

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO: CIÊNCIAS EM GASTROENTEROLOGIA E

HEPATOLOGIA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA RIFAXIMINA NA CARCINOGENESE HEPÁTICA  
EXPERIMENTAL SECUNDÁRIA À DOENÇA HEPÁTICA GORDUOSA NÃO  
ALCOÓLICA**

JÉSSICA TONIN FERRARI

PORTO ALEGRE

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO: CIÊNCIAS EM GASTROENTEROLOGIA E  
HEPATOLOGIA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA RIFAXIMINA NA CARCINOGENESE HEPÁTICA  
EXPERIMENTAL SECUNDÁRIA À DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO  
ALCOÓLICA**

JÉSSICA TONIN FERRARI

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação: Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia.

Orientadora: Dra. Carolina Uribe Cruz

PORTO ALEGRE

2018

### CIP - Catalogação na Publicação

Ferrari, Jéssica Tonin

Avaliação do efeito da rifaximina na carcinogênese hepática experimental secundária à doença hepática gordurosa não alcoólica / Jéssica Tonin Ferrari. -- 2018.

45 f.

Orientadora: Carolina Uribe Cruz.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia, Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. carcinoma hepatocelular. 2. doença hepática gordurosa não alcoólica. 3. rifaximina. 4. dieta hiperlipídica deficiente em colina. 5. dietilnitrosamina. I. Cruz, Carolina Uribe, orient. II. Título.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, Adriane e Jeremias, e meu irmão, Gabriel, por todo suporte e motivação. Obrigada por estarem sempre presentes!

À minha orientadora Dra. Carolina Uribe Cruz pela confiança, paciência e ajuda incondicional em cada momento dessa jornada. Todas as nossas conversas e seus ensinamentos foram fundamentais para meu crescimento profissional e científico. Meu imenso carinho e admiração!

Ao Dr. Mário Reis Álvares da Silva e a Dra. Themis Reverbel da Silveira por todos os ensinamentos transmitidos e pelos inúmeros esclarecimentos e sugestões para o desenvolvimento do estudo.

À Larisse Longo, pela disposição em auxiliar em todas as etapas do estudo, pelo convívio diário e parceria durante a execução dos experimentos.

Aos colegas de laboratório: Gabriel Guerreiro, Ana Carolina Henzel Raymundo, Silvia Bona, Carolina Beskow, Juliana Bruch e Michele Sefarini pelo companheirismo e momentos de descontração, cada um teve uma participação especial nesses anos de laboratório. Agradeço, em especial, a Amanda Pasqualotto, companheira de sempre, que tive o prazer compartilhar bons momentos, e a Raquel Ayres, por todas as conversas e conhecimentos que foram passados em minha iniciação da jornada científica.

Aos meus amigos, agradeço a paciência e compreensão pelos momentos em que não pude estar presente, mas principalmente por todo apoio.

Ao Programa de Pós-Graduação: Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e o Hospital de Clínicas de Porto Alegre

pela oportunidade de desenvolver este estudo. Agradeço também a CAPES e o FIPE/HCPA pelo financiamento desta pesquisa.

Agradeço a todos que, de alguma forma, contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional e que fizeram possível o projeto se tornar realidade.

RESUMO/PALAVRAS-CHAVE .....	6
ABSTRACT/KEYWORDS .....	8
LISTA DE ABREVIATURAS .....	10
LISTA DE FIGURAS .....	11
INTRODUÇÃO .....	13
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	14
Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica.....	14
Carcinoma hepatocelular .....	17
Modelos animais de carcinoma hepatocelular.....	22
Rifaximina .....	25
HIPÓTESE.....	31
OBJETIVO GERAL .....	32
Objetivos específicos .....	32
CONCLUSÕES.....	33
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	34
PERSPECTIVAS .....	36
REFERÊNCIAS .....	37
ANEXO.....	44
APÊNDICE .....	45

## RESUMO/PALAVRAS-CHAVE

**Introdução:** A doença hepática gordurosa não alcoólica, atualmente, é considerada a forma mais comum de hepatopatia crônica, tendo como complicação mais grave o carcinoma hepatocelular. Considerando que a rifaximina é um antibiótico efetivo como tratamento de diversas doenças gastrointestinais e hepáticas, este estudo tem como objetivo avaliar os efeitos da rifaximina em um modelo de carcinoma hepatocelular secundário à doença hepática gordurosa não alcoólica.

**Métodos:** Ratos Sprague-Dawley adultos foram divididos em 3 grupos. 1) grupo CHC: os animais foram alimentados com dieta hiperlipídica deficiente em colina e expostos a dietilnitrosamina (135mg/L) na água de beber; 2) grupo RIF+CHC: os animais receberam a mesma dieta e dietilnitrosamina, no entanto, na 5ª semana receberam 50mg/kg/dia de rifaximina por gavagem; 3) grupo Controle: os animais foram alimentados com dieta e água padrão. Após 16 semanas, os animais foram eutanasiados. Parâmetros bioquímicos séricos de Colesterol Total, HDL, LDL, Triglicerídeos, AST, ALT e Fosfatase Alcalina foram avaliados. O tecido hepático foi avaliado macroscopicamente e amostras foram coradas com Hematoxilina & Eosina e Picrosirius Red. As variáveis histológicas foram pontuadas usando o sistema modificado de Kleiner, *NAFLD activity score* e grau de fibrose. O carcinoma hepatocelular foi classificado de acordo com a graduação de *Edmondson-Steiner*.

**Resultados:** Os níveis séricos de colesterol total, LDL, AST e fosfatase alcalina foram menores no grupo CHC+RIF quando comparados ao grupo CHC, no entanto a diferença não foi estatisticamente significativa. O escore de *NAFLD activity score* ficou alocado entre 3 e 5 para o grupo CHC, no entanto, para o grupo CHC+RIF permaneceu em grau 3. O grau de câncer foi de 3 e 4 para os grupos CHC+RIF e

CHC, mas curiosamente em 3 animais tratados com Rifaximina não apresentaram câncer.

**Conclusão:** Estes resultados preliminares mostram que o tratamento com rifaximina parece ter um efeito moderadamente benéfico sobre o desenvolvimento da esteato-hepatite não alcoólica e do carcinoma hepatocelular.

Palavras chave: carcinoma hepatocelular, rifaximina, doença hepática gordurosa não alcoólica, dieta hiperlipídica deficiente em colina, dietilnitrosamina.

## **ABSTRACT/KEYWORDS**

**Introduction:** Non-alcoholic fatty liver disease is currently considered the most common form of chronic liver disease, with hepatocellular carcinoma being the most serious complication. Considering that rifaximin is a highly effective nonabsorbable antibiotic for the treatment of various gastrointestinal and hepatic diseases, this study aims to evaluate the effects of rifaximin in a model of hepatocellular carcinoma secondary to nonalcoholic fatty liver disease.

**Methods:** Adult Sprague-Dawley rats were divided into 3 groups. 1) HCC group: animals were fed a choline-deficient hyperlipid diet and exposed to diethylnitrosamine (135mg/L) in drinking water; 2) RIF+HCC group: animals received the same diet and diethylnitrosamine; however, at week 5, they received 50mg/kg/day of rifaximin by gavage; 3) Control group: the animals were fed standard diet and water. After 16 weeks, the animals were euthanized. Serum biochemical parameters of Total Cholesterol, HDL, LDL, Triglycerides, AST, ALT and Alkaline Phosphatase were evaluated. The liver tissue was macroscopically evaluated, and the samples were stained with Hematoxylin & Eosin and Picrosirius Red. Histological variables were scored using Kleiner's modified system, NAFLD activity score, and degree of fibrosis. Hepatocellular carcinoma was classified according to Edmondson-Steiner.

**Results:** The serum levels of total cholesterol, LDL, AST and alkaline phosphatase were lower in the CHC+RIF group when compared to the HCC group. The difference, however, was not statistically significant. The NAFLD activity score was allocated between 3 and 5 for the HCC group; however, for the CHC+RIF group, it remained in

grade 3. The degree of cancer was 3 and 4 for the CHC+RIF and HCC groups, but curiously, 3 animals treated with rifaximin did not present cancer.

**Conclusion:** These preliminary results show that treatment with rifaximin appears to have a moderately beneficial effect on the development of nonalcoholic steatohepatitis and hepatocellular carcinoma.

**Keywords:** Hepatocellular carcinoma, rifaximin, nonalcoholic fatty liver disease, choline-deficient hyperlipid diet, diethylnitrosamine

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

ALT - alanina aminotransferase

AST - aspartato aminotransferase

CHC - carcinoma hepatocelular

DHGNA - doença hepática gordurosa não alcoólica

DEN – dietilnitrosamina

DHDC - dieta hiperlipídica deficiente em colina

DM2 - diabetes mellitus tipo 2

EHNA - esteato-hepatite não alcoólica

ES - esteatose simples

GGT - gamaglutamiltransferase

HE – hematoxilina & eosina

NAS - NAFLD activity score

RIF - rifaximina

SM - síndrome metabólica

VHB - vírus da hepatite B

VHC - vírus da hepatite C

VLDL - lipoproteína de baixa densidade

## **LISTA DE FIGURAS**

Figura 1 - História natural da DHGNA .....	14
Figura 2 - Representação de uma biópsia hepática de EHNA .....	17
Figura 3 – Mecanismo de ação da Rifaximina .....	26

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação de <i>Edmondson-Steiner</i> .....	20
Tabela 2 - Tratamentos atuais para o CHC .....	21
Tabela 3 – Modelos animais de CHC secundário à DHGNA .....	24

## INTRODUÇÃO

A doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) representa um amplo espectro de alterações histológicas hepáticas, desde uma esteatose simples (ES) até uma esteato-hepatite não alcoólica (EHNA), fibrose avançada, cirrose e carcinoma hepatocelular (CHC)<sup>1</sup>.

Nos últimos anos o aumento na incidência de CHC tem sido atribuído ao aumento da obesidade, diabetes melitus tipo 2 (DM2) e DHGNA devido, principalmente, a mudança no estilo de vida hábitos alimentares da população<sup>2</sup>.

A rifaximina (RIF) é um antibiótico não absorvível altamente efetivo como tratamento de diversas doenças gastrointestinais e tem sido largamente estudada nas pesquisas biomédicas devido às diversas evidências de ter um papel benéfico em doenças hepáticas<sup>3; 4</sup>.

Com os avanços na nas pesquisas de novas terapias nas últimas décadas, o CHC passou a ser uma doença que pode ser prevenida e curada, quando detectado em etapas precoces da doença<sup>5</sup>. No entanto, como a sua incidência está aumentando em diversos países, novas pesquisas com medidas preventivas devem ser realizadas na tentativa de minimizar o impacto da doença<sup>6</sup>.

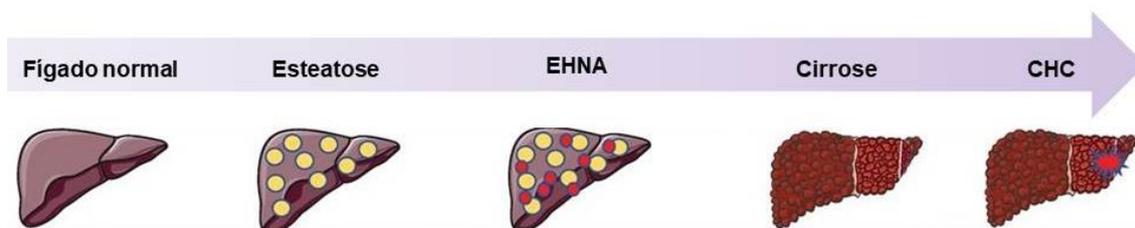
Com base nisso, o objetivo desse estudo foi avaliar o impacto da RIF sobre o fígado de murinos em um modelo de CHC secundário a DHGNA.

## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica

A DHGNA é considerada, atualmente, a forma mais comum de hepatopatia e é reconhecida como importante causa do aumento da morbimortalidade relacionada ao fígado<sup>7; 8</sup>. A principal característica histológica da DHGNA é o acúmulo de gordura no fígado, principalmente os triglicerídeos, sendo caracterizada histologicamente pela presença de mais de 5% de hepatócitos esteatóticos, na ausência de outras causas etiopatológicas e com consumo alcoólico inferior a 30g/dia em homens e 20g/dia em mulheres<sup>9</sup>.

O seu espectro constitui desde a ES com acúmulo de gordura nos hepatócitos, à EHNA, com componente necroinflamatório com ou sem fibrose, e cirrose, que pode evoluir para o CHC (Figura 1)<sup>10</sup>. A EHNA representa a forma inflamatória da doença, com um conjunto de achados histológicos como balonização hepatocelular, infiltrado inflamatório e fibrose perisinusoidal, sendo que pacientes com essa doença apresentam aumento da mortalidade relacionada ao fígado devido à progressão da doença para fibrose, a cirrose e o CHC<sup>11</sup>. Por ser uma doença de evolução lenta e que pode levar a insuficiência hepática, a EHNA tem se tornado alvo de diversos estudos no mundo todo<sup>12</sup>.



**Figura 1 - História natural da DHGNA.** A DHGNA se inicia com o desenvolvimento ES, podendo progredir para EHNA, ou até formas mais graves como cirrose e CHC. Adaptado de Maurice e Manousou, 2018<sup>1</sup>.

A DHGNA apresenta distribuição mundial com prevalência variada, dependendo da população estudada e do método diagnóstico empregado. Ocorre em indivíduos de todas as idades, entretanto é mais comum nos adultos e tende a aumentar com a idade<sup>9: 13</sup>. Atualmente, a prevalência de DHGNA é estimada em 20% a 30% nos países ocidentais e 5% a 18% em países asiáticos<sup>14</sup>. Uma recente metanálise mostrou que a prevalência da doença na população geral mundial é de 24-25%<sup>15</sup>, variando de 13 % na África, 23% na Europa e 32% no Oriente Médio<sup>2</sup>. Já a prevalência da EHNA a nível mundial foi estimada entre 2 e 3 %<sup>10</sup>. No Brasil há poucos dados sobre a prevalência da DHGNA na população geral. Em estudo brasileiro, utilizando a ultrassonografia como método diagnóstico, foi encontrada uma prevalência em torno de 20% de DHGNA na população geral<sup>16</sup>. Em outro estudo brasileiro realizado com 98 pacientes diabéticos, foi encontrada uma prevalência de 78% de EHNA<sup>17</sup>.

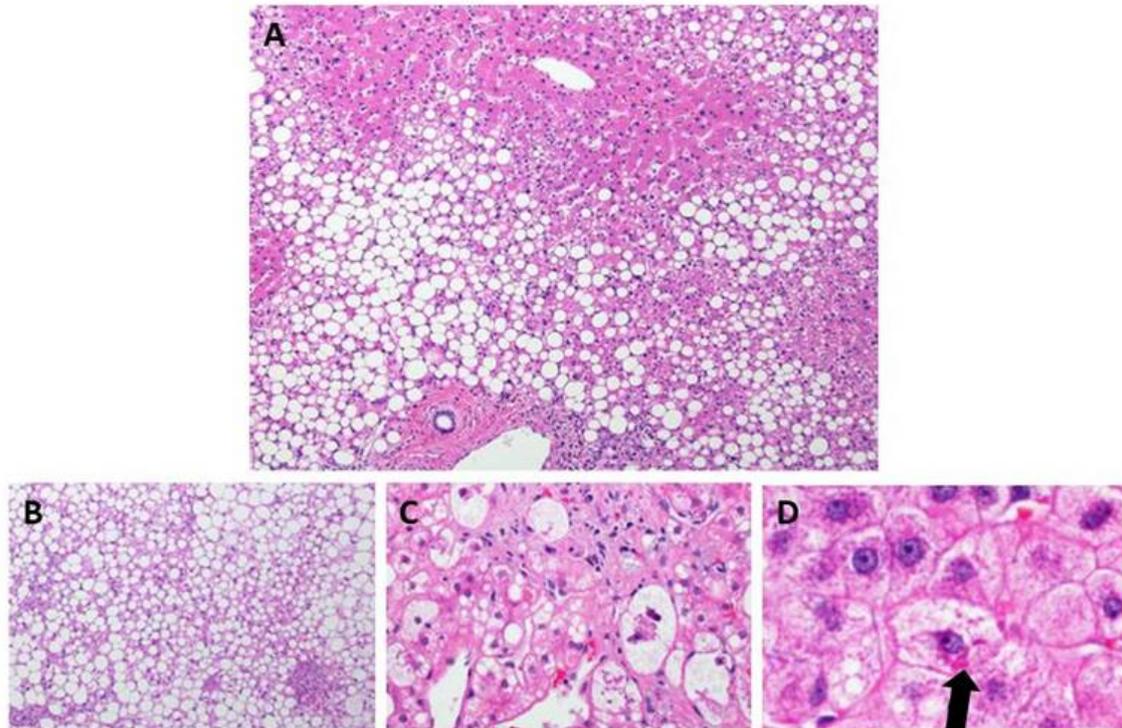
A DHGNA vem emergindo como uma das causas mais comuns de doença hepática crônica da última década, podendo se tornar, nos próximos anos, a principal causa de morbi-mortalidade relacionada ao fígado<sup>18</sup>. É uma das condições mais prevalentes relacionadas ao fígado devido ao aumento da prevalência de obesidade em todo o mundo, além da mudança do estilo de vida e da alimentação da população ocidental. Do ponto de vista etiológico a obesidade, resistência à insulina, DM2, dislipidemia e síndrome metabólica (SM) são as causas primárias para o desenvolvimento dessa doença<sup>19</sup>. Um estudo realizado com 308 pacientes mostrou que a presença de SM foi associada a um maior risco de desenvolvimento de EHNA e fibrose grave. Ainda nesse mesmo estudo, dos 163 casos de biópsia realizados, 120 pacientes foram classificados com EHNA, sendo 88% deles preenchiam critérios da SM, em comparação com 53% dos pacientes com DHGNA<sup>20</sup>. O surgimento

secundário da DHGNA inclui outros fatores de risco, tais como a exposição à xenobióticos, nutrição parenteral prolongada, uso de substâncias hepatotóxicas, *bypass* jejunoileal, entre outros<sup>11; 21</sup>.

Em grande parte dos casos a DHGNA é assintomática, embora alguns pacientes possam apresentar sintomas inespecíficos como fadiga, desconforto no abdome e plenitude gástrica provocada por hepatomegalia<sup>22</sup>. O seu diagnóstico é realizado através de exames bioquímicos alterados, como o aumento moderado das enzimas hepáticas, particularmente da aspartato aminotransferase (AST) e da alanina aminotransferase (ALT). Além disso, um aumento superior da ALT em comparação a AST (AST/ALT <1) pode indicar a presença de doença hepática. Os níveis de fosfatase alcalina e/ou gamaglutamiltransferase (GGT) podem estar moderadamente elevados e a elevados em fase tardias da doença<sup>2; 23</sup>.

No diagnóstico imagiológico, a ultrassonografia, a tomografia computadorizada, a ressonância magnética podem auxiliar no diagnóstico da DHGNA, no entanto essas técnicas não diferenciam uma ES da EHNA<sup>22</sup>. A biópsia hepática é o padrão ouro para a caracterização da histologia hepática em doentes com DHGNA, mas por ser uma técnica invasiva e com riscos associados, deve ser realizada em situações específicas, onde o paciente tem orientação terapêutica e perspectivas prognósticas<sup>24</sup>.

Os achados histológicos mais comuns na biópsia hepática da DHGNA são esteatose macrovesicular isolada ou esteatose macrovesicular e microvesicular concomitantes. Na EHNA, os achados histológicos incluem: esteatose macrovesicular, balonização hepatocelular, inflamação lobular e corpúsculos e Mallory (Figura 2). Geralmente a fibrose está presente, mas não é um fator necessário para o diagnóstico<sup>25</sup>.



**Figura 2 - Representação de uma biópsia hepática de EHNA.** A) Características histológicas de EHNA, incluindo esteatose macrovesicular, balonismo e inflamação lobular (4x). B) Esteatose macrovesicular (10x). C) Balonização hepatocelular (40x). D) Corpúsculos de Mallory – seta (60x). Adaptado de Brown e Kleiner<sup>25</sup>.

Para auxiliar a avaliação da gravidade da DHGNA, em 2002, foi validado um sistema de graduação com as características histológicas da doença, denominado NAFLD Activity Score (NAS). A pontuação é calculada como a soma dos escores para: esteatose (0-3), inflamação lobular (0-3) e balonização hepatocelular (0-2). Os valores maiores ou iguais a 5 correspondem a um diagnóstico definitivo de EHNA, igual a 3 ou 4 diagnóstico provável de EHNA e valores de 1 ou 2 diagnóstico de não EHNA<sup>26</sup>.

### **Carcinoma hepatocelular**

O CHC representa o tipo mais comum de câncer primário de fígado, sendo o sexto câncer mais prevalente no mundo e a segunda principal causa de morte relacionada ao câncer<sup>6</sup>. A grande variação na incidência do CHC no mundo se deve a grande heterogeneidade com que os fatores de risco se distribuem na população<sup>27</sup>. Nos

Estados Unidos, a incidência triplicou nas últimas três décadas, com mais de 20.000 casos diagnosticados em 2011<sup>28</sup>. No Brasil, dados sobre de real incidência do CHC são escassos, visto que poucos estudos multicêntricos foram realizados. Em um estudo de Paranaguá-Vezozzo e colaboradores (2014) foram avaliados 884 pacientes cirróticos, sendo verificada uma incidência de 2,9% de pacientes com CHC<sup>29</sup>. Outro estudo brasileiro verificou que cerca de 10% de casos de transplante são relacionados ao CHC<sup>30</sup>. Todos os estudos brasileiros demonstraram que a grande extensão, as variações regionais e a diversidade do país contribuem para que os dados epidemiológicos sobre a doença continuem escassos e discrepantes.

As principais etiologias do CHC incluem a infecção crônica pelo vírus da hepatite B (VHB), hepatite C (VHC) e doença hepática alcoólica. No entanto, com o aprimoramento dos tratamentos curativos para o VHC e desenvolvimento de vacinas eficazes para VHB, o risco de progressão para cirrose e desenvolvimento de CHC secundário a essas doenças diminuiu nos últimos anos<sup>6</sup>. Com o aumento da prevalência da obesidade e SM, a DHGNA se tornou umas das principais etiologias para o desenvolvimento de CHC<sup>31</sup>. O CHC secundário à EHNA tornou-se a segunda etiologia mais comum de CHC, que é levado ao transplante hepático nos EUA<sup>32</sup>. Um recente estudo multicêntrico brasileiro avaliou as características clínicas de 110 pacientes com diagnóstico de DHGNA e CHC. A obesidade foi observada em 52,7% dos pacientes; DM2 em 73,6%, dislipidemia em 41%; SM em 57,2%; EHNA sem fibrose foi observada em 3,8% dos casos; EHNA com fibrose (graus 1-3) observada em 27%; e cirrose em 61,5%. O diagnóstico do CHC por biópsia foi realizado 47,2% dos pacientes<sup>33</sup>. Em 2009, Chagas e colaboradores realizaram um estudo que demonstrou que CHC pode ocorrer em decorrência da EHNA, mesmo com a ausência de cirrose. No estudo, entre 394 pacientes com CHC detectados por

ultrassonografia durante 8 anos foram identificados 7 casos (1,7%) com CHC ocorrendo no cenário de EHNA comprovada por biópsia<sup>34</sup>.

Na literatura, há controvérsias sobre a evolução da DHGNA para CHC, embora grande parte dos estudos sugira que o mecanismo mais provável envolve o acúmulo de ácidos graxos nos hepatócitos, que desencadeia inflamação e fibrose, decorrente de fatores como a síndrome metabólica, aumento do estresse oxidativo, disfunção mitocondrial e endotoxemia<sup>35</sup>. Estudos recentes mostraram o papel importante da disbiose intestinal, que é definida como qualquer alteração na composição da microbiota intestinal, na patogênese várias doenças hepáticas, inclusive evidenciando um papel da microbiota na etiologia e progressão do CHC. Na presença da disbiose e na ruptura da barreira intestinal ocorre um aumento da translocação bacteriana, que interrompe a tolerância imunológica e estimula as células hepáticas para desencadear uma resposta imune através dos receptores *toll like*<sup>36</sup>.

A sobrevida dos pacientes com CHC é influenciada por fatores como as características próprias do indivíduo e do tumor, a precocidade do diagnóstico e a eficácia da intervenção terapêutica. A grande maioria dos casos de CHC é diagnosticada quando o tumor está avançado e com pouca chance de cura<sup>30</sup>. O ideal é diagnosticar a doença na fase precoce, quando as possibilidades de tratamento curativo podem ser efetivas. Para o diagnóstico precoce do CHC, os pacientes portadores de cirrose hepática, ou aqueles sem cirrose hepática que apresentam infecção ativa por VHB ou infecção crônica por VHC associadas à fibrose avançada, devem ser monitorados, conforme orientação do EASL–EORTC (*Clinical Practice Guidelines European Association for the Study of the Liver and the*

European Organization for Research and Treatment of Cancer - 2012). O acompanhamento dos indivíduos com fatores de risco favoráveis ao surgimento da doença pode permitir a conduta terapêutica precoce e, conseqüentemente, uma maior sobrevida<sup>5</sup>. Ainda como método diagnóstico, utiliza-se a biópsia hepática com fins de análise histopatológica. No entanto, por ser um método invasivo, só é utilizado em casos onde os métodos não invasivos não foram capazes de definir o diagnóstico de CHC<sup>37</sup>.

Um dos sistemas de graduação histológicos mais utilizados para diagnosticar o CHC é o de Edmondson-Steiner, uma classificação proposta em 1952 que é utilizada até hoje pelos médicos patologistas. Este sistema classifica o tumor de acordo com o grau de diferenciação das células neoplásicas, existindo 4 níveis: bem diferenciado, moderadamente diferenciado, pouco diferenciado e não diferenciado<sup>38; 39</sup> (Tabela 1).

**Tabela 1 - Classificação de Edmondson-Steiner**

<b>Grau</b>	<b>Achados histológicos</b>
1 (bem diferenciado)	<ul style="list-style-type: none"> <li>– crescimento em trabéculas finas;</li> <li>– células com maior relação núcleo/citoplasma, citoplasma abundante</li> </ul>
2 (moderadamente diferenciado)	<ul style="list-style-type: none"> <li>– crescimento em trabéculas médias;</li> <li>– células com citoplasma amplo e eosinófilo;</li> <li>– núcleos irregulares e nucléolo hipercromático;</li> </ul>
3 (pouco diferenciado)	<ul style="list-style-type: none"> <li>– crescimento em trabéculas largas e pseudoácinos;</li> <li>– células pleomórficas, citoplasma escasso, núcleos angulados;</li> </ul>
4 (não diferenciado)	<ul style="list-style-type: none"> <li>– células gigantes e anaplásicas, com graus variáveis de pleomorfismo;</li> </ul>

O tratamento do CHC é feito de acordo com o estadiamento, conforme o tamanho do tumor, o número de nódulos, a função hepática e a condição clínica do paciente. Existem diversas terapias que são utilizadas na prática clínica, dentre elas: ressecção cirúrgica, radiofrequência, ablação química, sorafenibe e o transplante hepático, porém o tratamento de CHC continua sendo um desafio para medicina. Na tabela 2 é possível observar a descrição dos principais tratamentos para o CHC <sup>37; 40; 41; 42; 43; 44</sup>.

**Tabela 2 - Tratamentos atuais para o CHC**

<b>Terapêutica</b>	<b>Descrição</b>
Ressecção cirúrgica do nódulo	Potencialmente curativo; indicado em pacientes com função hepática bem preservada.
Transplante hepático	Eficaz para pacientes que não podem ser submetidos à ressecção, mas a escassez de doadores é um grande obstáculo.
Ablação percutânea	Indicada para tumores pequenos, quando não pode indicar o transplante ou a ressecção; realizada através da injeção de álcool diretamente no tumor, guiada por ultrassom.
Quimioembolização transarterial	É paliativo; aumenta a sobrevida do paciente ou atua como adjuvante com outro tipo de tratamento; consiste na infusão intra-arterial de material quimioterápico e embólico, para tratamento local do tumor hepático.
Sorafenibe	Fármaco que mostrou maior eficácia quanto a sobrevida dos pacientes; é um inibidor da tirosina quinase capaz de reduzir proliferação e neovascularização do tumor.

Quando diagnosticado em etapas iniciais, o CHC tem potencial curativo. A busca por novas estratégias de diagnóstico e de terapêuticas propiciam a identificação da doença em fase precoce e a indicação de tratamento mais apropriado para promover uma maior sobrevida do paciente<sup>5; 45</sup>.

### **Modelos animais de carcinoma hepatocelular**

Modelos animais experimentais de CHC são fundamentais para compreender aspectos do processo de carcinogênese hepática e, principalmente, para testar novas terapêuticas a serem utilizadas na prevenção e no tratamento dessa doença<sup>46</sup>.

Na literatura, existem diversos modelos experimentais em CHC: os modelos por indução química, modelos virais, xenotransplantes, modelos com geneticamente modificados, entre outros<sup>47; 48; 49; 50</sup>. Os modelos de CHC por indução química se assemelham às etapas da carcinogênese humana, sendo utilizadas substâncias cancerígenas indutoras, como a tiocetamida, tetracloreto de carbono, fenobarbital ou dietilnitrosamina (DEN)<sup>48</sup>. DEN é um potente alquilante do DNA e provoca alterações genéticas profundas nas células hepáticas. No fígado, o DEN é metabolizado no citocromo P450 e lesa proteínas e lipídeos, também afetando o desenvolvimento, crescimento e sobrevivência dos hepatócitos. No entanto, nenhum desses modelos reflete o verdadeiro curso do CHC secundário a DHGNA, devido à diversidade do espectro da doença nos pacientes, além das diferentes características de interações moleculares e características histológicas da doença<sup>51</sup>

Espera-se que o modelo ideal de CHC secundário a DHGNA mimetize o que ocorre na doença com os seres humanos: excesso de calorias na alimentação, associado à obesidade, resistência insulínica, dislipidemia<sup>52</sup>. Por isso, diversos modelos

experimentais utilizam dietas modificadas para o desenvolvimento das doenças. Na dieta hiperlipídica pura há o consumo de 45% à 75% de calorias provenientes de lipídeos ou colesterol. Já as dietas deficientes em nutrientes são desprovidas de certos nutrientes essenciais, como a metionina e/ou a colina. Esta abordagem resultou em vários tipos de dieta, como deficiente em colina, deficiente em metionina, deficiente em metionina-colina, dieta hiperlipídica deficiente em colina (DHDC), Todas essas dietas podem variar em teor de gordura e também podem ser incluídas sacarose e frutose<sup>52</sup>. Na dieta deficiente em colina, em especial, ocorre a carência da colina, um nutriente necessário para síntese de fosfolipídios essenciais na composição das membranas celulares e lipoproteínas, como a lipoproteína de baixa densidade (VLDL). Nesta dieta carente em colina há produção deficiente de fosfolipídios essenciais e prejuízo na formação de VLDL. Por sua vez, os hepatócitos exportam ácidos graxos por meio da conversão em VLDL, ocorrendo o acúmulo de triglicerídeos no fígado<sup>53; 54</sup>.

A principal vantagem do uso de dietas deficientes em nutrientes é a indução de características histológicas da EHNA, incluindo fibrose leve a moderada. No entanto, o desenvolvimento para CHC a partir dessas dietas ocorre de forma lenta, de 3 a 6 meses<sup>51; 55</sup>. Por isso tem se proposto a associação com carcinógenos para o desenvolvimento mais rápido do CHC<sup>46; 47; 56</sup>.

Na tabela 3 é possível observar os principais modelos animais de CHC secundário a DHGNA. Adaptado de Wu e colaboradores, 2016<sup>51</sup>.

**Tabela 3 – Modelos animais de CHC secundário a DHGNA.**

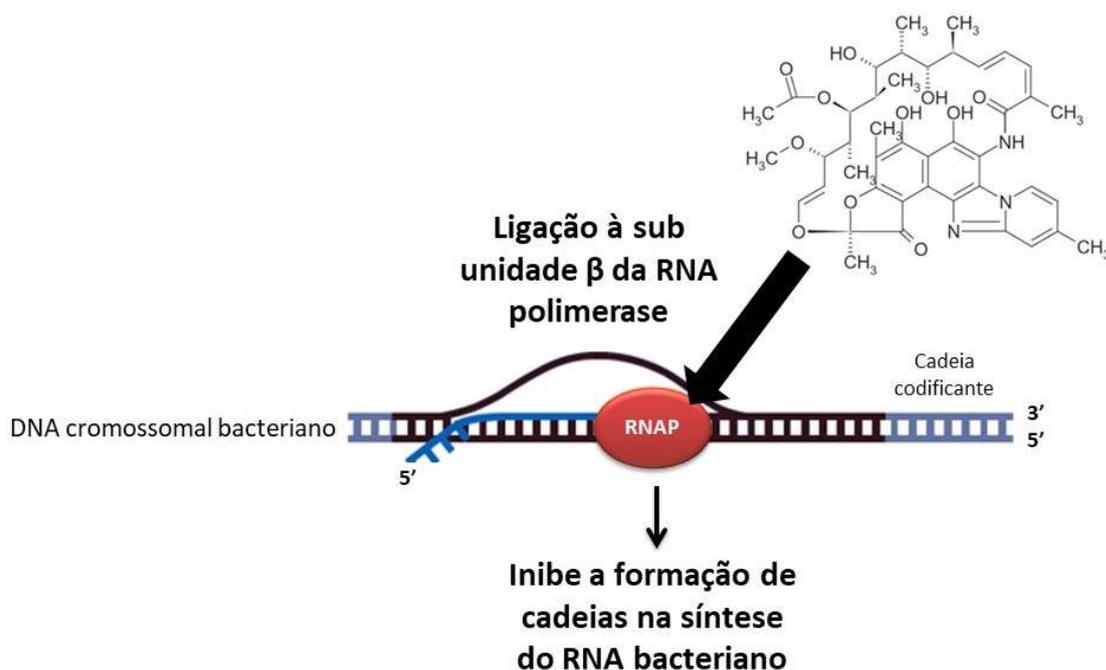
<b>Nome</b>	<b>Espécie</b>	<b>Agente</b>	<b>Desenvolvimento</b>
PTEN-nulo	Camundongo AlbCrePtenflox/flox	Formação espontânea	EHNA: 3 meses CHC: 9 meses
ALR-nulo	Camundongo AlbCre ALRflox/flox	Formação espontânea	EHNA: 2 meses CHC: 12 meses
MC4R-deficiente	Camundongo MC4R-knock-out	Dieta hiperlipídica	EHNA: 5 meses CHC: 12 meses
DIAMOND	Camundongo 12951/SvlmJ + C57BL/6J	Dieta hiperlipídica deficiente em colina	EHNA: 6 meses CHC: 13 meses
Dieta HLDC -DM	Camundongo ou rato	Dieta hiperlipídica deficiente em colina e metionina	EHNA: 5 meses CHC: 12 meses
STAM	Camundongo	Dieta hiperlipídica Streptozotocina	EHNA: 2 meses CHC: 5 meses
ALIOS	Camundongo	Dieta hiperlipídica e frutose	EHNA: 4 meses CHC: 12 meses
Dieta HDC + DEN	Rato	Dieta hiperlipídica deficiente em colina; DEN na água	EHNA: 1 mês CHC: 4 meses

Nossos colaboradores da Universidade de São Paulo desenvolveram um modelo experimental de CHC adicionando DEN a uma dieta hiperlipídica deficiente em colina, chamado modelo misto de CHC secundário à DHGNA. Este modelo é ideal para avaliar a hepatocarcinogênese relacionada à DHGNA, visto que apresenta similaridade com os seres humanos, com uma evolução de ES pra EHNA, cirrose e progressão ao CHC<sup>57</sup>.

Em estudo com este modelo, foi observado que após 16 semanas os animais apresentam características de EHNA, incluindo balonização, fibrose, cirrose, além de CHC, com evidência de proliferação celular oval e positividade do marcador citoqueratina 19<sup>57</sup>. Esta associação entre DEN e dieta hiperlipídica deficiente em colina é relatada na literatura, o que demonstra ser um modelo de indução a CHC devidamente padronizado<sup>57; 58; 59</sup>. Por exemplo, no estudo de Carvalho e colaboradores, o modelo misto foi desenvolvido com sucesso para avaliar o desempenho diagnóstico da elastografia e ultra-sonografia com contraste para detecção precoce de lesões de CHC<sup>60</sup>.

### **Rifaximina**

A rifaximina (C<sub>43</sub>H<sub>51</sub>N<sub>3</sub>O<sub>11</sub>) é um análogo estrutural não sistêmico derivado da rifampicina que age inibindo a síntese de RNA bacteriano através da ligação à subunidade β da RNA polimerase dependente de DNA bacteriano<sup>4; 61</sup> (Figura 3). A adição de um anel de piridoimidazol à molécula de rifampicina torna a rifaximina um antibiótico insolúvel em água e pouco absorvível (<0,4%). Possui atividade antimicrobiana *in vitro* contra flora gram-positiva e gram-negativa aeróbica e anaeróbica, com baixo risco de desenvolver resistência bacteriana<sup>3</sup>. Por ser uma terapia oral não absorvível que possui ação antibacteriana de grande espectro, age atuando localmente no trato gastrointestinal, o que contribui para restaurar o desequilíbrio da microflora intestinal. Também está associada a um risco mínimo de toxicidade sistêmica e, por isso, gera efeitos colaterais mínimos<sup>61; 62; 63</sup>. Outra vantagem é que este fármaco não causa interações medicamentosas<sup>64</sup>.



**Figura 3 - Mecanismo de ação da Rifaximina<sup>65</sup>.** Atua inibindo a síntese de RNA bacteriano através da ligação à subunidade  $\beta$  da RNA polimerase dependente de DNA bacteriano.

Foi aprovada pela primeira vez na Itália em 1987 e após em inúmeros países para o tratamento de várias doenças gastrointestinais. Em maio de 2004 foi aprovada pela *Food and Drug Administration* dos Estados Unidos para o tratamento da diarreia do viajante causada por cepas não invasivas de *Escherichia coli* em pacientes maiores de 12 anos. A partir de 2010 passou a ser largamente utilizada pelos principais países europeus, para redução do risco recidiva de encefalopatia hepática em pacientes com doença hepática avançada<sup>66; 67</sup>. Atualmente, o medicamento está disponível em 47 países para tratamento de uma variedade de condições incluindo: infecções agudas e crônicas de causas bacterianas, diarreia, síndrome do intestino irritável, encefalopatia hepática, complicações da cirrose e profilaxia pré e pós-cirúrgica<sup>68</sup>.

Os mecanismos propostos para explicar a eficácia clínica indicam que a RIF pode reduzir a patogenicidade bacteriana inibindo a translocação bacteriana através dos epitélios da mucosa intestinal, o que reduz a liberação ou absorção de endotoxinas e metabólitos bacterianos<sup>69</sup>. Outro mecanismo que tem sido estudado é que a RIF também pode atuar modulando a sinalização imune intestinal, reduzindo os níveis de mediadores imunológicos pró-inflamatórios e a resposta pró-inflamatória crônica associada às doenças<sup>63</sup>. Portanto, a RIF atua como moduladora do microambiente intestinal, atuando no eixo intestino-fígado como moduladora da composição e a função da microbiota intestinal, além de exercer propriedades de citoproteção<sup>67 70</sup>.

Alguns estudos clínicos foram realizados a fim de testar o uso de RIF em pacientes com DHGNA. Gangarapu e colaboradores avaliaram a administração de RIF, na dose de 1200 mg/dia durante 28 dias, em 42 pacientes com DHGNA comprovada com biópsia. Como resultados, foi observada uma redução do índice de massa corporal, endotoxinas, interleucina-10, ALT, GGT, LDL e ferritina, o que indica que administração em curto prazo da RIF é segura e eficaz<sup>71</sup>. Em estudo de Abdel-Razik e colaboradores foram avaliados 50 participantes com EHNA comprovada por biópsia, com tratamento em 1, 3 e 6 meses com RIF na dose de 1100 mg/dia. Após 6 meses de tratamento, os pacientes com EHNA mostraram uma redução significativa nos seguintes parâmetros: ALT, AST, GGT, escore de gordura hepática endotoxinas séricas, citocinas pró-inflamatórias, citoqueratina 18, além de uma melhora na resistência a insulina<sup>72</sup>. Até o presente momento, não foram encontrados estudos clínicos que relacionem o CHC com o uso da RIF. O único estudo encontrado foi de Dapito e colaboradores, que mostrou que a RIF reduziu moderadamente o número de nódulos tumorais em ratos expostos a um modelo químico de DEN e tetracloreto de carbono<sup>73</sup>.

Apesar do grande número de estudos clínicos utilizando a RIF como terapêutica para doenças hepáticas, os efeitos do fármaco sobre o desenvolvimento do CHC permanecem desconhecidos. Visto a eficácia observada em determinadas condições gastrointestinais e hepáticas e evidências que mostram um papel fundamental do microbioma bacteriano na promoção da progressão da doença hepática até o desenvolvimento do CHC<sup>36; 74</sup>, o uso da RIF pode ser um potencial candidato para tratamento do CHC secundário à DHGNA.

## **JUSTIFICATIVA**

Considerando a crescente incidência de DHGNA e CHC em todo o mundo e o impacto que essas doenças geram na sobrevida dos pacientes, novas medidas profiláticas e terapêuticas são indispensáveis. Muitos estudos demonstram que a rifaximina, um antibiótico oral não absorvível, tem sido tratamento efetivo de diversas doenças gastrointestinais e hepáticas. Assim, este estudo se justifica por avaliar a intervenção precoce de rifaximina no CHC secundário à DHGNA.

## **QUESTÃO DE PESQUISA**

O tratamento com rifaximina poderia ter efeito na carcinogênese hepática secundária à DHGNA?

## **HIPÓTESE**

A rifaximina tem efeito na carcinogênese hepática experimental secundária à DHGNA.

## **OBJETIVO GERAL**

Avaliar o efeito da rifaximina na carcinogênese hepática experimental secundária à DHGNA.

### **Objetivos específicos**

1. Reproduzir o modelo carcinogênese hepática experimental secundária à DHGNA.
2. Avaliar o efeito da rifaximina em parâmetros bioquímicos séricos.
3. Avaliar o efeito da rifaximina sobre o *NAFLD Activity Score* e grau de fibrose.
4. Avaliar o efeito da rifaximina na progressão do carcinoma hepatocelular.

## CONCLUSÕES

1. Foi possível reproduzir o modelo de carcinogênese hepática experimental secundária à DHGNA e avaliar novos parâmetros bioquímicos no modelo animal que ainda não foram descritos na literatura.
2. O tratamento com rifaximina melhora os valores séricos bioquímicos, mas sem significância estatística.
3. O tratamento com rifaximina promoveu uma discreta melhora no *NAFLD Activity Score*, mas sem significância estatística e não teve efeito benéfico sobre o grau de fibrose.
4. O tratamento com rifaximina parece reduzir o número e tamanho dos tumores hepáticos, assim como teve um efeito na progressão no CHC em alguns animais.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Como considerações finais são possíveis mencionar as originalidades e limitações do presente estudo.

A originalidade consiste na avaliação do efeito da rifaximina em um modelo CHC que utiliza a DHDC para mimetizar o estilo de vida ocidental, juntamente ao DEN, recriando as etapas da história natural da DHGNA com progressão ao CHC. Até o momento, apenas um estudo avaliou o tratamento com rifaximina. No entanto, foi utilizado um modelo químico de CHC<sup>73</sup>.

Um questionamento em nosso estudo é a dose de rifaximina utilizada. A escolha de 50mg/kg/dia foi baseada no estudo de Dapito e colaboradores, no qual foi analisado o efeito da rifaximina após o desenvolvimento do CHC. Contudo, nosso estudo avalia um tratamento preventivo, administrando a rifaximina nas etapas iniciais de EHNA. Há na literatura outros estudos que avaliam o efeito da rifaximina em outras doenças gastrointestinais e hepáticas, que utilizam doses que de 25 a 250 mg/kg/dia, com tempo de tratamento entre 3 e 21 dias <sup>75; 76; 77; 78; 79</sup>. Estes estudos indicam que seria possível aumentar a dose de rifaximina e, assim, avaliar se ocorreria um melhor efeito do medicamento sobre o CHC.

Por outra parte, nossos achados mostraram que três dos sete animais que receberam rifaximina não apresentaram progressão para CHC. Sabemos que a rifaximina tem um efeito sobre a microbiota<sup>3</sup> e que esta tem um papel fundamental no desenvolvimento do CHC<sup>80</sup>. Assim, uma hipótese possível é que rifaximina possa ter modificado a microbiota dos animais e, como consequência, possa ter evitado a progressão da doença. Para podermos confirmar nossa hipótese seria interessante analisar a microbiota dos animais.

Uma das limitações deste estudo foi a falta de um grupo experimental com a finalidade de verificar em que etapa da doença os animais estariam quando iniciado o tratamento com rifaximina. Já foi descrito na literatura que os animais desenvolvem EHNA na 5ª semana, de acordo com o estudo realizado por Stefano e colaboradores (2015) que utilizaram o mesmo modelo experimental<sup>81</sup>.

Considerando que a rifaximina parece ter um efeito na progressão do CHC, novos estudos podem ser realizados, sendo possível avaliar novas doses, modificar o tempo de tratamento bem como o momento de início.

## **PERSPECTIVAS**

Diversos questionamentos foram gerados a partir dos dados obtidos e, por isso, como principais perspectivas do presente trabalho temos:

- a) Avaliar doses maiores de rifaximina.
- b) Avaliar diferentes tempos de tratamento, com administração da rifaximina em tempos anteriores ao que já foi testado.
- c) Realizar biópsias do fígado nos animais no momento de início do tratamento, para verificar a etapa da doença ou realizar um grupo experimental para verificar a etapa da doença dos animais quando iniciado o tratamento com rifaximina.
- d) Realizar a avaliação de marcadores inflamatórios dos animais.
- e) Realizar um grupo experimental controle somente com a administração de rifaximina, para verificar a ação do fármaco no organismo dos animais saudáveis no tempo de estudo.
- f) Avaliar se houve modificação da microbiota, permeabilidade intestinal endotoxemia dos animais.

## REFERÊNCIAS

- <sup>1</sup> MAURICE, J.; MANOUSOU, P. Non-alcoholic fatty liver disease. **Clin Med (Lond)**, v. 18, n. 3, p. 245-250, Jun 2018. ISSN 1473-4893. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29858436> >.
- <sup>2</sup> YOUNOSSI, Z. M. et al. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease- Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. **Hepatology**, v. 64, n. 1, p. 73-84, 07 2016. ISSN 1527-3350. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26707365> >.
- <sup>3</sup> SHAYTO, R. H.; ABOU MRAD, R.; SHARARA, A. I. Use of rifaximin in gastrointestinal and liver diseases. **World J Gastroenterol**, v. 22, n. 29, p. 6638-51, Aug 2016. ISSN 2219-2840. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27547007> >.
- <sup>4</sup> PONZIANI, F. R. et al. Effect of rifaximin on gut microbiota composition in advanced liver disease and its complications. **World J Gastroenterol**, v. 21, n. 43, p. 12322-33, Nov 2015. ISSN 2219-2840. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26604640> >.
- <sup>5</sup> LLOVET, J. M. et al. Hepatocellular carcinoma. **Nat Rev Dis Primers**, v. 2, p. 16018, Apr 2016. ISSN 2056-676X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27158749> >.
- <sup>6</sup> CHOLANKERIL, G. et al. Hepatocellular carcinoma in non-alcoholic steatohepatitis: Current knowledge and implications for management. **World J Hepatol**, v. 9, n. 11, p. 533-543, Apr 2017. ISSN 1948-5182. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28469809> >.
- <sup>7</sup> THAN, N. N.; NEWSOME, P. N. A concise review of non-alcoholic fatty liver disease. **Atherosclerosis**, v. 239, n. 1, p. 192-202, Mar 2015. ISSN 1879-1484. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25617860> >.
- <sup>8</sup> CHALASANI, N. et al. The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association. **Hepatology**, v. 55, n. 6, p. 2005-23, Jun 2012. ISSN 1527-3350. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22488764> >.
- <sup>9</sup> BRUNT, E. M.; TINIAKOS, D. G. Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease. **World J Gastroenterol**, v. 16, n. 42, p. 5286-96, Nov 2010. ISSN 2219-2840. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21072891> >.
- <sup>10</sup> SATAPATHY, S. K.; SANYAL, A. J. Epidemiology and Natural History of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **Semin Liver Dis**, v. 35, n. 3, p. 221-35, Aug 2015. ISSN 1098-8971. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26378640> >.
- <sup>11</sup> ARAB, J. P.; ARRESE, M.; TRAUNER, M. Recent Insights into the Pathogenesis of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **Annu Rev Pathol**, v. 13, p. 321-350, Jan 2018. ISSN 1553-4014. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29414249> >.
- <sup>12</sup> LEWIS, J. R.; MOHANTY, S. R. Nonalcoholic fatty liver disease: a review and update. **Dig Dis Sci**, v. 55, n. 3, p. 560-78, Mar 2010. ISSN 1573-2568. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20101463> >.

- <sup>13</sup> CORTE, C. D. et al. Epidemiology and Natural History of NAFLD. **J Med Biochem**, v. 34, n. 1, p. 13-17, Jan 2015. ISSN 1452-8258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28356818> >.
- <sup>14</sup> BENEDICT, M.; ZHANG, X. Non-alcoholic fatty liver disease: An expanded review. **World J Hepatol**, v. 9, n. 16, p. 715-732, Jun 2017. ISSN 1948-5182. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28652891> >.
- <sup>15</sup> ARAÚJO, A. R. et al. Global epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease/non-alcoholic steatohepatitis: What we need in the future. **Liver Int**, v. 38 Suppl 1, p. 47-51, Feb 2018. ISSN 1478-3231. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29427488> >.
- <sup>16</sup> COTRIM, H. P. et al. Nonalcoholic fatty liver disease in Brazil. Clinical and histological profile. **Ann Hepatol**, v. 10, n. 1, p. 33-7, 2011 Jan-Mar 2011. ISSN 1665-2681. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21301007> >.
- <sup>17</sup> LEITE, N. C. et al. Histopathological stages of nonalcoholic fatty liver disease in type 2 diabetes: prevalences and correlated factors. **Liver Int**, v. 31, n. 5, p. 700-6, May 2011. ISSN 1478-3231. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21457442> >.
- <sup>18</sup> MOHAMAD, B. et al. Characterization of hepatocellular carcinoma (HCC) in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) patients without cirrhosis. **Hepatol Int**, v. 10, n. 4, p. 632-9, Jul 2016. ISSN 1936-0541. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26558795> >.
- <sup>19</sup> PAPANDREOU, D.; ANDREOU, E. Role of diet on non-alcoholic fatty liver disease: An updated narrative review. **World J Hepatol**, v. 7, n. 3, p. 575-82, Mar 2015. ISSN 1948-5182. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25848481> >.
- <sup>20</sup> MARCHESINI, G. et al. Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome. **Hepatology**, v. 37, n. 4, p. 917-23, Apr 2003. ISSN 0270-9139. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12668987> >.
- <sup>21</sup> SEO, S. et al. De novo nonalcoholic fatty liver disease after liver transplantation. **Liver Transpl**, v. 13, n. 6, p. 844-7, Jun 2007. ISSN 1527-6465. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17029282> >.
- <sup>22</sup> AHMED, A.; WONG, R. J.; HARRISON, S. A. Nonalcoholic Fatty Liver Disease Review: Diagnosis, Treatment, and Outcomes. **Clin Gastroenterol Hepatol**, v. 13, n. 12, p. 2062-70, Nov 2015. ISSN 1542-7714. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26226097> >.
- <sup>23</sup> SPENGLER, E. K.; LOOMBA, R. Recommendations for Diagnosis, Referral for Liver Biopsy, and Treatment of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis. **Mayo Clin Proc**, v. 90, n. 9, p. 1233-46, Sep 2015. ISSN 1942-5546. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26219858> >.
- <sup>24</sup> COTRIM, H. P. et al. NONALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE BRAZILIAN SOCIETY OF HEPATOLOGY CONSENSUS. **Arq Gastroenterol**, v. 53, n. 2, p. 118-22, 2016 Apr-Jun 2016. ISSN 1678-4219. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27305420> >.
- <sup>25</sup> BROWN, G. T.; KLEINER, D. E. Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis. **Metabolism**, v. 65, n. 8, p. 1080-6, 08 2016. ISSN 1532-8600. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26775559> >.

- <sup>26</sup> KLEINER, D. E. et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. **Hepatology**, v. 41, n. 6, p. 1313-21, Jun 2005. ISSN 0270-9139. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15915461> >.
- <sup>27</sup> KIKUCHI, L. et al. Clinical and epidemiological aspects of hepatocellular carcinoma in Brazil. **Antivir Ther**, v. 18, n. 3 Pt B, p. 445-9, 2013. ISSN 2040-2058. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23793796> >.
- <sup>28</sup> DHANASEKARAN, R.; LIMAYE, A.; CABRERA, R. Hepatocellular carcinoma: current trends in worldwide epidemiology, risk factors, diagnosis, and therapeutics. **Hepat Med**, v. 4, p. 19-37, May 2012. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24367230> >.
- <sup>29</sup> PARANAGUÁ-VEZOZZO, D. C. et al. Epidemiology of HCC in Brazil: incidence and risk factors in a ten-year cohort. **Ann Hepatol**, v. 13, n. 4, p. 386-93, 2014 Jul-Aug 2014. ISSN 1665-2681. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24927609> >.
- <sup>30</sup> BRUIX, J.; GORES, G. J.; MAZZAFERRO, V. Hepatocellular carcinoma: clinical frontiers and perspectives. **Gut**, v. 63, n. 5, p. 844-55, May 2014. ISSN 1468-3288. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24531850> >.
- <sup>31</sup> MARGINI, C.; DUFOUR, J. F. The story of HCC in NAFLD: from epidemiology, across pathogenesis, to prevention and treatment. **Liver Int**, v. 36, n. 3, p. 317-24, Mar 2016. ISSN 1478-3231. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26601627> >.
- <sup>32</sup> WONG, R. J.; CHEUNG, R.; AHMED, A. Nonalcoholic steatohepatitis is the most rapidly growing indication for liver transplantation in patients with hepatocellular carcinoma in the U.S. **Hepatology**, v. 59, n. 6, p. 2188-95, Jun 2014. ISSN 1527-3350. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24375711> >.
- <sup>33</sup> COTRIM, H. P. et al. Nonalcoholic steatohepatitis and hepatocellular carcinoma: Brazilian survey. **Clinics (Sao Paulo)**, v. 71, n. 5, p. 281-4, May 2016. ISSN 1980-5322. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27276398> >.
- <sup>34</sup> CHAGAS, A. L. et al. Does hepatocellular carcinoma in non-alcoholic steatohepatitis exist in cirrhotic and non-cirrhotic patients? **Braz J Med Biol Res**, v. 42, n. 10, p. 958-62, Oct 2009. ISSN 1414-431X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19787150> >.
- <sup>35</sup> SAID, A.; GHUFRAN, A. Epidemic of non-alcoholic fatty liver disease and hepatocellular carcinoma. **World J Clin Oncol**, v. 8, n. 6, p. 429-436, Dec 2017. ISSN 2218-4333. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29291167> >.
- <sup>36</sup> PONZIANI, F. R. et al. Hepatocellular Carcinoma is Associated with Gut Microbiota Profile and Inflammation in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. **Hepatology**, Apr 2018. ISSN 1527-3350. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29665135> >.
- <sup>37</sup> CRISSIEN, A. M.; FRENETTE, C. Current management of hepatocellular carcinoma. **Gastroenterol Hepatol (N Y)**, v. 10, n. 3, p. 153-61, Mar 2014. ISSN 1554-7914. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24829542> >.
- <sup>38</sup> SCHLAGETER, M. et al. Histopathology of hepatocellular carcinoma. **World J Gastroenterol**, v. 20, n. 43, p. 15955-64, Nov 2014. ISSN 2219-2840. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25473149> >.
- <sup>39</sup> EDMONDSON, H. A.; STEINER, P. E. Primary carcinoma of the liver: a study of 100 cases among 48,900 necropsies. **Cancer**, v. 7, n. 3, p. 462-503, May 1954. ISSN 0008-543X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13160935> >.

- <sup>40</sup> NIU, L. et al. New insights into sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma: Responsible mechanisms and promising strategies. **Biochim Biophys Acta**, v. 1868, n. 2, p. 564-570, 12 2017. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29054475> >.
- <sup>41</sup> FORNER, A.; LLOVET, J. M.; BRUIX, J. Hepatocellular carcinoma. **Lancet**, v. 379, n. 9822, p. 1245-55, Mar 2012. ISSN 1474-547X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22353262> >.
- <sup>42</sup> ARAVALLI, R. N.; CRESSMAN, E. N.; STEER, C. J. Cellular and molecular mechanisms of hepatocellular carcinoma: an update. **Arch Toxicol**, v. 87, n. 2, p. 227-47, Feb 2013. ISSN 1432-0738. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23007558> >.
- <sup>43</sup> PASCUAL, S.; HERRERA, I.; IRURZUN, J. New advances in hepatocellular carcinoma. **World J Hepatol**, v. 8, n. 9, p. 421-38, Mar 2016. ISSN 1948-5182. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27028578> >.
- <sup>44</sup> CHEDID, M. F. et al. HEPATOCELLULAR CARCINOMA: DIAGNOSIS AND OPERATIVE MANAGEMENT. **Arq Bras Cir Dig**, v. 30, n. 4, p. 272-278, 2017 Oct-Dec 2017. ISSN 2317-6326. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29340553> >.
- <sup>45</sup> HARTKE, J.; JOHNSON, M.; GHABRIL, M. The diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma. **Semin Diagn Pathol**, v. 34, n. 2, p. 153-159, Mar 2017. ISSN 0740-2570. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28108047> >.
- <sup>46</sup> BAKIRI, L.; WAGNER, E. F. Mouse models for liver cancer. **Mol Oncol**, v. 7, n. 2, p. 206-23, Apr 2013. ISSN 1878-0261. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23428636> >.
- <sup>47</sup> FAUSTO, N.; CAMPBELL, J. S. Mouse models of hepatocellular carcinoma. **Semin Liver Dis**, v. 30, n. 1, p. 87-98, Feb 2010. ISSN 1098-8971. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20175036> >.
- <sup>48</sup> LI, Y.; TANG, Z. Y.; HOU, J. X. Hepatocellular carcinoma: insight from animal models. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**, v. 9, n. 1, p. 32-43, Oct 2011. ISSN 1759-5053. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22025031> >.
- <sup>49</sup> DE MINICIS, S. et al. Liver carcinogenesis: rodent models of hepatocarcinoma and cholangiocarcinoma. **Dig Liver Dis**, v. 45, n. 6, p. 450-9, Jun 2013. ISSN 1878-3562. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23177172> >.
- <sup>50</sup> TOLBA, R. et al. Diethylnitrosamine (DEN)-induced carcinogenic liver injury in mice. **Lab Anim**, v. 49, n. 1 Suppl, p. 59-69, Apr 2015. ISSN 1758-1117. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25835739> >.
- <sup>51</sup> WU, J. Utilization of animal models to investigate nonalcoholic steatohepatitis-associated hepatocellular carcinoma. **Oncotarget**, v. 7, n. 27, p. 42762-42776, Jul 2016. ISSN 1949-2553. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27072576> >.
- <sup>52</sup> ASGHARPOUR, A. et al. A diet-induced animal model of non-alcoholic fatty liver disease and hepatocellular cancer. **J Hepatol**, v. 65, n. 3, p. 579-88, Sep 2016. ISSN 1600-0641. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27261415> >.
- <sup>53</sup> GRATTAGLIANO, I. et al. Starvation impairs antioxidant defense in fatty livers of rats fed a choline-deficient diet. **J Nutr**, v. 130, n. 9, p. 2131-6, Sep 2000. ISSN 0022-3166. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10958803> >.

- <sup>54</sup> RAUBENHEIMER, P. J.; NYIRENDA, M. J.; WALKER, B. R. A choline-deficient diet exacerbates fatty liver but attenuates insulin resistance and glucose intolerance in mice fed a high-fat diet. **Diabetes**, v. 55, n. 7, p. 2015-20, Jul 2006. ISSN 0012-1797. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16804070> >.
- <sup>55</sup> HEINDRYCKX, F.; COLLE, I.; VAN VLIERBERGHE, H. Experimental mouse models for hepatocellular carcinoma research. **Int J Exp Pathol**, v. 90, n. 4, p. 367-86, Aug 2009. ISSN 1365-2613. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19659896> >.
- <sup>56</sup> SANCHES, S. C. et al. Nonalcoholic Steatohepatitis: A Search for Factual Animal Models. **Biomed Res Int**, v. 2015, p. 574832, 2015. ISSN 2314-6141. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26064924> >.
- <sup>57</sup> DE LIMA, V. M. et al. A rodent model of NASH with cirrhosis, oval cell proliferation and hepatocellular carcinoma. **J Hepatol**, v. 49, n. 6, p. 1055-61, Dec 2008. ISSN 0168-8278. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18929425> >.
- <sup>58</sup> KISHIDA, N. et al. Development of a novel mouse model of hepatocellular carcinoma with nonalcoholic steatohepatitis using a high-fat, choline-deficient diet and intraperitoneal injection of diethylnitrosamine. **BMC Gastroenterol**, v. 16, n. 1, p. 61, Jun 2016. ISSN 1471-230X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27296438> >.
- <sup>59</sup> MAZO, D. F. et al. S-nitroso-N-acetylcysteine attenuates liver fibrosis in experimental nonalcoholic steatohepatitis. **Drug Des Devel Ther**, v. 7, p. 553-63, 2013. ISSN 1177-8881. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23843692> >.
- <sup>60</sup> CARVALHO, C. F. et al. Elastography and Contrast-enhanced Ultrasonography in the Early Detection of Hepatocellular Carcinoma in an Experimental Model of Nonalcoholic Steatohepatitis. **J Clin Exp Hepatol**, v. 3, n. 2, p. 96-101, Jun 2013. ISSN 0973-6883. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25755482> >.
- <sup>61</sup> DUPONT, H. L. Biologic properties and clinical uses of rifaximin. **Expert Opin Pharmacother**, v. 12, n. 2, p. 293-302, Feb 2011. ISSN 1744-7666. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21226639> >.
- <sup>62</sup> SCARPIGNATO, C.; PELOSINI, I. Rifaximin, a poorly absorbed antibiotic: pharmacology and clinical potential. **Chemotherapy**, v. 51 Suppl 1, p. 36-66, 2005. ISSN 0009-3157. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15855748> >.
- <sup>63</sup> DUPONT, H. L. Therapeutic Effects and Mechanisms of Action of Rifaximin in Gastrointestinal Diseases. **Mayo Clin Proc**, v. 90, n. 8, p. 1116-24, Aug 2015. ISSN 1942-5546. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26162610> >.
- <sup>64</sup> TRAPNELL, C. B. et al. Absence of effect of oral rifaximin on the pharmacokinetics of ethinyl estradiol/norgestimate in healthy females. **Ann Pharmacother**, v. 41, n. 2, p. 222-8, Feb 2007. ISSN 1542-6270. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17284510> >.
- <sup>65</sup> <http://www.targaxan.co.uk/targaxan/moa/#>.
- <sup>66</sup> ADACHI, J. A.; DUPONT, H. L. Rifaximin: a novel nonabsorbed rifamycin for gastrointestinal disorders. **Clin Infect Dis**, v. 42, n. 4, p. 541-7, Feb 2006. ISSN 1537-6591. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16421799> >.
- <sup>67</sup> BAJAJ, J. S. Review article: potential mechanisms of action of rifaximin in the management of hepatic encephalopathy and other complications of cirrhosis. **Aliment**

**Pharmacol Ther**, v. 43 Suppl 1, p. 11-26, Jan 2016. ISSN 1365-2036. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26618922> >.

<sup>68</sup> STERN, E. K.; BRENNER, D. M. Gut Microbiota-Based Therapies for Irritable Bowel Syndrome. **Clin Transl Gastroenterol**, v. 9, n. 2, p. e134, Feb 2018. ISSN 2155-384X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29446765> >.

<sup>69</sup> KOO, H. L.; DUPONT, H. L. Rifaximin: a unique gastrointestinal-selective antibiotic for enteric diseases. **Curr Opin Gastroenterol**, v. 26, n. 1, p. 17-25, Jan 2010. ISSN 1531-7056. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19881343> >.

<sup>70</sup> DUPONT, H. L. Review article: the antimicrobial effects of rifaximin on the gut microbiota. **Aliment Pharmacol Ther**, v. 43 Suppl 1, p. 3-10, Jan 2016. ISSN 1365-2036. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26618921> >.

<sup>71</sup> GANGARAPU, V. et al. Efficacy of rifaximin on circulating endotoxins and cytokines in patients with nonalcoholic fatty liver disease. **Eur J Gastroenterol Hepatol**, v. 27, n. 7, p. 840-5, Jul 2015. ISSN 1473-5687. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26043290> >.

<sup>72</sup> ABDEL-RAZIK, A. et al. Rifaximin in nonalcoholic fatty liver disease: hit multiple targets with a single shot. **Eur J Gastroenterol Hepatol**, v. 30, n. 10, p. 1237-1246, 10 2018. ISSN 1473-5687. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30096092> >.

<sup>73</sup> DAPITO, D. H. et al. Promotion of hepatocellular carcinoma by the intestinal microbiota and TLR4. **Cancer Cell**, v. 21, n. 4, p. 504-16, Apr 2012. ISSN 1878-3686. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22516259> >.

<sup>74</sup> YU, L. X.; SCHWABE, R. F. The gut microbiome and liver cancer: mechanisms and clinical translation. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**, v. 14, n. 9, p. 527-539, Sep 2017. ISSN 1759-5053. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28676707> >.

<sup>75</sup> MA, X. et al. Rifaximin is a gut-specific human pregnane X receptor activator. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 322, n. 1, p. 391-8, Jul 2007. ISSN 0022-3565. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17442842> >.

<sup>76</sup> JIN, Y. et al. Beneficial effects of Rifaximin in post-infectious irritable bowel syndrome mouse model beyond gut microbiota. **J Gastroenterol Hepatol**, v. 33, n. 2, p. 443-452, Feb 2018. ISSN 1440-1746. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28573746> >.

<sup>77</sup> ODENA, G. et al. Rifaximin, but not growth factor 1, reduces brain edema in cirrhotic rats. **World J Gastroenterol**, v. 18, n. 17, p. 2084-91, May 2012. ISSN 2219-2840. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22563196> >.

<sup>78</sup> TAMAOKI, S. et al. Development of an experimental rat model of hyperammonemic encephalopathy and evaluation of the effects of rifaximin. **Eur J Pharmacol**, v. 779, p. 168-76, May 2016. ISSN 1879-0712. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26980242> >.

<sup>79</sup> ZHU, Q. et al. Intestinal decontamination inhibits TLR4 dependent fibronectin-mediated cross-talk between stellate cells and endothelial cells in liver fibrosis in mice. **J Hepatol**, v. 56, n. 4, p. 893-9, Apr 2012. ISSN 1600-0641. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22173161> >.

<sup>80</sup> TAO, X.; WANG, N.; QIN, W. Gut Microbiota and Hepatocellular Carcinoma. **Gastrointest Tumors**, v. 2, n. 1, p. 33-40, May 2015. ISSN 2296-3774. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26673641> >.

<sup>81</sup> STEFANO, J. T. et al. Sorafenib prevents liver fibrosis in a non-alcoholic steatohepatitis (NASH) rodent model. **Braz J Med Biol Res**, v. 48, n. 5, p. 408-14, May 2015. ISSN 1414-431X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25714891> >.

## ANEXO

Composição da dieta hiperlipídica deficiente em colina:

# RHOSTER



Dieta Hiperlipídica M deficiente em Colina

RH19576

Perfil Calórico	%	% kcal
Proteína	15,03	13,99
Carboidrato	58,5	54,49
Gordura	15,04	31,52
Dieta 4,3kcal/g	***	***

\*Dieta Purificada para Indução de Obesidade e Esteatose Hepática.

\*Produzida em Pellet macio - pacotes de 1kg

\*Quantidade mínima 3kg

\*Prazo de Entrega: 15 dias úteis

### Ingredientes

Caseína Láctea, Amido de Milho, Amido Dextrinizado, Óleo de Soja, Gordura Animal, Colesterol Sigma, Celulose, Mix Mineral RH9502\*, Mix Vitaminico RH9503\*\*, Sacarose P.A., Tert-Butilhidroquinona (TBHQ) Sigma-Aldrich.

### Mais Informações

\*Mix Mineral AIN-93M

\*\*Mix Vitaminico AIN-93

\*\*\*Resultados calculados a partir da análise de um determinado lote fabricado.

Produzida em pellet ou pó

RHOSTER INDÚSTRIA E COMÉRCIO LTDA.

## APÊNDICE

Artigo científico produzido e publicado durante o período do mestrado:

Tonin Ferrari, J.; Ayres, R.; Ortiz Hammes, T.; Reverbel da Silveira, T.; & Uribe-Cruz, C. Experimental model of hepatic steatosis by fructose in adult zebrafish: A pilot study. *Clinical & Biomedical Research*, 38(2) (2018). Disponível em: <https://seer.ufrgs.br/hcpa/article/view/77997>.