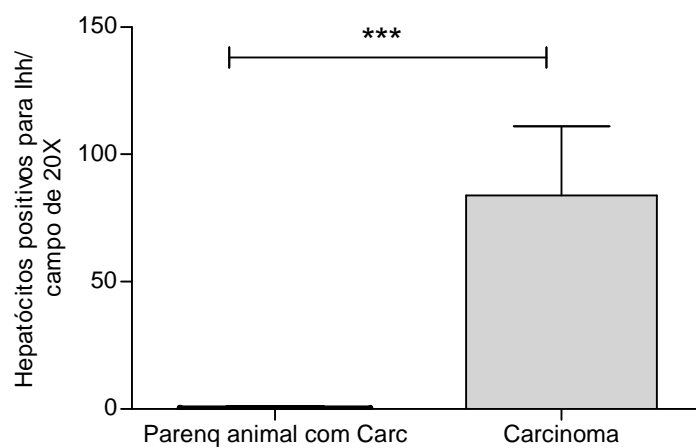
Os carcinomas hepatocelulares mostram intensa marcação para Ihh. Além da expressão de Ihh nas células inflamatórias e células estrelares hepáticas, houve marcação no citoplasma dos hepatócitos neoplásicos, com granações grosseiras (Figura 25). A avaliação semi-quantitativa por imuno-histoquímica da expressão de Ihh mostrou maior expressão de Ihh nos CHC, quando comparado com as células dos animais controle. A média de células positivas para Ihh no grupo controle foi  $25,67 \pm 11,62$  e nos CHC foi  $83,90 \pm 27,17$ .

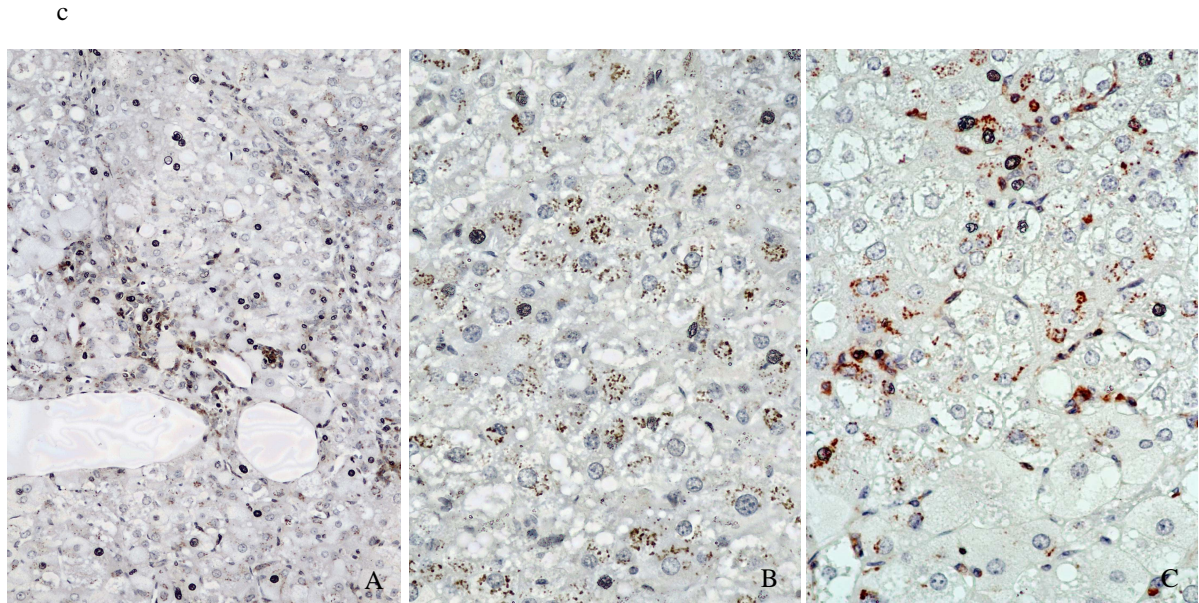
Comparando-se a expressão de Ihh entre os hepatócitos malignos e os hepatócitos do parênquima não neoplásico dos animais que desenvolveram carcinoma, não houve positividade para Ihh nos hepatócitos dos animais obesos sem carcinoma. A média de hepatócitos malignos positivos para Ihh foi  $83,90 \pm 21,17$ . (Figura 25).

a



b

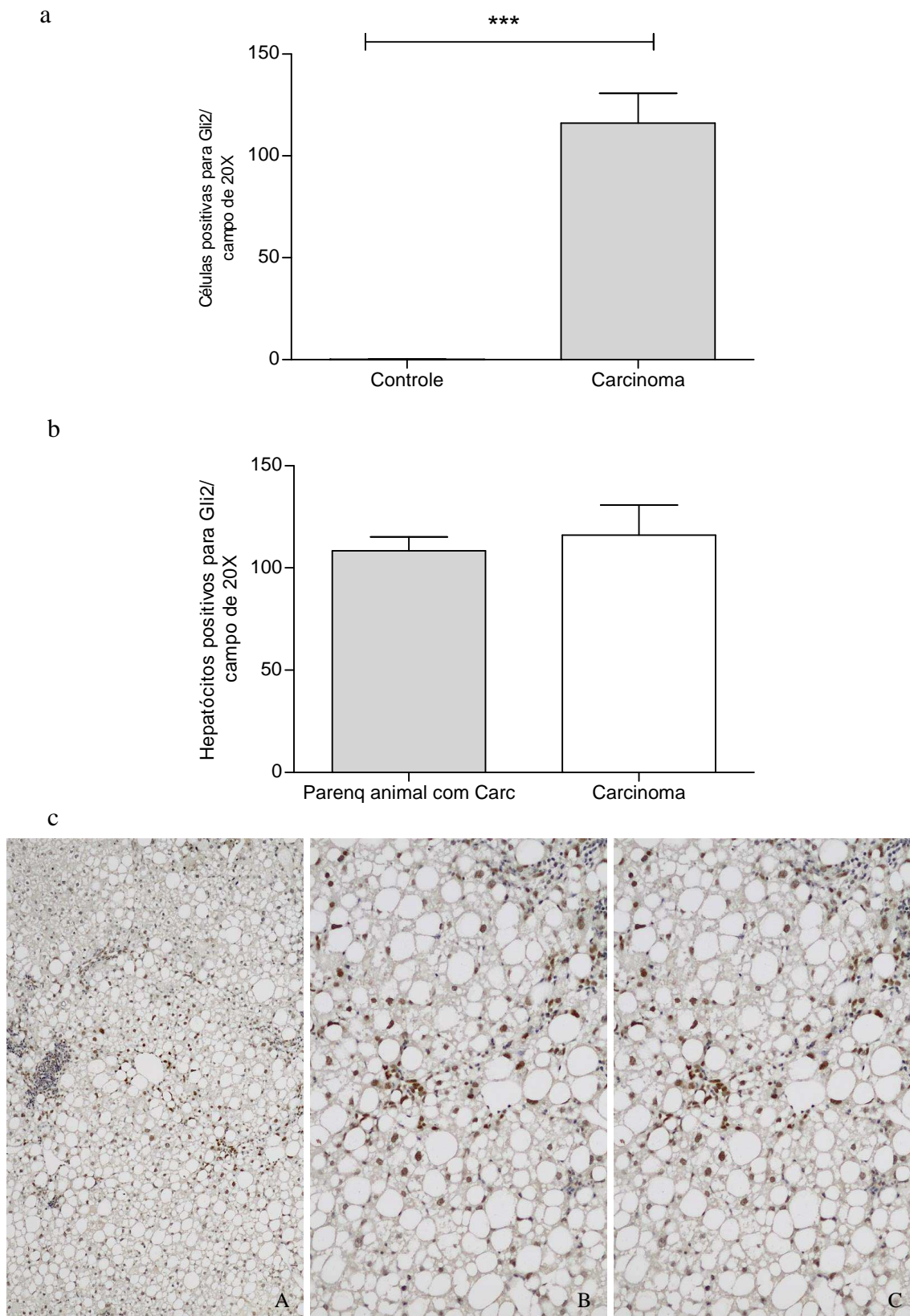




**Figura 25. Avaliação por imuno-histoquímica de expressão de Ihh.** a. Avaliação semi-quantitativa da expressão de Ihh controle x CHC. Teste  $t$  \* $p=0,044$ . b. Avaliação semi-quantitativa da expressão de Ihh hepatócitos malignos x hepatócitos em parênquima não neoplásicos de animais obesos com CHC. Teste  $t$  \*\*\* $p=0,0006$ . c. Marcação positiva em células inflamatórias e em células estelares (A, 100X) e no citoplasma de hepatócitos malignos (B,C 200X).

#### 5.7.1.2. *Gli2*

Os carcinomas hepatocelulares mostram intensa marcação para *Gli2*. Houve marcação nuclear dos hepatócitos neoplásicos (Figura 26). A avaliação semi-quantitativa por imuno-histoquímica da expressão de *Gli2* mostrou maior expressão de *Gli2* nos CHC, quando comparado com as células dos animais controle. A média de células positivas para *Gli2* no grupo controle foi  $0,16 \pm 0,11$  e nos CHC foi  $116 \pm 14,76$ . Comparando-se a expressão de *Gli2* entre o parênquima não neoplásico dos animais que desenvolveram carcinoma e os CHC, não houve diferença entre os grupos. A média de células positivas para *Gli2* no parênquima não neoplásico dos animais que desenvolveram carcinoma foi  $108,4 \pm 6,77$  células e média de células positivas nos CHC foi de  $108,4 \pm 6,77$  células. (Figura 26).



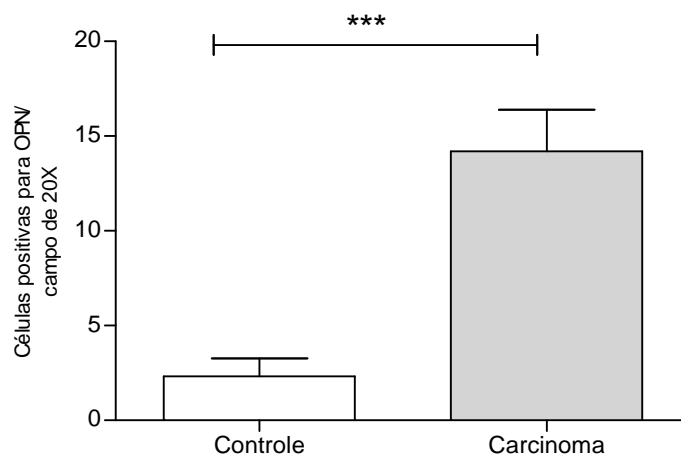
**Figura 26. Avaliação por imuno-histoquímica de expressão de Gli2.** a. Avaliação semi-quantitativa da expressão de Gli2 controle x CHC. Teste  $t$  \*\*\* $p < 0,0001$ . b. Avaliação semi-quantitativa da expressão de Gli2 hepatócitos malignos x hepatócitos em parênquima não neoplásicos de animais obesos com HC. Teste  $t$   $p = 0,30$ . c. Marcação positiva para Gli2 em núcleo de hepatócitos (A, 100X e B,C 200X).

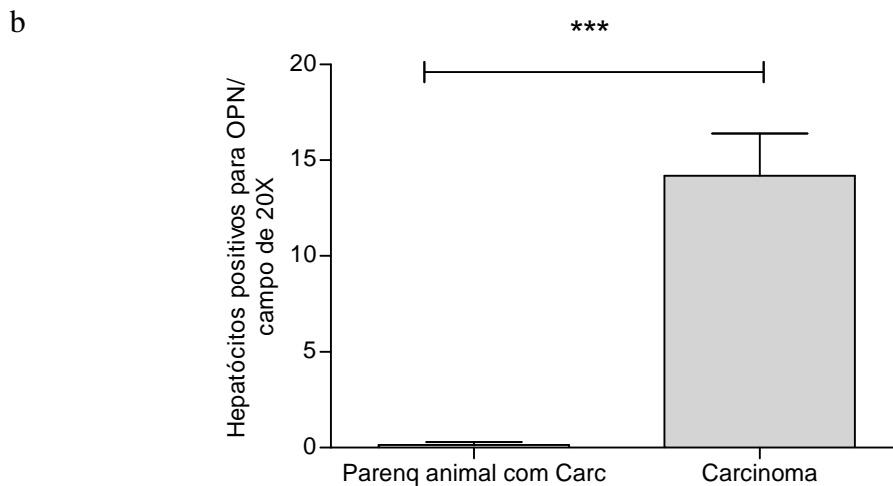


### 5.7.1.3 Osteopontina

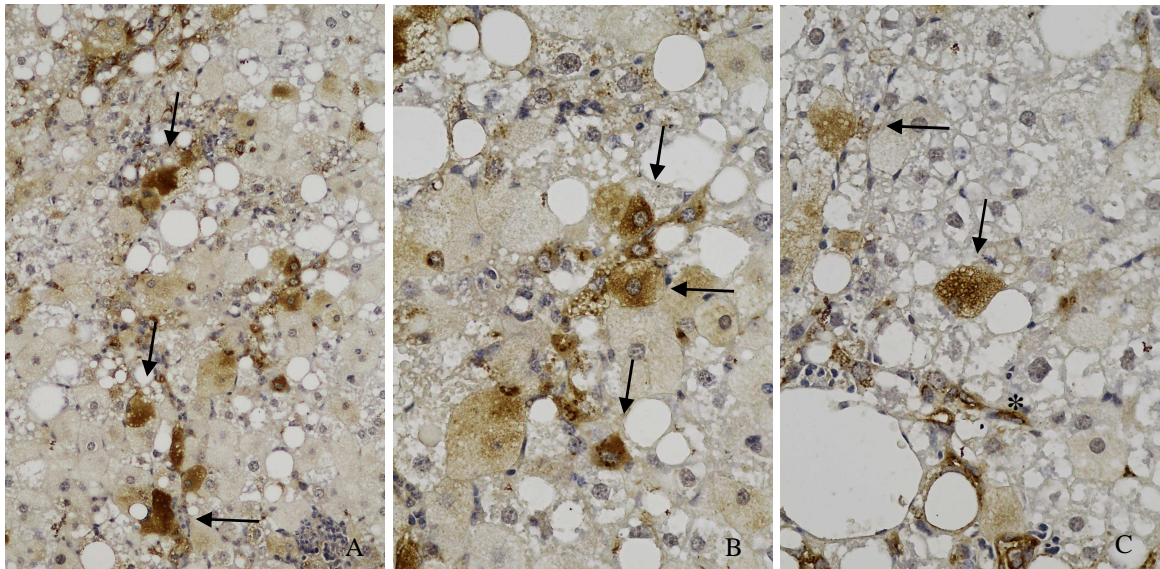
Os carcinomas hepatocelulares mostraram intensa marcação para OPN. Além da expressão de OPN em células estelares hepáticas, houve intensa marcação no citoplasma dos hepatócitos neoplásicos, incluindo hepatócitos balonizados (Figura 27). A avaliação semi-quantitativa por imuno-histoquímica da expressão de OPN mostrou maior expressão de OPN nos CHC, quando comparado com as células dos animais controle. A média de células positivas para OPN no grupo controle foi  $2,33 \pm 0,94$  e nos CHC foi  $14,20 \pm 2,19$ . Comparando-se a expressão de OPN entre os hepatócitos malignos e os hepatócitos do parênquima não neoplásico dos animais que desenvolveram carcinoma, não houve positividade para OPN nos hepatócitos dos animais obesos sem carcinoma. A média de hepatócitos malignos positivos para OPN foi  $14,20 \pm 2,19$ . (Figura 25). No parênquima dos animais obesos não houve marcação de OPN em hepatócitos.

a





c

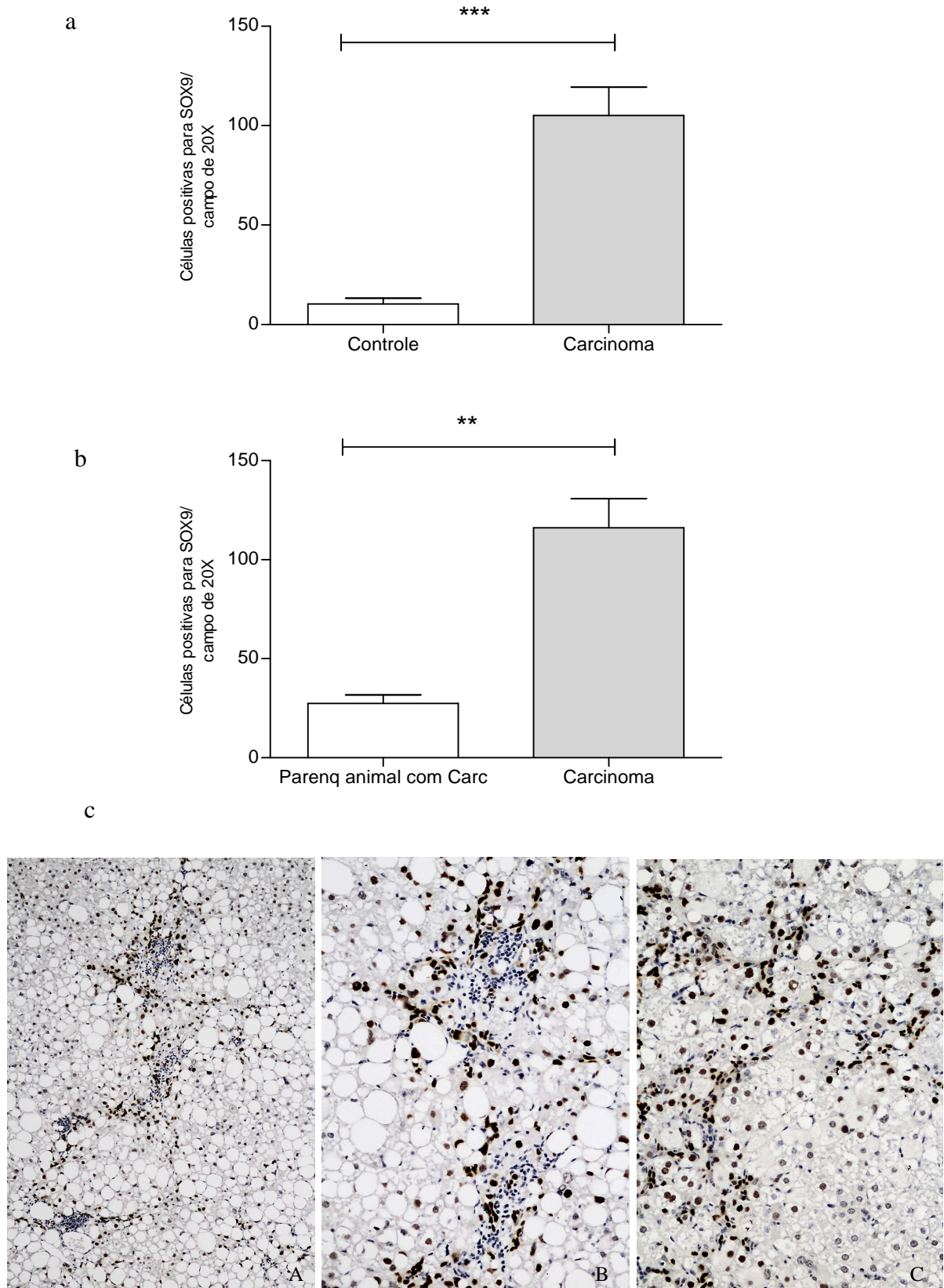


**Figura27.** Avaliação por imuno-histoquímica de expressão de OPN. a. Avaliação semi-quantitativa da expressão de OPN controle x CHC. Teste  $t^{***}p=0,0002$ . b. Avaliação semi-quantitativa da expressão de OPN hepatócitos malignos x hepatócitos em parênquima não neoplásicos de animais obesos com CHC. Teste  $t^{***}p=0,0006$ . c. Marcação positiva para OPN em células com morfologia de células estelares (\*) e intensa e marcação no citoplasma dos hepatócitos neoplásicos balonizados (setas). (A, 100X e B,C 200X).

#### 5.7.1.4. SOX-9

Os carcinomas hepatocelulares mostram intensa marcação para SOX-9. A expressão ocorreu em núcleo de células com escasso citoplasma e com morfologia de célula oval (Figura 28). A avaliação semi-quantitativa por imuno-histoquímica da expressão de SOX-9 mostrou maior expressão de SOX-9 nos CHC, quando comparado com os animais controle. A média de células positivas para SOX-9 no grupo controle foi  $10,33 \pm 3,01$  e nos

CHC foi  $105,1 \pm 14,33$ . Comparando-se a expressão de SOX-9 entre os CHC e o parênquima não neoplásico dos animais que desenvolveram carcinoma, houve maior expressão de SOX-9 nos CHC. A média de células positivas para SOX-9 no parênquima não neoplásico dos animais com carcinoma foi  $27,4 \pm 4,42$  e nos carcinomas foi  $116 \pm 14,76$ . (Figura 28).



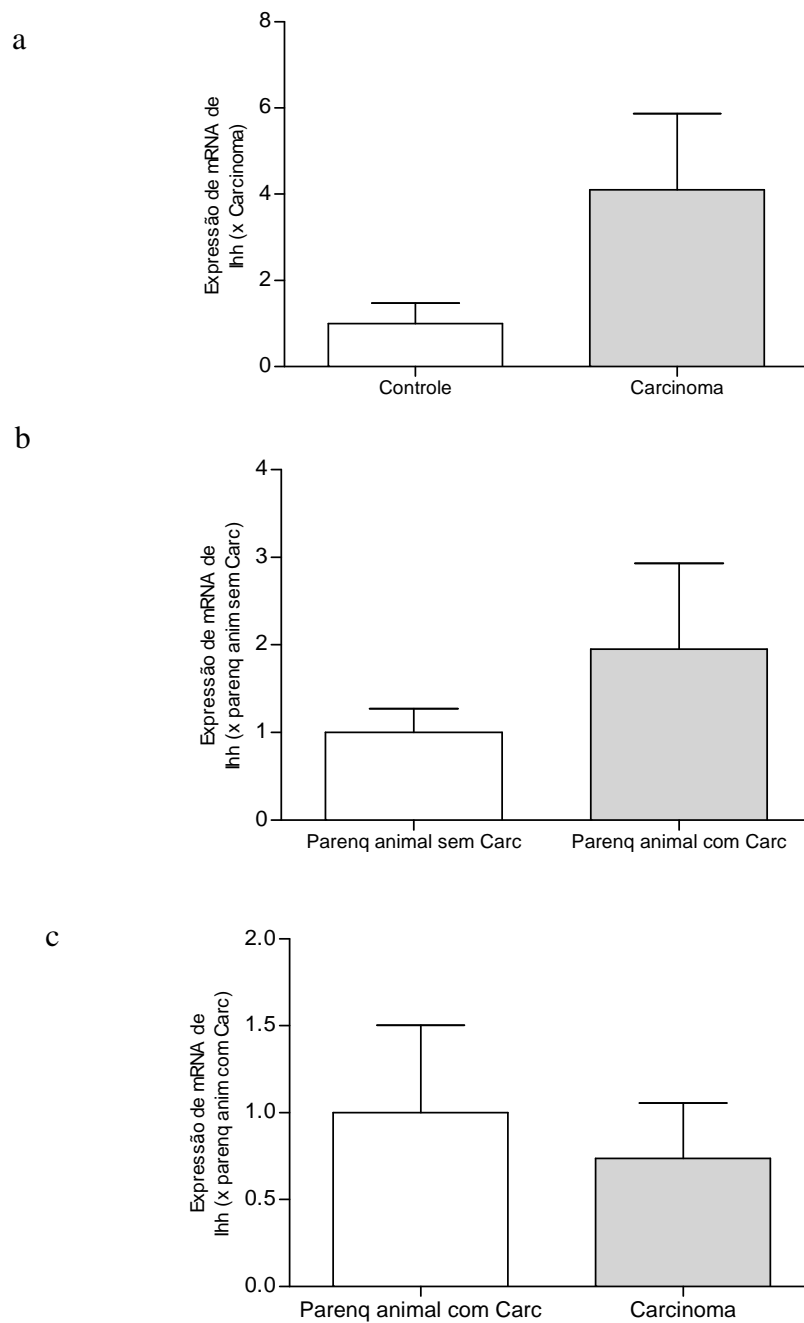
**Figura 28.** Avaliação por imuno-histoquímica de expressão de SOX-9. a. Avaliação semi-quantitativa da expressão de SOX-9 controle x CHC. Teste  $t$  \*\*\* $p < 0,0001$ . b. Avaliação semi-quantitativa da expressão de SOX-9 parênquima não neoplásicos de animais obesos x CHC. Teste  $t$  \*\*\* $p = 0,0015$ . c. Marcação positiva em células ovais, com escasso citoplasma. (A, 100X e B,C 200X).

### 5.7.2 Avaliação da expressão gênica da via Hedgehog nos carcinomas hepatocelulares

A quantificação relativa da expressão de RNA mensageiro dos componentes da via Hh nos carcinomas hepatocelulares foi feita de três formas: a) comparou-se a expressão de RNA mensageiro dos componentes da via Hh entre os carcinomas e o parênquima dos animais do grupo controle; b) comparou-se a expressão de RNA mensageiro dos componentes da via Hh entre o parênquima hepático dos animais obesos que não desenvolveram carcinoma e o parênquima hepático não neoplásico dos animais que desenvolveram carcinoma; c) comparou-se a expressão de RNA mensageiro dos componentes da via Hh entre os carcinomas e o parênquima dos animais obesos que desenvolveram carcinoma. Dessa forma, foi possível avaliar se no parênquima dos animais que desenvolveram neoplasia a via Hh estava mais ativada do que no parênquima dos animais que não desenvolveram carcinoma.

#### 5.7.2.1. *Indian Hedgehog*

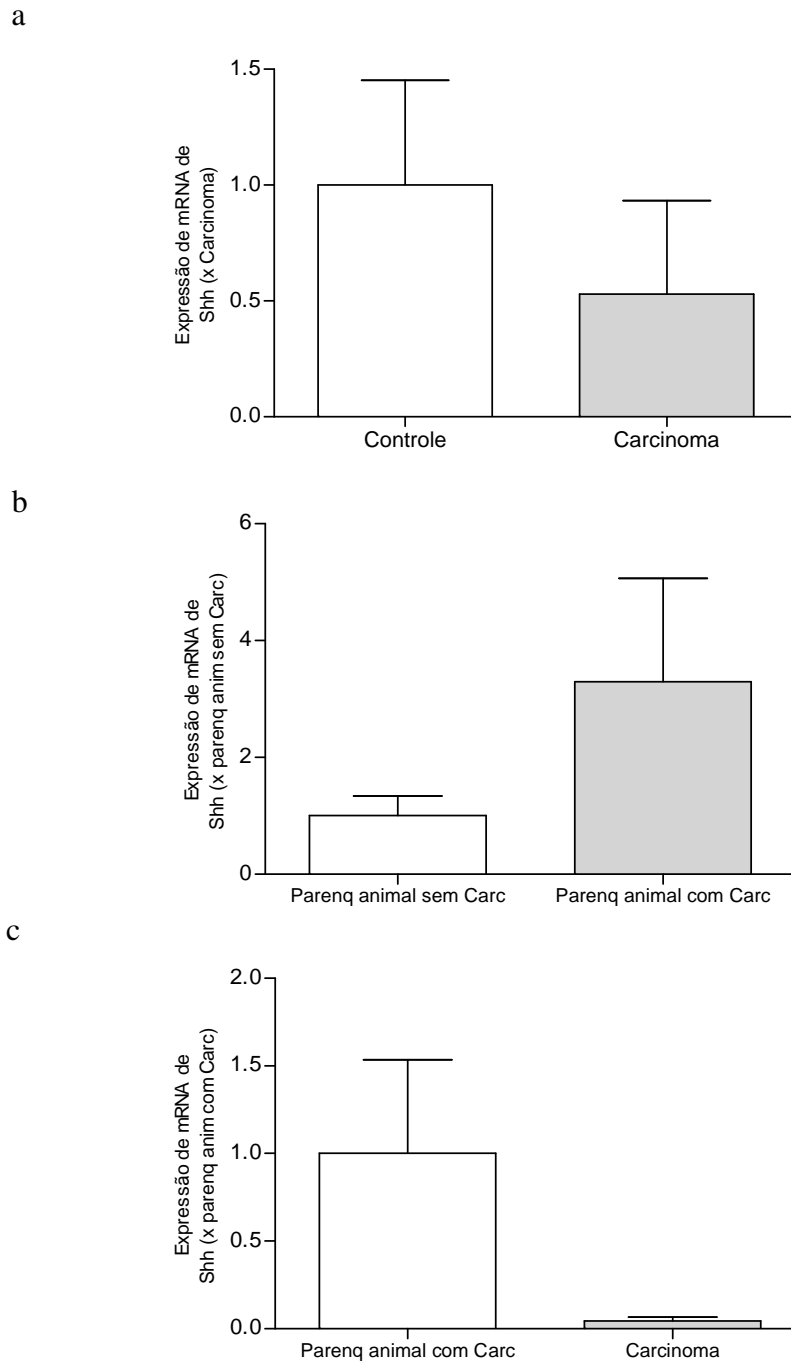
A quantificação relativa da expressão de Indian Hedgehog nos carcinomas hepatocelulares mostrou expressão de RNA mensageiro de *ihh* 4,1 vezes maior nas neoplasias em relação ao parênquima hepático dos animais do grupo controle (Figura 29a). Comparando a expressão de *ihh* entre o parênquima hepático de camundongos obesos que não desenvolveram carcinoma e o parênquima não neoplásico dos animais que desenvolveram carcinoma, houve expressão 1,95 vezes maior no parênquima não neoplásico dos animais que desenvolveram carcinoma (Figura 29b). Comparando-se a expressão de *ihh* entre o carcinoma e o parênquima não neoplásico dos animais que desenvolveram carcinoma, houve expressão apenas 0,73 vezes menor nos carcinomas em relação ao parênquima não neoplásico dos animais que desenvolveram carcinoma. (Figura 29c).



**Figura 29. Quantificação relativa da expressão de RNA mensageiro de Ihh.** a. Carcinomas em relação ao grupo controle; *teste t*,  $p= 0,072$ . b. Parênquima não neoplásico dos animais que desenvolveram carcinoma em relação ao parênquima dos animais obesos que não desenvolveram carcinoma; *teste t*,  $p= 0,35$ . c. Carcinomas em relação ao parênquima não neoplásico dos camundongos que desenvolveram carcinoma. *teste t*,  $p= 0,88$ .

### 5.7.2.2 *Sonic Hedgehog*

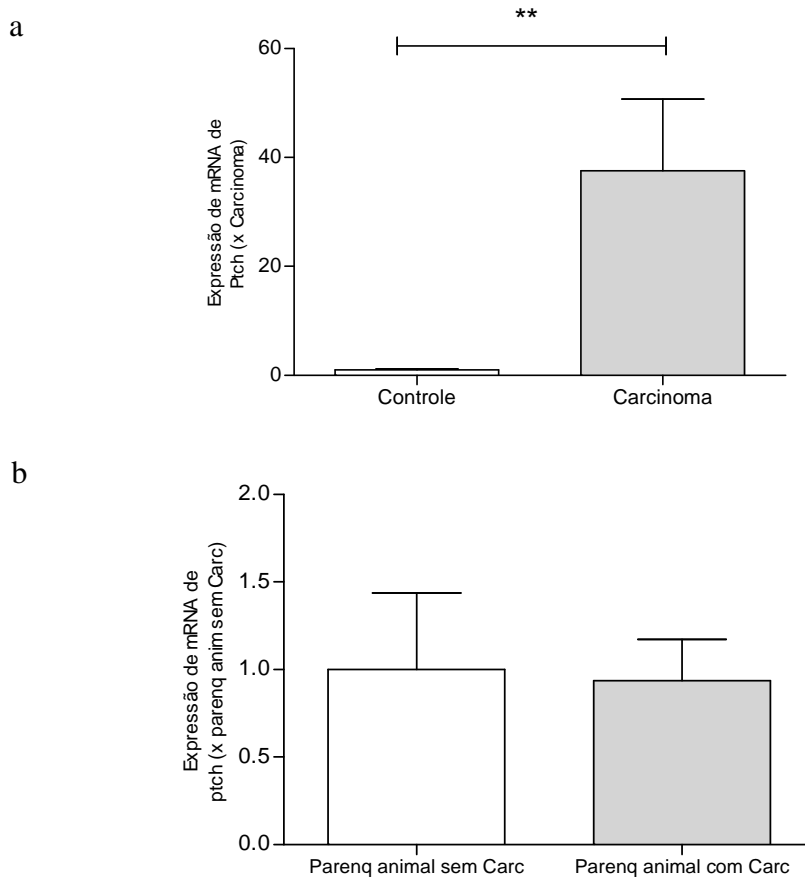
A quantificação relativa da expressão de Sonic Hedgehog nos carcinomas hepatocelulares mostrou expressão de RNA mensageiro de shh apenas 0,5 vezes menor nas neoplasias em comparação ao parênquima hepático dos animais do grupo controle (Figura 30a). Comparando a expressão de shh entre o parênquima hepático de camundongos obesos que não desenvolveram carcinoma e o parênquima não neoplásico dos animais que desenvolveram carcinoma, houve expressão 3,29 vezes maior no parênquima não neoplásico dos animais que desenvolveram carcinoma (Figura 30b). Comparando-se a expressão de ihh entre os carcinomas e o parênquima não neoplásico dos animais que desenvolveram carcinoma, houve expressão apenas 0,18 vezes menor nos carcinomas em comparação com o parênquima não neoplásico dos animais que desenvolveram carcinoma (Figura 30c).



**Figura 30.** Quantificação relativa da expressão de RNA mensageiro de Shh. a. Carcinomas em relação ao grupo controle; *teste t*,  $p= 0,68$ . b. Parênquima não neoplásico dos animais que desenvolveram carcinoma em relação ao parênquima dos animais obesos que não desenvolveram carcinoma; *teste t*,  $p= 0,60$ . c. Carcinomas em relação ao parênquima não neoplásico dos camundongos que desenvolveram carcinoma. *teste t*,  $p= 0,20$ .

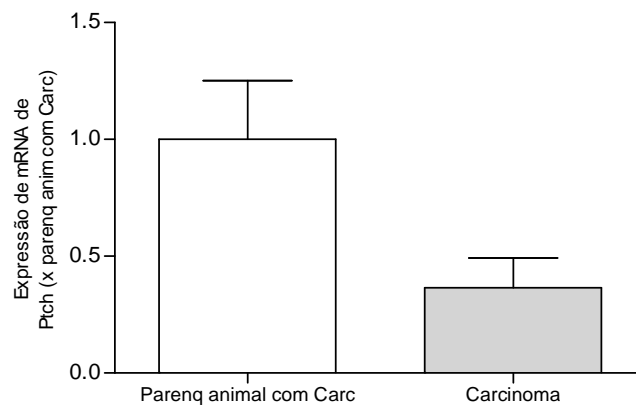
### 5.7.2.3. *Patched*

A quantificação relativa da expressão de *Ptc* nos carcinomas hepatocelulares mostrou expressão de RNA mensageiro de *ptc* 37,59 vezes maior nas neoplasias em relação ao parênquima hepático dos animais do grupo controle (Figura 31a). Comparando a expressão de *ptc* entre o parênquima hepático de camundongos obesos que não desenvolveram carcinoma e o parênquima não neoplásico dos animais que desenvolveram carcinoma, a expressão de *ptc* foi apenas 0,9 vezes maior no parênquima não neoplásico dos animais que desenvolveram carcinoma (Figura 31b). Comparando-se a expressão de *ptc* entre os carcinomas e o parênquima não neoplásico dos animais que desenvolveram carcinoma, houve expressão apenas 0,05 vezes menor nos carcinomas em relação ao parênquima não neoplásico dos animais que desenvolveram carcinoma (Figura 31c).





c

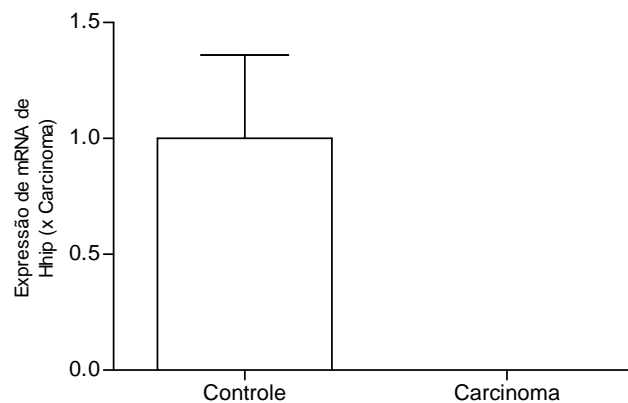


**Figura 31.** Quantificação relativa da expressão de RNA mensageiro de Ptc. a. Carcinomas em relação ao grupo controle; *teste t*,  $**p= 0,004$ . b. Parênquima não neoplásico dos animais que desenvolveram carcinoma em relação ao parênquima dos animais obesos que não desenvolveram carcinoma; *teste t*,  $p= 0,35$ . c. Carcinomas em relação ao parênquima não neoplásico dos camundongos que desenvolveram carcinoma. *teste t*,  $p= 0,11$ .

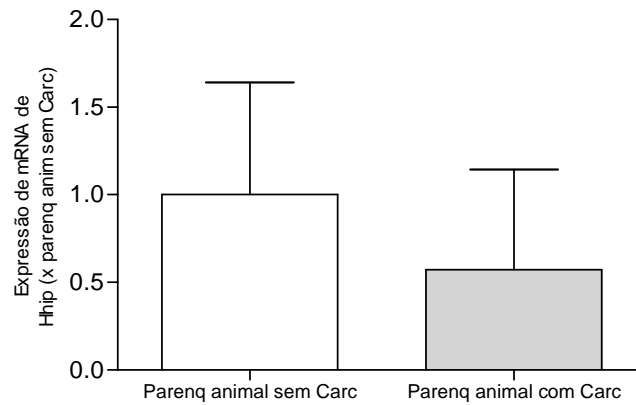
#### 5.7.2.4 Hhip

A quantificação relativa da expressão de hhip não mostrou expressão nos carcinomas hepatocelulares. (Figuras 32a e 32c). Comparando a expressão de hhip entre o parênquima hepático de camundongos obesos que não desenvolveram carcinoma e o parênquima não neoplásico dos animais que desenvolveram carcinoma, a expressão de hhip foi apenas 0,57 vezes menor no parênquima não neoplásico dos animais que desenvolveram carcinoma. (Figura 32b).

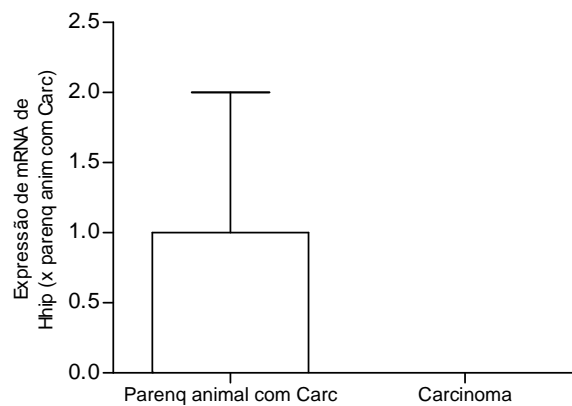
a



b



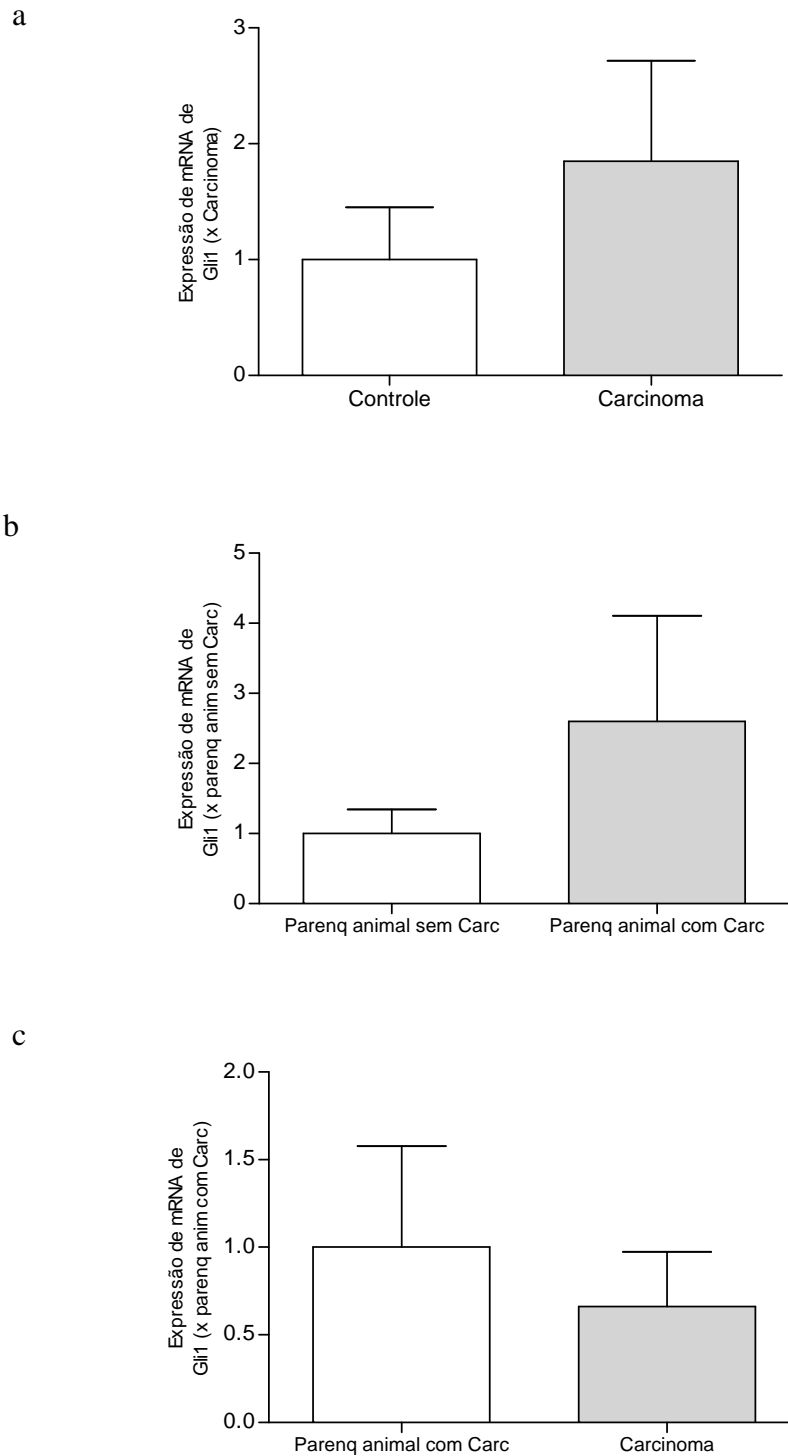
c



**Figura 32. Quantificação relativa da expressão de RNA mensageiro de hhip.** a,c. Os carcinomas não mostram expressão de hhip. b. Parênquima não neoplásico dos animais que desenvolveram carcinoma em relação ao parênquima dos animais obesos que não desenvolveram carcinoma; *teste t*,  $p=0,69$ .

#### 5.7.2.5. *Gli1*

A quantificação relativa da expressão de *Gli1* nos carcinomas hepatocelulares mostrou expressão de RNA mensageiro de *Gli1* 1,84 vezes maior nas neoplasias em relação ao parênquima hepático dos animais do grupo controle (Figura 33a). Comparando a expressão de *Gli1* entre o parênquima hepático de camundongos obesos que não desenvolveram carcinoma e o parênquima não neoplásico dos animais que desenvolveram carcinoma, houve expressão 2,6 vezes maior no parênquima não neoplásico dos animais que desenvolveram carcinoma (Figura 32b). Comparando-se a expressão de *Gli1* entre o carcinoma e o parênquima não neoplásico dos animais que desenvolveram carcinoma, houve expressão apenas 0,66 vezes menor de *Gli1* nos carcinomas em relação ao parênquima não neoplásico dos animais que desenvolveram carcinoma. (Figura 33c).

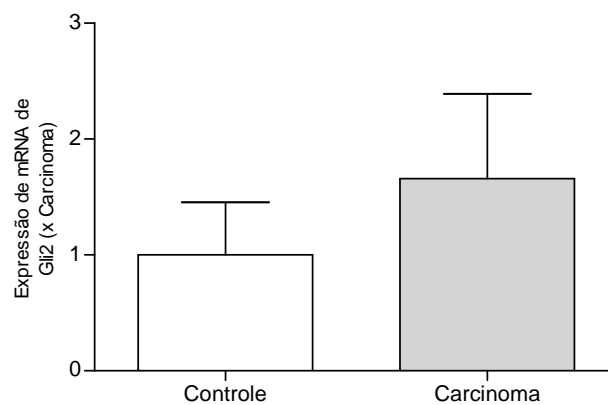


**Figura 33. Quantificação relativa da expressão de RNA mensageiro de Gli1.** a. Carcinomas em relação ao grupo controle; *teste t*,  $p= 0,36$ . b. Parênquima não neoplásico dos animais que desenvolveram carcinoma em relação ao parênquima dos animais obesos que não desenvolveram carcinoma; *teste t*,  $p= 0,76$ . c. Carcinomas em relação ao parênquima não neoplásico dos camundongos que desenvolveram carcinoma. *teste t*,  $p= 0,88$ .

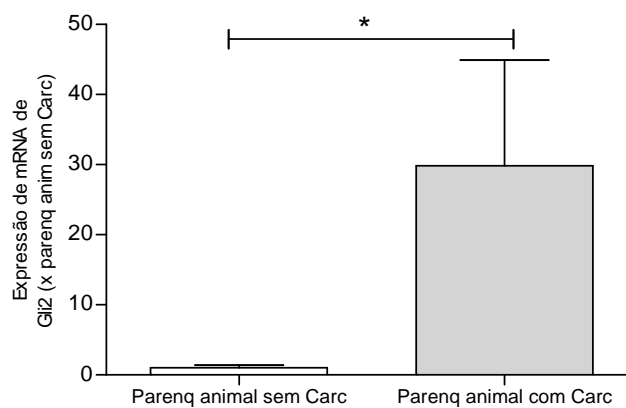
### 5.7.2.6 *Gli2*

A quantificação relativa da expressão de *Gli2* nos carcinomas hepatocelulares mostrou expressão de RNA mensageiro de *Gli2* 1,65 vezes maior nas neoplasias em relação ao parênquima hepático dos animais do grupo controle (Figura 34a). Comparando a expressão de *Gli2* entre o parênquima hepático de camundongos obesos que não desenvolveram carcinoma e o parênquima não neoplásico dos animais que desenvolveram carcinoma, houve expressão 29,83 vezes maior no parênquima não neoplásico dos animais que desenvolveram carcinoma (Figura 34b). Comparando-se a expressão de *Gli2* entre os carcinomas e o parênquima não neoplásico dos animais que desenvolveram carcinoma, houve expressão apenas 0,06 vezes menor nos carcinomas em relação ao parênquima não neoplásico dos animais que desenvolveram carcinoma. (Figura 34c).

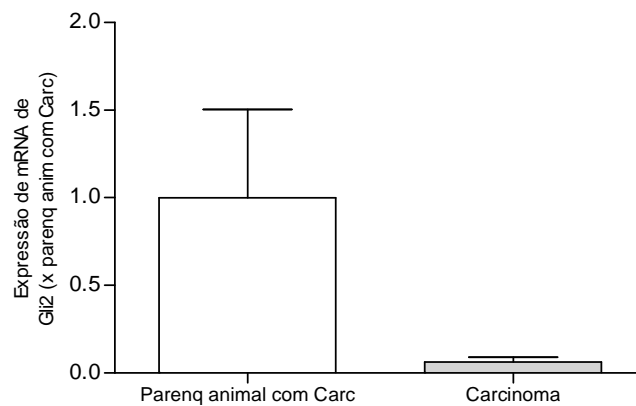
a



b



c

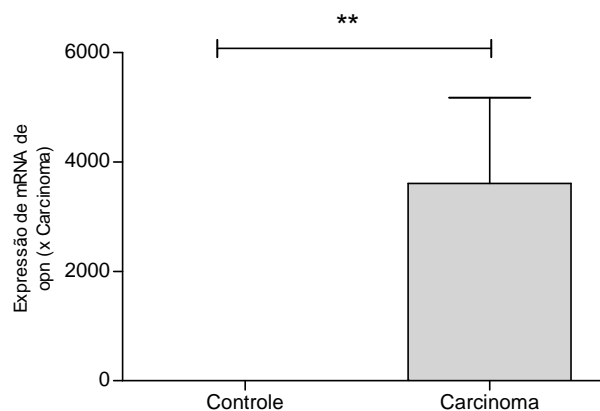


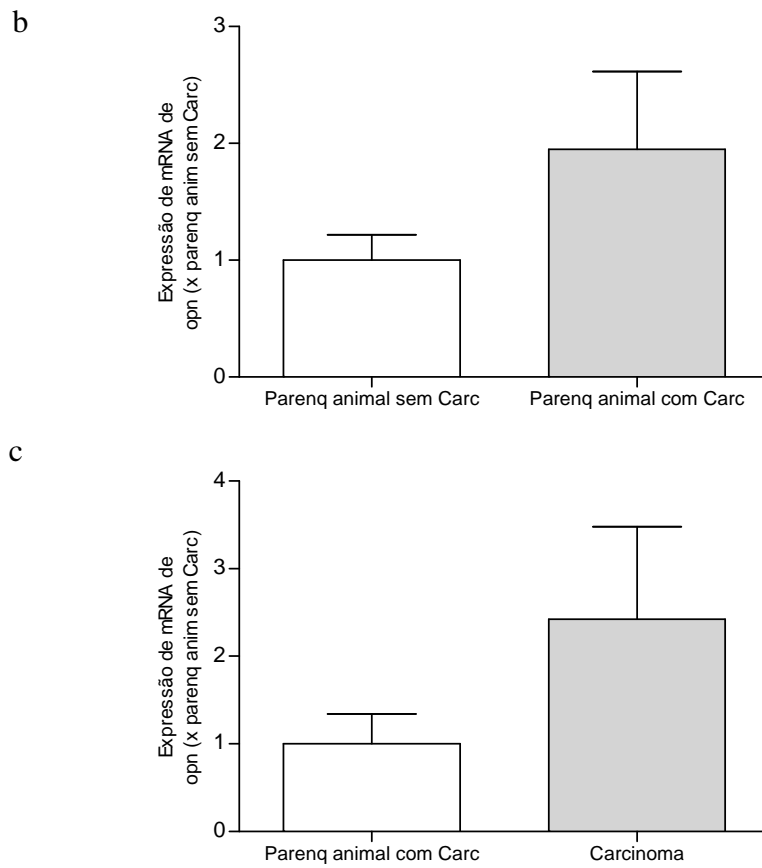
**Figura 34.** Quantificação relativa da expressão de RNA mensageiro de Gli2. a. a. Carcinomas em relação ao grupo controle; *teste t*,  $p = 0,52$ . b. Parênquima não neoplásico dos animais que desenvolveram carcinoma em relação ao parênquima dos animais obesos que não desenvolveram carcinoma; *teste t*,  $p = 0,047$ . c. Carcinomas em relação ao parênquima não neoplásico dos camundongos que desenvolveram carcinoma. *teste t*,  $p = 0,11$ .

#### 5.7.2.7 Osteopontina

A quantificação relativa da expressão de OPN nos carcinomas hepatocelulares mostrou expressão de RNA mensageiro de OPN 3606 vezes maior nas neoplasias em relação ao parênquima hepático dos animais do grupo controle (Figura 35a). Comparando a expressão de OPN entre o parênquima hepático de camundongos obesos que não desenvolveram carcinoma e o parênquima não neoplásico dos animais que desenvolveram carcinoma, houve expressão 1,94 vezes maior no parênquima não neoplásico dos animais que desenvolveram carcinoma (Figura 35b). Comparando-se a expressão de OPN entre o carcinoma e o parênquima não neoplásico dos animais que desenvolveram carcinoma, houve expressão maior de OPN nos carcinomas em relação ao parênquima não neoplásico dos animais que desenvolveram carcinoma. (Figura 35c).

a





**Figura 35.** Quantificação relativa da expressão de RNA mensageiro de opn. a. Carcinomas em relação ao grupo controle; *teste t*,  $p= 0,004$ . b. Parênquima não neoplásico dos animais que desenvolveram carcinoma em relação ao parênquima dos animais obesos que não desenvolveram carcinoma; *teste t*,  $p= 0,25$ . c. Carcinomas em relação ao parênquima não neoplásico dos camundongos que desenvolveram carcinoma. *teste t*,  $p =0,34$ .

## 6 DISCUSSÃO

O presente estudo mostrou a reprodução de modelo de DHGNA induzida por dieta em camundongos (SOUZA, 2010). Os animais reproduziram aspectos da DHGNA de humanos, com ganho de peso, desenvolvimento de diabetes e elevação dos níveis séricos de colesterol. Do ponto de vista bioquímico, mostraram níveis séricos elevados de ALT e AST, indicando lesão hepatocelular, o que foi confirmado ao exame anatomopatológico. Os fígados desses animais apresentaram esteatose, balonização hepatocelular, inflamação lobular e fibrose peri-sinusoidal, muito semelhante morfológicamente ao observado em pacientes com EHNA. Uma parte desses animais desenvolveu espontaneamente carcinoma hepatocelular, sem cirrose, com aspectos de carcinoma hepatocelular variante esteato-hepatítica, descrito em pacientes com DHGNA.

O modelo de indução de EHNA, anteriormente, desenvolvido no Instituto Gonçalo Moniz (SOUZA, 2010) (PALMA, 2012) mostraram aspectos da DHGNA reproduzidos no presente estudo. A investigação de vias moleculares relacionadas à patogênese da EHNA, como a via Hedgehog e a ocorrência de carcinoma hepatocelular espontâneo contribuem para a caracterização do modelo e adicionam um aspecto a mais na semelhança entre o modelo e a doença humana: a carcinogênese espontânea.

Foi demonstrada a ativação da via Hedgehog no parênquima hepático dos camundongos com EHNA. A avaliação da expressão de proteínas por imuno-histoquímica mostrou maior expressão de *Ihh*, *Gli2* e *OPN* nos fígados dos animais com EHNA. O ligante da via, o *Ihh*, foi demonstrado em hepatócitos balonizados, células estelares hepáticas, macrófagos e linfócitos. O *Gli2* foi demonstrado em hepatócitos e células ductulares, e a *OPN* foi demonstrada em células estelares e células ductulares, confirmando dados da literatura, quanto às células produtoras de ligantes (*Ihh*), responsivas à ativação da via (*Gli2*) e que expressam *OPN*. A presença de maior número de células *SOX-9* positivas, indicando maior número de células progenitoras nos animais com EHNA no modelo de estudo, também corroboram dados da literatura que indicam a participação dessas células no processo de reparo e regeneração hepáticas em EHNA (RANGWALA *et al.*, 2011) (OCHOA *et al.*, 2010).

O modelo aqui apresentado tem como vantagem reproduzir a DHGNA em camundongos de forma muito semelhante à doença humana. A forma de indução de ganho de peso é lenta e com uma dieta rica em carboidrato e gordura. O ganho de peso em humanos também ocorre de forma gradual. O tipo de dieta implicado na obesidade em humanos é também rica em carboidrato e gordura, muito parecida com a dieta relacionada a obesidade no

Ocidente. Estudos anteriores já haviam demonstrado a ativação da via Hedgehog em EHNA em modelos de DHGNA em camundongos geneticamente modificados e com dieta deficiente em metionina e colina (SYN *et al.*, 2011) e há evidências cada vez mais consistentes que ocorre ativação dessa via em DHGNA em humanos e da sua participação na patogênese da doença (GUY *et al.*, 2012).

Não há terapias medicamentosas aprovadas ou eficazes para tratamento de pacientes com EHNA. Os tratamentos baseiam-se em mudança do estilo de vida, como perda de peso, mudança de dieta, prática de exercícios físicos e controle da glicemia, medidas com baixa aderência pelos pacientes em geral. O conhecimento das vias moleculares implicadas na lesão hepática nessa doença é fundamental para o desenvolvimento de terapias alvo. Há um inibidor da via Hedgehog já aprovado para uso em pacientes com carcinoma basocelular, o *Vismodegib* (ZHENG *et al.*, 2013). O melhor entendimento da participação da via Hedgehog na patogênese da EHNA pode levar ao emprego de medicamentos já disponíveis (inibidores da via) ou mesmo o desenvolvimento de novas drogas.

A via Hedgehog vem sendo estudada na patogênese de diversas doenças hepáticas, como doença alcoólica do fígado, hepatite viral e autoimune, cirrose biliar primária e colangite esclerosante primária (OMENETTI e DIEHL, 2008; HUANG *et al.*, 2009). Em um estudo longitudinal (GUY *et al.*, 2012) foram obtidas amostras de biópsia hepática de pacientes com DHGNA, que mostrou existir correlação entre a expressão do ligante Shh por imuno-histoquímica e do fator de transcrição da via, Gli2 e a intensidade de balonização hepatocelular, intensidade de inflamação portal e estadiamento de fibrose, sugerindo haver uma correlação entre atividade da doença e ativação da via. No mesmo estudo, mostrou-se também existir correlação entre expressão de Shh e Gli2 com idade avançada, obesidade e resistência periférica à insulina/diabetes, fatores relacionados com síndrome metabólica e associados a estádios avançados de fibrose em DHGNA. Os autores sugeriram que a via Hh desregulada poderia mediar a lesão hepática nessa doença.

Previamente, alguns autores haviam demonstrado a participação da via Hh na patogênese de DHGNA em alguns modelos de camundongos, todos utilizando animais geneticamente modificados e/ou modelos de indução de DHGNA em camundongos com dieta deficiente em metionina e colina. Um estudo (FLEIG *et al.*, 2007) mostrou pela primeira vez a expressão aumentada de Ihh em camundongos *ob/ob* com DHGNA. Com o uso de metionina, para indução de lesão hepatocelular adicional à DHGNA, os camundongos *ob/ob* apresentaram maior ativação da via Hh do que camundongos controle, com expansão das células progenitoras hepáticas e expressão de Gli2 em hepatócitos maduros. Os autores



sugeriram participação da via Hh na transição epitélio mesênquima e como indutora de fibrogênese hepática.

Outro estudo (SYN *et al.*, 2009) utilizando camundongos deficientes em Ptc ( $Ptc^{+/-}$ ), receptor de membrana da via e que atua como supressor, em um modelo de indução de DHGNA por dieta deficiente de metionina e colina, foi mostrada ativação da via Hh e correlação entre estágio de fibrose e ativação da via. Os camundongos  $Ptc^{+/-}$  mostraram mais fibrose do que os camundongos controle, sugerindo participação da via Hh na fibrogênese hepática em DHGNA. Os animais  $Ptc^{+/-}$  mostraram maior expressão de genes relacionados à transição epitélio mesênquima, como  $tgf\beta$ , actina de músculo liso,  $mmp9$  e  $timp1$ . O tratamento dos animais com *Ciclopamina*, uma droga repressora da via Hh, inibiu a produção de TGF- $\beta$  e a expressão de Gli2.

Chama atenção no modelo de DHGNA aqui estudado que ocorre uma alta expressão de osteopontina, cuja expressão já foi demonstrada em outros estudos. Osteopontina é uma citocina pró-inflamatória, que participa do processo de cicatrização em diversos órgãos. O gene da OPN é um gene alvo da sinalização Hh. Evidências mostram que a OPN é um mediador da fibrogênese em DHGNA. Camundongos C57BL/6 e camundongos  $Ptc^{+/-}$  com DHGNA induzida por dieta deficiente em metionina e colina expressam mais OPN que camundongos controle. Camundongos deficientes em OPN ( $OPN^{-/-}$ ) com DHGNA induzida por dieta deficiente em metionina e colina desenvolvem menos fibrose hepática do que camundongos controle (SYN *et al.*, 2011). Uma das críticas mais importantes a esse modelo de estudo bem conduzido com camundongos, que tem como objetivo demonstrar ativação da via Hh e participação da OPN em DHGNA, é o fato da dieta deficiente em metionina e colina não reproduzir uma doença fenotipicamente semelhante à doença humana (os animais não desenvolvem resistência periférica à insulina, nem obesidade). O presente estudo é a primeira demonstração da ativação de via Hh com participação de OPN em um modelo de DHGNA com doença fenotipicamente semelhante à doença humana.

Amostras de pacientes com DHGNA mostram expressão de OPN, que se correlaciona com estágio de fibrose (SYN *et al.*, 2012). Pacientes com EHNA e cirrose têm expressão hepática duas vezes maior de OPN do que fígados de pacientes com EHNA e fibrose inicial. Pacientes com cirrose por EHNA têm 10 vezes mais expressão proteica de OPN no fígado do que fígados controle. Células estelares hepáticas *in vitro* são ativadas por OPN e passam a expressar genes pró-fibrogênicos. Células estelares hepáticas quiescentes produzem OPN com ativação endógena da via Hh. Dessa forma, as células estelares, que são células

conhecidamente produtoras de colágeno no fígado, são ativadas por OPN por estímulos autócrinos e parácrinos.

Além de ter participação na fibrogênese em DHGNA, a OPN parece participar também nos mecanismos relacionados à inflamação nessa condição. Estudos mostraram que as células TNK são fonte de OPN em DHGNA em camundongos geneticamente modificados com DHGNA induzida por dieta deficiente em metionina e colina, além de serem produtoras de ligantes da via Hh (SYN *et al.*, 2012). OPN parece também estar envolvida na ativação de macrófagos na EHNA em camundongos geneticamente modificados com dieta deficiente em metionina e colina. Dados mostram que OPN produzida por hepatócitos em modelo de DHGNA em camundongos induzida por dieta atuam de forma parácrina levando à ativação de macrófagos (KWON *et al.*, 2016). Os macrófagos são células importantes na produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- $\alpha$  e IL-6, citocinas que participam na patogênese da EHNA.

Simplificadamente, dados sugerem que na patogênese EHNA, a morte de hepatócitos por apoptose leva ao acúmulo focal de células inflamatórias no parênquima, que produzem citocinas, que atraem mais células inflamatórias, ativam macrófagos e células estelares hepáticas. O TGF- $\beta$ , citocina produzida por macrófagos, ativa células estelares a produzir colágeno e também a liberar ligantes da via Hh. Há evidências que hepatócitos em apoptose também liberam ligantes da via Hh. As células estelares hepáticas são também responsivas aos ligantes Hh para produção de colágeno, principalmente sob estímulo de OPN, que é um produto da etapa final da ativação da via Hh. OPN também parece ser importante na migração de células estelares hepáticas. A sinalização Hh induz transição epitélio-mesênquima em células progenitoras, o que contribui para a regeneração e reparo hepático na EHNA. Características da sinalização Hh, como estimulação autócrina e parácrina parecem ser importantes no contexto de microambiente no lóbulo hepático e se correlacionam com aspectos morfológicos observados nas alterações anátomo-patológicas (inflamação focal no parênquima, fibrose peri-sinusoidal, o aspecto de necrose “lítica” de hepatócitos).

O modelo de DHGNA aqui apresentado pode ser utilizado na investigação do papel da ativação da via Hh e da OPN na patogênese da EHNA. O acompanhamento dos camundongos com eutanásia sequencial em períodos pré-determinados e coleta de material biológico para análise pode oferecer informações importantes quanto à sequência de alterações moleculares no fígado. Correlações com achados anátomo-patológicos e características clínicas podem ser identificadas e possibilitar identificação de biomarcadores de lesão hepática. O modelo também pode contribuir para maior exploração dos mecanismos relacionados à inflamação e

fibrose em EHNA que envolvem a sinalização Hh. Podem-se utilizar camundongos deficientes para OPN e avaliar comparativamente as alterações hepáticas. Estudos *ex-vivo* podem ser realizados, com bloqueio da OPN, avaliação de ativação das células estelares e de macrófagos.

A ocorrência de carcinoma hepatocelular do tipo esteato-hepatítico nos camundongos é também mais um aspecto semelhante do modelo aqui apresentado com a DHGNA em humanos. Tipicamente, CHC ocorre em pacientes com EHNA que evoluíram para cirrose. No entanto, em algumas séries de casos (STARLEY *et al.*, 2010), até 50% dos casos de CHC em pacientes com EHNA ocorreram em fígados não cirróticos. A maior parte dos pacientes com CHC e EHNA têm diabetes, obesidade ou outra manifestação da síndrome metabólica. Alexander e cols (ALEXANDER *et al.*, 2013) em uma coorte de pacientes com CHC sem cirrose, demonstraram uma associação entre a ocorrência de CHC e esteatose e esteato-hepatite no parênquima hepático não neoplásico. A esteatose mostrou uma associação com CHC variante esteato-hepatítica. O mesmo grupo mostrou ocorrência do CHC esteato-hepatítico em fígados de pacientes sem síndrome metabólica e sem esteatose no parênquima hepático não neoplásico (YEH *et al.*, 2015). Esses dados reforçam a possibilidade da variante esteato-hepatítica do CHC representar um subtipo especial de CHC, cuja carcinogênese e vias moleculares implicadas devem ser exploradas.

Um estudo prévio com camundongos C57BL/6 (HILL-BASKIN *et al.*, 2009) mostrou ocorrência de CHC espontâneo em um modelo de DHGNA induzido por dieta sem colina, mas sem exploração de vias moleculares específicas. No presente estudo, 4 de 10 animais do grupo obeso desenvolveram CHC espontaneamente, em fígados não cirróticos, com nódulos bem delimitados à macroscopia e com características de CHC esteato-hepatítico. O exame imuno-histoquímico com pesquisa de proteínas da via Hh mostrou positividade para o ligante Ihh nos hepatócitos malignos, com granulações grosseiras no citoplasma, além de positividade em células inflamatórias mononucleares e células estelares hepáticas. Houve também marcação positiva para o fator de transcrição Gli2 no núcleo dos hepatócitos malignos e intensa marcação para a proteína OPN no citoplasma dos hepatócitos malignos e em células estelares.

Componentes da via Hh frequentemente mostram mutações em diversos tipos de câncer. Uma hiperativação da via ocorre na Síndrome do Carcinoma Basocelular Nevoide (Síndrome de Gorlin). Nessa síndrome, há mutações no receptor de membrana *Patched* e hiperativação da via. Uma droga inibidora da via, que atua no co-receptor *Smoothed*, é aprovada para tratamento de pacientes com a Síndrome de Gorlin que cursam com carcinoma

basocelular recorrente, localmente avançado ou metastático desde 2012. Hiperativação da via também já foi demonstrada em meduloblastomas e rabdomyosarcomas. Já foi demonstrada participação da via Hh, com produção de ligantes e mutações de componentes da via em carcinomas do trato gastrointestinal, pulmonar, prostático, pancreático, em linfomas e plasmocitoma (ZHENG *et al.*, 2013).

A ativação da via Hh pode alterar numerosas propriedades celulares implicadas em carcinogênese: proliferação irrestrita, imortalidade celular, desregulação do metabolismo energético, inflamação, angiogênese, evasão do sistema imune, instabilidade genômica, evasão da supressão do crescimento, resistência à morte celular e ativação de mecanismos relacionados com invasão e metástase (HANNA e SHEVDE, 2016).

Alguns grupos já demonstraram ativação aberrante da via Hedgehog em amostras de CHC humanos (HUANG *et al.*, 2006), (CHENG *et al.*, 2009). Huang e *cols* mostraram, anteriormente, ativação aberrante da via Hh em carcinomas hepatocelulares. Em parte dos casos, também foi detectada expressão de Gli1 e Ptc no parênquima adjacente à neoplasia. Os autores sugeriram que a sinalização Hh pode ser um evento precoce na carcinogênese hepática (HUANG *et al.*, 2006). Cheng e *cols* mostraram hiperativação da via e associação entre ativação da via Hh e invasão venosa portal pela neoplasia. Os autores também mostraram que o uso de um inibidor da via diminui a proliferação, motilidade e migração de células de linhagem de CHC *in vitro*.

Estudo com camundongos (PHILIPS *et al.*, 2011), em modelo utilizando animais geneticamente modificados (camundongos Mdr2<sup>-/-</sup>) que desenvolvem CHC e fibrose mostrou também ativação da via Hh. O tratamento dos animais com um inibidor da via resultou em diminuição da fibrose e diminuição do volume tumoral e das metástases. A ativação da via Hh nos fígados dos animais precedeu a ocorrência de CHC.

Outro estudo com camundongos Mdr2<sup>-/-</sup> e com amostras de CHC humano de pacientes com DHGNA (CHAN *et al.*, 2012) mostrou que hepatócitos malignos produzem ligantes de Hh, que atuam de forma parácrina no parênquima hepático não neoplásico. No estudo em questão, foi demonstrado que a via Hh no estroma estimula a glicólise em miofibroblastos, produção de lactato, que é utilizado para a produção de ATP por hepatócitos malignos.

No presente estudo, foi demonstrada ativação da via Hh nos carcinomas hepatocelulares em relação ao parênquima hepático dos animais controle. Por imunohistoquímica detectou-se hiper-expressão de Ihh, Gli2 e OPN. Os hepatócitos malignos mostraram expressão de Ihh em forma de granulações grosseiras no citoplasma, confirmando dados da literatura que hepatócitos malignos podem produzir ligantes da via Hh (CHAN *et*

*al.*, 2012). A expressão de OPN nos carcinomas foi também maior que nos animais controle. Detectou-se a expressão de OPN nos hepatócitos malignos, incluindo hepatócitos malignos balonizados.

Em nosso estudo, a avaliação da expressão gênica nos carcinomas mostrou maior expressão de RNAm de *Ihh* em relação o controle. A expressão do receptor de membrana Patched foi, significativamente, maior nos carcinomas em relação aos controles e não foi detectada expressão da molécula inibitória *Hhip* nos carcinomas. A expressão de *Gli1* e *Gli2* também foi maior nos carcinomas, assim como a expressão de OPN, que foi expressivamente maior nos carcinomas, confirmando os dados da semi-quantificação por imuno-histoquímica.

A análise comparativa da expressão gênica entre o parênquima não neoplásico dos animais com carcinoma e o parênquima dos animais obesos sem carcinoma, mostrou maior expressão de *Ihh*, *Shh*, *Gli1*, *Gli2* e OPN no parênquima não neoplásico dos animais com carcinoma. Esses dados mostram que os animais com EHNA que desenvolvem carcinoma têm maior ativação da via Hh no parênquima do que os animais com EHNA que não desenvolveram carcinoma. Esses achados corroboram os dados da literatura que sugerem que a hiperativação da via é um evento precoce na carcinogênese hepática e que precede o surgimento do CHC (HUANG *et al.*, 2006), (PHILIPS *et al.*, 2011).

Comparando-se a expressão gênica dos componentes da via Hh entre os carcinomas e o parênquima não neoplásico dos animais que desenvolveram carcinoma, houve expressão semelhante de *Ihh*, *Shh*, *Ptc*, *Hhip*, *Gli1* e *Gli2* entre as duas regiões, enquanto que a expressão de OPN foi maior nos carcinomas. A análise da expressão de *Ihh* e de OPN por imuno-histoquímica mostrou expressão maior dessas duas proteínas nos carcinomas quando comparada à expressão em hepatócitos no parênquima adjacente. Apenas os hepatócitos malignos expressaram *Ihh* e OPN. Em outras neoplasias nas quais já foi demonstrada ativação da via Hh, sugere-se que há três tipos principais de eventos que levam à ativação aberrante da via: tipo I, ativação constitutiva independente de ligante (ocorre no carcinoma basocelular e no meduloblastomas) (KUDCHADKAR *et al.*, 2012), (WANG *et al.*, 2012); tipo II, sinalização dependente de ligante, que atua de forma autócrina (as células malignas produzem e respondem aos ligantes. Ocorre em câncer de pulmão, carcinoma do trato gastrointestinal e câncer de próstata) (CHUNG *et al.*, 2010; SAQUI-SALCES e MERCHANT, 2010) e tipo III, que envolve ativação da via dependente de ligante por estimulação parácrina (os ligantes produzidos pelas células malignas atuam no estroma peri-neoplásico - ocorre em câncer de pulmão; ou os ligantes produzidos pelas células estromais atuam na células células neoplásicas - ocorre nos plasmocitomas e linfomas) (DIERKS *et al.*, 2007; TIAN *et al.*,

2009). É possível que no presente modelo, a produção de ligantes da via Hh pelos hepatócitos malignos atue no parênquima hepático adjacente, contribuindo para a ativação aberrante da via no parênquima. Outra possibilidade é que a via Hh nesse modelo pode ser uma das vias implicadas na carcinogênese e que pode estar associada à ativação de outras vias, como a via Wnt/ $\beta$ -catenina ou Notch. *Crosstalk* entre vias moleculares envolvidas na carcinogênese hepática estão sendo investigadas e há evidências que ocorrem (GIAKOUSTIDIS *et al.*, 2015).

A osteopontina é uma proteína que vem sendo investigada como oncoproteína. Foi demonstrada em gliomas, atuando via receptor CD44 (PIETRAS *et al.*, 2014). Após ligação com o receptor, por meio de cinases (PI3K e MAP3K14) leva à ativação de fatores de transcrição, como NF- $\kappa$ B, AP-1 e Ets-1, que atuam induzindo crescimento neoplásico, angiogênese, metástases e inibição de apoptose em modelos de câncer colo-retal e câncer de mama (DAS *et al.*, 2003; RANGASWAMI *et al.*, 2004; WAI *et al.*, 2006).

Em pacientes com CHC, OPN está elevada no plasma e é um biomarcador, junto com alfafetoproteína para seguimento de pacientes com cirrose por VHB ou VHC. OPN tem boa sensibilidade em CHC negativo para AFP, indicando que OPN é um melhor marcador em CHC precoce. Hiperexpressão de OPN no plasma está associado a metástases intra-hepáticas, recorrência precoce e pior prognóstico em pacientes que foram submetidos à ressecção de CHC (WEN *et al.*, 2016).

A interação de OPN via CD44 aumenta a proliferação celular em CHC. A OPN possui três isoformas, A, B e C. A isoforma A está mais associada à proliferação celular. A OPN também age ativando vias que promovem invasão e metástase de CHC (via do HGF, *hepatocyte growth factor*), assim como progressão (c-Met). A OPN se liga à vimentina no CHC, inibindo sua degradação e favorecendo transição epitélio-mesênquima no CHC. Por outro lado, supressão de OPN leva a apoptose mediada por mitocôndria (aumento da expressão de BAX) e reduz metástase de CHC *in vivo* (WEN *et al.*, 2016).

Dados da literatura mostraram que OPN é um gene alvo da via Wnt/ $\beta$ -catenina (VIETOR *et al.*, 2005; KAWAI *et al.*, 2016). Em um estudo recente publicado na revista *Nature* (KAWAI *et al.*, 2016), foi demonstrado em linhagens de células de CHC, que SOX9 (sex determining region Y-box 9) é capaz de ativar via Wnt/ $\beta$ -catenina, levando à expressão de OPN. Os autores concluíram que SOX9 é um marcador de células progenitoras em CHC, que pode ser inferido pela expressão de OPN.

No modelo aqui apresentado, há maior expressão de OPN nos carcinomas em relação ao parênquima não neoplásico dos animais que desenvolveram neoplasia. A expressão de células progenitoras SOX9 positivas foi maior nos carcinomas quando comparadas aos controles e ao parênquima não neoplásico dos animais que desenvolveram neoplasia, mostrando um perfil de células progenitoras nos CHC espontâneos no presente modelo. Os outros marcadores da via Hh mostram expressão semelhante nos carcinomas e no parênquima não neoplásico. Em conjunto com dados recentes da literatura, é racional sugerir que outra via pode estar atuando na expressão de OPN. O modelo de EHNA induzido por dieta pode ser útil na investigação da interação entre vias carcinogênicas em CHC. Os dados na literatura sobre OPN e CHC incluíram casuística de CHC em pacientes infectados por VHB ou VHC. Pouco ou nenhum dado há sobre o papel da OPN especificamente em CHC relacionado a fígado gordo.

## 7 CONCLUSÃO

O modelo de indução de doença hepática gordurosa não alcoólica com dieta hipercalórica em camundongos aqui apresentado levou a desenvolvimento de obesidade, hipercolesterolemia, diabetes e elevação de enzimas hepáticas nos animais, reproduzindo o modelo de DHGNA desenvolvido no IGM (SOUZA, 2010). Todos os animais do grupo obeso apresentaram esteato-hepatite, com mais inflamação e mais fibrose no parênquima hepático. Quarenta por cento dos animais obesos desenvolveram carcinoma hepatocelular espontâneo do tipo esteato-hepatítico, sem cirrose.

Detectou-se ativação da via Hedgehog nos fígados dos animais obesos, com intensa produção de osteopontina. Não houve ativação da via nos animais controle. O parênquima não neoplásico dos animais que desenvolveram carcinoma mostrou maior ativação da via Hedgehog do que o parênquima dos animais obesos sem carcinoma, indicando hiperativação da via nos fígados dos animais com carcinomas.

Os carcinomas mostram ativação de via Hedgehog, com intensa produção de osteopontina e produção de ligantes da via (Indian Hedgehog) por hepatócitos malignos. Não houve maior ativação da via nos carcinomas do que no parênquima não neoplásico dos animais com neoplasia, o que levanta a possibilidade da via Hedgehog ser um caminho carcinogénico inicial no modelo, com possível interação com outras vias, como a via *Notch* ou do WNT/ $\beta$ -catenina, que podem ser investigadas.



## REFERÊNCIAS

- ALEXANDER, J. *et al.* Non-alcoholic fatty liver disease contributes to hepatocarcinogenesis in non-cirrhotic liver: a clinical and pathological study. **J. Gastroenterol. Hepatol.**, v. 28, n. 5, p. 848-854, 2013.
- ARAI, M. *et al.* Gene expression profiles in liver regeneration with oval cell induction. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 317, n. 2, p. 370-766, 2004.
- ARMSTRONG, M. J. *et al.* Extrahepatic complications of nonalcoholic fatty liver disease. **Hepatology**, v. 59, n. 3, p. 1174-1197, 2014.
- ATTAR, B. M.; VAN THIEL, D. H. Current concepts and management approaches in nonalcoholic fatty liver disease. **Scientif. World J.**, v. 2013, p. 481893, 2013.
- BEDOSSA, P. *et al.* Histopathological algorithm and scoring system for evaluation of liver lesions in morbidly obese patients. **Hepatology**, v. 56, n. 5, p.1751-1759, 2012.
- BREA, A.; J. PUZO. Non-alcoholic fatty liver disease and cardiovascular risk. **Int. J. Cardiol.**, v. 167, n.4, p. 1109-1117, 2013.
- BROWNING, J. D. *et al.* Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. **Hepatology**, v. 40, n. 6, p. 1387-1395, 2004.
- BRUNT, E. M. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Pros and Cons of Histologic Systems of Evaluation. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 17, n. 1, 2016.
- BRUNT, E. M. *et al.* Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) activity score and the histopathologic diagnosis in NAFLD: distinct clinicopathologic meanings. **Hepatology**, v. 53, n. 3, p. 810-920, 2011.
- CALDWELL, S. H. *et al.* Cryptogenic cirrhosis: clinical characterization and risk factors for underlying disease. **Hepatology**, v. 29, n. 3, p. 664-649, 1999.
- CHAN, I. S. *et al.* Paracrine Hedgehog signaling drives metabolic changes in hepatocellular carcinoma. **Cancer Res.**, v. 72, n. 24, p. 6344-63450, 2012.
- CHENG, W. T. *et al.* Role of Hedgehog signaling pathway in proliferation and invasiveness of hepatocellular carcinoma cells. **Int. J. Oncol.**, v. 34, n. 3, p. 829-836, 2009.
- CHUNG, M. K. *et al.* Hedgehog signaling regulates proliferation of prostate cancer cells via stathmin1. **Clin. Exp. Med.**, v. 10, n. 1, p. 51-57, 2010.
- CLARK, J. M. *et al.* Nonalcoholic fatty liver disease. **Gastroenterology**, v. 122, n. 6, p. 1649-1657, 2002.
- COOMBES, J. D. *et al.* Osteopontin neutralisation abrogates the liver progenitor cell response and fibrogenesis in mice. **Gut**, v. 64, n. 7, p. 1120-1131, 2015.

COTRIM, H. P.; CARRILHO, F. J. Nonalcoholic steatohepatitis and hepatocellular carcinoma: Brazilian survey. **Clinics**, v. 71, n. 5, p. 281-284, 2016.

DAS, R. *et al.* Osteopontin stimulates cell motility and nuclear factor kappaB-mediated secretion of urokinase type plasminogen activator through phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathways in breast cancer cells. **J. Biol. Chem.**, v. 278, n. 31, p. 28593-28606, 2003.

DAVILA, J. A. *et al.* Diabetes increases the risk of hepatocellular carcinoma in the United States: a population based case control study. **Gut**, v. 54, n. 4, p. 533-539, 2005.

DAY, C. P.; JAMES, O. F. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? **Gastroenterology**, v. 114, n. 4, p. 842-845, 1998.

DE WIT, N. J. *et al.* Phenotyping the effect of diet on non-alcoholic fatty liver disease. **J. Hepatol.**, v. 57, n. 6, p. 1370-1373, 2012.

DIERKS, C. *et al.* Essential role of stromally induced hedgehog signaling in B-cell malignancies. **Nat. Med.**, v. 13, n. 8, p. 944-951, 2007.

EKSTEDT, M. *et al.* Long-term follow-up of patients with NAFLD and elevated liver enzymes. **Hepatology**, v. 44, n. 4, p. 865-873, 2006.

FLEIG, S. V. *et al.* Hepatic accumulation of Hedgehog-reactive progenitors increases with severity of fatty liver damage in mice. **Lab. Invest.**, v. 87, n. 12, p. 1227-1239, 2007.

FOSTER, T. *et al.* The prevalence and clinical correlates of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) in African Americans: the multiethnic study of atherosclerosis (MESA). **Dig. Dis. Sci.**, v. 58, n. 8, p. 2392-2398, 2013.

GIAKOUSTIDIS, A. *et al.* Molecular signalling in hepatocellular carcinoma: Role of and crosstalk among WNT/ss-catenin, Sonic Hedgehog, Notch and Dickkopf-1. **Can. J. Gastroenterol. Hepatol.**, v. 29, n. 4, p. 209-217, 2015.

GUY, C. D. *et al.* Hedgehog pathway activation parallels histologic severity of injury and fibrosis in human nonalcoholic fatty liver disease. **Hepatology**, v. 55, n. 6, p. 1711-1721, 2012.

HANNA, A.; SHEVDE, L. A. Hedgehog signaling: modulation of cancer properties and tumor microenvironment. **Mol. Cancer**, v. 15, p. 24, 2016.

HILL-BASKIN, A. *et al.* Diet-induced hepatocellular carcinoma in genetically predisposed mice. **Hum. Mol. Genet.**, v. 18, n. 16, p. 2975-2988, 2009.

HUANG, S. *et al.* Activation of the hedgehog pathway in human hepatocellular carcinomas. **Carcinogenesis**, v. 27, n. 7, p. 1334-1340, 2006.

HUANG, W. *et al.* Plasma osteopontin concentration correlates with the severity of hepatic fibrosis and inflammation in HCV-infected subjects. **Clin. Chim. Acta**, v. 411, n. 9-10, p. 675-678, 2009.

- IQBAL, J. *et al.* Mechanism of hepatitis C virus (HCV)-induced osteopontin and its role in epithelial to mesenchymal transition of hepatocytes. **J. Biol. Chem.**, v. 288, n. 52, p. 36994-37009, 2013.
- IQBAL, J. *et al.* Role of hepatitis C virus induced osteopontin in epithelial to mesenchymal transition, migration and invasion of hepatocytes. **PLoS One**, v. 9, n. 1, p. e87464. 2014.
- KARNIKOWSKI, M. *et al.* Non-alcoholic fatty liver disease and metabolic syndrome in Brazilian middle-aged and older adults. **Sao Paulo Med. J.**, v. 125, n. 6, p. 333-337, 2007.
- KAWAI, T. *et al.* SOX9 is a novel cancer stem cell marker surrogated by osteopontin in human hepatocellular carcinoma. **Sci. Rep.**, v. 6, p. 30489, 2016.
- KIEFER, F. W. *et al.* Osteopontin deficiency protects against obesity-induced hepatic steatosis and attenuates glucose production in mice. **Diabetologia**, v. 54, n. 8, p. 2132-2142, 2011.
- KIM, J. *et al.* Elevated plasma osteopontin levels in patients with hepatocellular carcinoma. **Am. J. Gastroenterol.**, v. 101, n. 9, p. 2051-2059, 2006.
- KIRPICH, I. A. *et al.* Gut-liver axis, nutrition, and non-alcoholic fatty liver disease. **Clin. Biochem.**, v. 48, n. 13-14, p. 923-930, 2015.
- KIRPICH, I. A. *et al.* Microbiome in NAFLD and ALD. **Clin. Liver Dis.**, v. 6, n. 3, p. 55-58, 2015.
- KLEINER, D. E. *et al.* Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. **Hepatology**, v. 41, n. 6, p. 1313-1321, 2005.
- KUDCHADKAR, R. *et al.* Advances in the treatment of Basal cell carcinoma: Hedgehog inhibitors. **Semin. Oncol.**, v. 39, n. 2, p. 139-144, 2012.
- KWON, H. *et al.* Inhibition of hedgehog signaling ameliorates hepatic inflammation in mice with nonalcoholic fatty liver disease. **Hepatology**, v. 63, n. 4, p. 1155-1169, 2016.
- LE ROY, T. *et al.* Intestinal microbiota determines development of non-alcoholic fatty liver disease in mice. **Gut**, v. 62, n. 12, p. 1787-1794, 2013.
- LIANG, K. H.; YEH, C. T. OPN sesame. **Hepatobiliary Surg. Nutr.**, v. 3, n. 3, p. 112-114, 2014.
- LUDWIG, J. *et al.* Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. **Mayo Clin. Proc.**, v. 55, n. 7, p. 434-438, 1980.
- MARENCO, A. *et al.* Progression and Natural History of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Adults. **Clin. Liver Dis.**, v. 20, n. 2, p. 313-324, 2016.
- MATTEONI, L.; COTRIM, L. H. Nonalcoholic Fatty Hepatic Disease: Relavance of the Diagnosis on Abdominal Ultrasound. **Gaz. Méd. Bahia**, v. 81, n. 1, p. 7-9, 2011.

MCPHERSON, S. *et al.* Evidence of NAFLD progression from steatosis to fibrosing-steatohepatitis using paired biopsies: implications for prognosis and clinical management. **J. Hepatol.**, v. 62, n. 5, p. 1148-1155, 2015.

MUNUKKA, E. *et al.* Gut-adipose tissue axis in hepatic fat accumulation in humans. **J. Hepatol.**, v. 61, n. 1, p. 132-138, 2014.

NAKAMURA, A.; TERAUCHI, Y. Lessons from mouse models of high-fat diet-induced NAFLD. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 14, n. 11, p. 21240-21257, 2013.

OCHOA, B. *et al.* Hedgehog signaling is critical for normal liver regeneration after partial hepatectomy in mice. **Hepatology**, v. 51, n. 5, p. 1712-1723, 2010.

OMENETTI, A. *et al.* Hedgehog signaling in the liver. **J. Hepatol.**, v. 54, n. 2, p. 366-373, 2011.

OMENETTI, A.; DIEHL, A. M. The adventures of sonic hedgehog in development and repair. II. Sonic hedgehog and liver development, inflammation, and cancer. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, v. 294, n. 3, p. G595-G598, 2008.

ONI, E. T. *et al.* Relation of physical activity to prevalence of nonalcoholic Fatty liver disease independent of cardiometabolic risk. **Am. J. Cardiol.**, v. 115, n. 1, p. 34-39, 2015.

PALMA, L. C. **Doença esteatótica não alcoólica do fígado: comparação das alterações histológicas hepáticas entre modelo murino e pacientes obesos** Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da Bahia. Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2012.

PAN, H. W. *et al.* Overexpression of osteopontin is associated with intrahepatic metastasis, early recurrence, and poorer prognosis of surgically resected hepatocellular carcinoma. **Cancer**, v. 98, n. 1, p. 119-127, 2003.

PATOURAUX, S. *et al.* The osteopontin level in liver, adipose tissue and serum is correlated with fibrosis in patients with alcoholic liver disease. **PLoS One**, v. 7, n. 4, p. e35612, 2012.

PATOURAUX, S. *et al.* Osteopontin deficiency aggravates hepatic injury induced by ischemia-reperfusion in mice. **Cell Death Dis.**, v. 5, p. e1208, 2014.

PHILIPS, G. M. *et al.* Hedgehog signaling antagonist promotes regression of both liver fibrosis and hepatocellular carcinoma in a murine model of primary liver cancer. **PLoS One**, v. 6, n. 9, p. e23943, 2011.

PHILLIPS, R. J. *et al.* Osteopontin increases hepatocellular carcinoma cell growth in a CD44 dependant manner. **World J. Gastroenterol.**, v. 18, n. 26, p. 3389-3399, 2012.

PIETRAS, A. *et al.* Osteopontin-CD44 signaling in the glioma perivascular niche enhances cancer stem cell phenotypes and promotes aggressive tumor growth. **Cell Stem Cell**, v. 14, n. 3, p. 357-369, 2014.

RANGASWAMI, H. *et al.* Nuclear factor-inducing kinase plays a crucial role in osteopontin-induced MAPK/IkappaBalpha kinase-dependent nuclear factor kappaB-mediated promatrix metalloproteinase-9 activation. **J. Biol. Chem.**, v. 279, n. 37, p. 38921-38935, 2004.

RANGWALA, F. *et al.* Increased production of sonic hedgehog by ballooned hepatocytes. **J. Pathol.**, v. 224, n. 3, p. 401-410, 2011.

REGIMBEAU, J. M. *et al.* Obesity and diabetes as a risk factor for hepatocellular carcinoma. **Liver Transpl.**, v. 10, n. 2 Suppl 1, p. S69-S73, 2004.

ROTMAN, Y. *et al.* The association of genetic variability in patatin-like phospholipase domain-containing protein 3 (PNPLA3) with histological severity of nonalcoholic fatty liver disease. **Hepatology**, v. 52, n. 3, p. 894-903, 2010.

SALOMAO, M. *et al.* The steatohepatic variant of hepatocellular carcinoma and its association with underlying steatohepatitis. **Hum. Pathol.**, v. 43, n. 5, p. 737-746, 2011.

SAQUI-SALCES, M.; MERCHANT, E J. L. Hedgehog signaling and gastrointestinal cancer. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1803, n. 7, p. 786-795, 2010.

SAYINER, M. *et al.* Epidemiology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis in the United States and the Rest of the World. **Clin. Liver Dis.**, v. 20, n. 2, p. 205-214, 2016.

SCHATTENBERG, J. M.; GALLE, P. R. Animal models of non-alcoholic steatohepatitis: of mice and man. **Dig. Dis.**, v. 28, n. 1, p. 247-254, 2010.

SHANG, S. *et al.* Identification of osteopontin as a novel marker for early hepatocellular carcinoma. **Hepatology**, v. 55, n. 2, p. 483-490, 2012.

SINGH, S. *et al.* Fibrosis progression in nonalcoholic fatty liver vs nonalcoholic steatohepatitis: a systematic review and meta-analysis of paired-biopsy studies. **Clin. Gastroenterol. Hepatol.**, v. 13, n. 4, p. 643-654, 2015.

SODERBERG, C. *et al.* Decreased survival of subjects with elevated liver function tests during a 28-year follow-up. **Hepatology**, v. 51, n. 2, p. 595-602, 2010.

SOUZA, S. C. **Avaliação dos efeitos de terapias com células de medula óssea em modelo experimental de diabetes mellitus Tipo 2.** Tese (Doutorado)- Universidade Federal da Bahia. Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2010.

SPRUSS, A. *et al.* Toll-like receptor 4 is involved in the development of fructose-induced hepatic steatosis in mice. **Hepatology**, v. 50, n. 4, p. 1094-1104, 2009.

STARLEY, B. Q. *et al.* Nonalcoholic fatty liver disease and hepatocellular carcinoma: a weighty connection. **Hepatology**, v. 51, n. 5, p. 1820-1832, 2010.

SYN, W. K. Repair-associated inflammation in nonalcoholic fatty liver disease. **Clin. Med.**, v. 13, Suppl 6, p. s 15-19, 2013.

- SYN, W. K. *et al.* NKT-associated hedgehog and osteopontin drive fibrogenesis in non-alcoholic fatty liver disease. **Gut**, v. 61, n. 9, p. 1323-1329, 2012.
- SYN, W. K. *et al.* Osteopontin is induced by hedgehog pathway activation and promotes fibrosis progression in nonalcoholic steatohepatitis. **Hepatology**, v. 53, n. 1, p. 106-115, 2011.
- SYN, W. K. *et al.* Hedgehog-mediated epithelial-to-mesenchymal transition and fibrogenic repair in nonalcoholic fatty liver disease. **Gastroenterology**, v. 137, n. 4, p. 1478-1488 e8, 2009.
- TAKAHASHI, Y. *et al.* Animal models of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. **World J. Gastroenterol.**, v. 18, n. 19, p. 2300-2308, 2012.
- THAN, N. N. E P. N. Newsome. A concise review of non-alcoholic fatty liver disease. **Atherosclerosis**, v. 239, n. 1, p.192-202, 2015.
- TIAN, H. *et al.* Hedgehog signaling is restricted to the stromal compartment during pancreatic carcinogenesis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 106, n. 11, p. 4254-4259, 2009.
- VERDELHO MACHADO, M.; DIEHL A. M. Role of Hedgehog Signaling Pathway in NASH. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 17, n. 6, 2016.
- VIETOR, I. *et al.* TIS7 regulation of the beta-catenin/Tcf-4 target gene osteopontin (OPN) is histone deacetylase-dependent. **J. Biol. Chem.**, v. 280, n. 48, p. 39795-39801, 2005.
- WAI, P. Y. *et al.* Ets-1 and runx2 regulate transcription of a metastatic gene, osteopontin, in murine colorectal cancer cells. **J. Biol. Chem.**, v. 281, n. 28, p. 18973-18982, 2006.
- WANG, X. *et al.* Sonic hedgehog regulates Bmi1 in human medulloblastoma brain tumor-initiating cells. **Oncogene**, v. 31, n. 2, p. 187-199, 2012.
- WANLESS, I. R.; LENTZ, J. S. Fatty liver hepatitis (steatohepatitis) and obesity: an autopsy study with analysis of risk factors. **Hepatology**, v. 12, n. 5, p. 1106-1110, 1990.
- WELZEL, T. M. *et al.* Metabolic syndrome increases the risk of primary liver cancer in the United States: a study in the SEER-Medicare database. **Hepatology**, v. 54, n. 2, p. 463-471, 2011.
- WEN, Y. *et al.* Role of Osteopontin in Liver Diseases. **Int. J. Biol. Sci.**, v. 12, n. 9, p. 1121-1128, 2016.
- WONG, V. W. *et al.* Molecular characterization of the fecal microbiota in patients with nonalcoholic steatohepatitis--a longitudinal study. **PLoS One**, v. 8, n. 4, p. e62885, 2013.
- XIE, H. *et al.* Prognostic significance of osteopontin in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. **Dig. Liver Dis.**, v. 39, n. 2, p. 167-172, 2007.
- YAMAMOTO, K. *et al.* Nonalcoholic steatohepatitis in donors for living donor liver transplantation. **Transplantation**, v. 83, n. 3, p. 257-262, 2007.

YEH, M. M. *et al.* Steatohepatic variant of hepatocellular carcinoma in the absence of metabolic syndrome or background steatosis: a clinical, pathological, and genetic study. **Hum. Pathol.**, v. 46, n. 11, p. 1769-1775, 2015.

YOUNOSSI, Z. M. *et al.* Pathologic criteria for nonalcoholic steatohepatitis: interprotocol agreement and ability to predict liver-related mortality. **Hepatology**, v. 53, n. 6, p. 1874-1882, 2011.

ZHAO, J. *et al.* Down-regulation of osteopontin suppresses growth and metastasis of hepatocellular carcinoma via induction of apoptosis. **Gastroenterology**, v. 135, n. 3, p. 956-968, 2008.

ZHENG, X. *et al.* Role of the Hedgehog pathway in hepatocellular carcinoma (review). **Oncol. Rep.**, v. 30, n. 5, p. 2020-2026, 2013.

ZHU, L. *et al.* Characterization of gut microbiomes in nonalcoholic steatohepatitis (NASH) patients: a connection between endogenous alcohol and NASH. **Hepatology**, v. 57, n. 2, p. 601-609, 2013.