

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR

MARCONE LOIOLA DOS SANTOS

**RECEPTOR INOSITOL 1,4,5-TRIFOSFATO DO TIPO 3 PARTICIPA DA
MANUTENÇÃO DO CARCINOMA HEPATOCELULAR HUMANO**

Belo Horizonte

2019

MARCONE LOIOLA DOS SANTOS

**RECEPTOR INOSITOL 1,4,5-TRIFOSFATO DO TIPO 3 PARTICIPA DA
MANUTENÇÃO DO CARCINOMA HEPATOCELULAR HUMANO**

Versão final

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular, do Departamento de Morfologia, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientadora: Dr^a Giselle Foureaux Heida

Co-orientadora: Dr^a Maria de Fátima Leite

Belo Horizonte

2019

043 Santos, Marcone Loiola dos.

Receptor inositol 1,4,5-trifosfato do tipo 3 participa da manutenção do carcinoma hepatocelular humano [manuscrito] / Marcone Loiola dos Santos. – 2019.

88 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Dra. Giselle Foureaux Heida. Co-orientadora: Dra. Maria de Fátima Leite.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular.

1. Fígado. 2. Câncer. 3. Mitose. 4. Apoptose. 5. Cálcio. I. Heida, Giselle Foureaux. II. Leite, Maria de Fátima. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 576



ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE

MARCONE LOIOLA DOS SANTOS

323/2019
entrada
2º/2017
2017719115

Às **quatorze horas** do dia **29 de julho de 2019**, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora da Dissertação, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: "**RECEPTOR INOSITOL 1,4,5-TRIFOSFATO DO TIPO 3 PARTICIPA DA MANUTENÇÃO DO CARCINOMA HEPATOCELULAR HUMANO**", requisito final para obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, **Dra. Giselle Foureaux Heida**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dra. Giselle Foureaux Heida	UFMG	Aprovado
Dra. Maria de Fátima Leite	UFMG	APROVADO
Dra. Fernanda de Oliveira Lemos	UFMG	APROVADO
Dr. Celso Martins Queiroz Júnior	UFMG	Aprovado
Dr. Cristiano Xavier Lima	UFMG	Aprovado

Pelas indicações, o candidato foi considerado: Aprovado
O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. **Belo Horizonte, 29 de julho de 2019.**

Dr.^a. Giselle Foureaux Heida (Orientadora) [Assinatura]

Dr.^a. Maria de Fátima Leite (Coorientadora) [Assinatura]

Dr.^a. Fernanda de Oliveira Lemos [Assinatura]

Dr. Celso Martins Queiroz Júnior [Assinatura]

Dr. Cristiano Xavier Lima [Assinatura]

Obs: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador

Prof. Erika Cristina Jorge
Coordenadora do Programa de Pós Graduação
em Biologia Celular ICB/UFMG

[Assinatura]

DEDICATÓRIA

“Eu sou o sonho mais insubmisso dos meus ancestrais”, vivo e ocupo lugares que a maioria deles nem sequer sabiam que existiam, devido à humanidade que lhes foi retirada e oportunidades negadas. Saindo do protocolo do discurso meritocrático, egoísta e irreal que me impõe em dizer que se cheguei até aqui foi porque eu mereci devido aos meus esforços e desejos solitários, dedico toda a minha trajetória - sendo um homem gay, negro, que alcançou a pós-graduação em uma instituição pública, em um dos países mais racistas, LGBTfóbicos e desiguais do mundo – a todos aqueles e aquelas que vieram antes de mim, lutaram, derramaram sangue e lágrimas e, com o grito e o desejo de justiça, abriram e pavimentaram os caminhos que hoje eu percalço com mais segurança e conhecimento dos meus direitos, complexidades e valores. Aos meus ancestrais, obrigado!

Dedico a todos os LGBTQIA+, a todas as bichas, gays afeminadas, travestis, transexuais, *drag queens* e lésbicas que no passado, tiveram a liberdade dos seus corpos e sexualidade demonizadas, perseguidas e encarceradas. A todos aqueles e aquelas que tiveram a coragem e a audácia de viverem sua essência, em um mundo tão pautado na hipocrisia e, assim, pintaram o arco-íris sobre o tom monocromático do preconceito, envaidecendo o orgulho que eu e toda uma nova geração de LGBTQIA+ ostenta. Dedico a todos os meus que perderam e ainda perdem a vida por serem autênticos, brilhantes e prezarem pela felicidade de serem quem são. Nós somos cores, vida e podemos ser o que quisermos. “Ninguém vai poder, querer nos dizer como amar”.

Dedico a todos os negros e negras que foram feitos órfãos da terra-mãe, África. A todos e todas que foram destituídos de humanidade, carinho, respeito, família e amor. Dedico a toda memória, costumes e cultura negra ancestral, que sofreram de apagamento e invisibilidade. A todos os sons, batuques, atabaques e orixás que, em sua natureza, edificam a força da resistência e servem de abrigo para a esperança. Dedico também, a todos os meus que foram privados de estudos e posses pelo Estado Brasileiro, por serem considerados o atraso da nação. Dedico, em especial, ao meu querido pai, Antonio Batista dos Santos, que me transferiu todo o legado ancestral que hoje se manifesta em mim. Pai, sua existência é a minha existência! Você é exemplo e orgulho para mim! Te amo!

Estamos em tempos muito difíceis na história do Brasil, como sempre, fazendo jus a seu histórico conservador e opressor. Mas a revolução não ocorrerá sem os artistas, sem os trabalhadores, sem os pretos, sem os LGBTQIA+ e sem todos que são marginalizados, acostumados a portas fechadas, nadando contra a maré. Então, temos experiência para tempos sombrios. Podemos ensinar e nos ajudar. Promovendo o compartilhamento das nossas culturas e vivências, seremos imbatíveis. A todos esses movimentos e vivências de luta, minha dedicatória e gratidão.

Avante! Axé!

AGRADECIMENTOS

A priori, agradeço a vida, ao universo, ao acaso, a natureza por me proporcionarem vir nesse mundo sendo quem eu sou. Naturalmente, minha imensa gratidão aos meus pais, Maria Lourdes Loiola Santos e Antonio Batista dos Santos, por serem quem são, depositando toneladas de amor, confiança, apoio e motivação em mim. Todas as conquistas em minha vida eu compartilho com vocês.

Amo vocês imensamente!

Aos pacientes participantes desse estudo, a minha satisfação e gratidão pela contribuição para a construção do futuro com melhores entendimentos e condições de tratamento. A participação de todos é imprescindível para o bem-estar das próximas gerações.

Agradeço à professora Maria de Fátima Leite, por ter aberto seu laboratório de maneira tão solícita para mim desde o primeiro momento e me proporcionado a chance de ter contato com um universo de conhecimento.

Obrigado à professora Giselle Foureaux por toda a disponibilidade em promover tal parceria. À professora Paula Vidigal, minha imensurável gratidão pela sua acessibilidade em compartilhar seus conhecimentos e experiências na edificação desse projeto e por ser essa pessoa tão leve e divertida de lidar e trabalhar.

Obrigado a minha amiga e colega de laboratório, Andressa França, pela orientação durante toda a elaboração deste projeto, compartilhando sempre de sua expertise e vontade de ensinar. Além disso, fica a gratidão por todos os momentos fraternos, divertidos, difíceis, de trabalho e afeto vividos nesse tempo de convivência.

Gratidão ao meu amigo e colega de laboratório, Antônio Carlos, por toda a paciência em suas considerações e auxílios, e o desejo de que tudo ocorresse bem. Somado a isso, obrigado por toda a convivência, conversas, festas, risadas e histórias compartilhadas.

Agradeço ao Rodrigo Machado, Fernanda Lemos, Jéssica Diniz, Alexandre Albert, Dabny Missiaggia e Sandhra Maria de Carvalho, pelo trabalho em equipe, por toda a disponibilidade para conversas, aprendizados, ajuda, desabafos e por fazerem parte desse momento.

À técnica de laboratório, Fernanda Césari, por toda a paciência no trabalho da elaboração de todas as lâminas utilizadas neste projeto, obrigado.

Meu agradecimento ao professor Marcelo Antonio Pascoal, por ter aberto as portas do seu laboratório para a realização da maioria dos experimentos aqui retratados, e pela contribuição intelectual na análise de uma parcela dos dados.

Carolina Dantas Brito, minha psicóloga, obrigado pelo profissionalismo e sensibilidade em todos nossos encontros, auxiliando na expansão da minha existência e colaborando para a elaboração de uma consciência mais autêntica e entendida, pautada em minhas complexidades e particularidades humanas.

Agradeço ao Hospital das Clínicas da UFMG por ter concedido acesso ao seu acervo de amostras e dados clínicos.

Aos professores do Departamento de Morfologia, obrigado por compartilhar o conhecimento de vocês e contribuírem para minha formação.

Por fim, agradeço a todos e todas que de alguma forma, direta ou indiretamente, contribuíram para meu crescimento pessoal e/ou profissional nos últimos dois anos.

“Amar é uma constante em mim (...)

O meu amor não está limitado ao tempo

E ao espaço

Tem um sentido estético

É eterno

É mais que um beijo

É mais que uma cópula

É mais que um desejo

É uma vontade permanente de amar

Foi o canto da minha adolescência

Foi a música da minha felicidade

É o ritmo da minha velhice.”

Solano Trindade

RESUMO

O carcinoma hepatocelular (CHC) é responsável por mais de 90% das neoplasias malignas primárias do fígado. Doenças hepáticas crônicas predisõem ao CHC, promovendo o desenvolvimento de fibrose, cirrose e alterações na transdução de sinal intracelular. Várias funções hepáticas são reguladas pelo cálcio intracelular (Ca^{2+}), incluindo proliferação e morte celular. O receptor de 1,4,5-trifosfato de inositol (ITPR) é o canal exclusivo de liberação intracelular de Ca^{2+} no fígado. À luz do fato de que a expressão de ITPR3, uma isoforma ausente em hepatócitos normais, é um evento comum na patogênese e desenvolvimento do CHC, nossa hipótese é que os tumores estabelecidos mantêm sua expressão, contribuindo para manutenção. Aqui, foram avaliadas 53 amostras de fígado de CHC e dados clínicos de pacientes afetados por três diferentes etiologias: vírus da hepatite C (HCV), doença hepática alcoólica (DHA) e cirrose criptogênica (CC). Hematoxilina e Eosina (H & E), para contagem de figuras mitóticas, e imuno-histoquímica para coloração de ITPR3 e ssDNA, foram utilizados para avaliar a intensidade da expressão deste canal de cálcio e perfil apoptótico, respectivamente. A correlação entre ITPR3 e parâmetros clínicos foi avaliada comparando as médias da intensidade da coloração ITPR3 no tumor e no parênquima cirrótico com os parâmetros clínicos e porcentagem de apoptose ou mitose. Os resultados mostraram que a intensidade da coloração de ITPR3 se correlaciona inversamente com os índices mitóticos e com a porcentagem de apoptose em todas as etiologias de CHC analisadas. Além disso, o índice mitótico correlacionou-se significativamente com a apoptose. Juntos, esses dados mostram um evento intracelular compensatório subjacente à hepatocarcinogênese, que envolve ITPR3, onde mais mortes devido à apoptose levam à proliferação e manutenção do tumor. Portanto, concluímos que a expressão de ITPR3 é um evento comum em todo o processo de hepatocarcinogênese ao estabelecimento de tumores, influenciando a proliferação e a morte celular por apoptose.

Palavras-chave: Câncer, mitose, apoptose, cálcio, fígado.

ABSTRACT

Hepatocellular carcinoma (HCC) accounts more than 90% of primary malignant neoplasms of the liver. Chronic liver diseases predispose to HCC, promoting the development of fibrosis, cirrhosis and changes in intracellular signal transduction. Several liver functions are regulated by the intracellular calcium (Ca^{2+}), including proliferation and cell death. Inositol 1,4,5-triphosphate receptor (ITPR) is the exclusive channel of intracellular Ca^{2+} release in the liver. In light of the fact that ITPR3 expression, an isoform absent in normal hepatocytes, is a common event in pathogenesis and development of HCC, our hypothesis is that established tumors maintain its expression, functioning in its progression. Here, 53 HCC liver samples and clinical data from patients affected by three different etiologies were used: hepatitis C virus (HCV), alcoholic liver disease (ALD) and cryptogenic cirrhosis (CC). Hematoxylin and Eosin (H&E), for counting mitotic figures, and immunohistochemistry for staining ITPR3 and ssDNA, were used to evaluate the intensity of this calcium channel expression and apoptotic profile, respectively. The correlation between ITPR3 and clinical parameters was evaluated by comparing the means of the ITPR3-staining intensity in the tumor and in the cirrhotic parenchyma with the clinical parameters, and percentage of apoptosis or mitosis. The results showed that the intensity of ITPR3 staining inversely correlates with the mitotic indexes, and with percentage of apoptosis in all HCC etiologies analyzed. In addition, the mitotic index significantly correlated with apoptosis. Together, these data show a compensatory intracellular event underlying hepatocarcinogenesis which involves ITPR3, where more deaths due to apoptosis lead to proliferation and tumor maintenance. Therefore, we conclude that ITPR3 expression is a common event throughout the process of hepatocarcinogenesis to tumor establishment, influencing proliferation and cell death by apoptosis.

Keywords: Cancer, mitosis, apoptosis, calcium, liver.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Maquinaria molecular para o estabelecimento da sinalização de Ca^{2+} em hepatócitos.....	32
Figura 2 – Análises de bioinformática em TPM (<i>Transcript Per Milion</i>).....	52
Figura 3 – Imagens representativas de marcação de ITPR3 em espécimes coletados na Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).....	57
Figura 4 – Gráfico representativo de correlação entre marcação de ITPR3 e índice mitótico.....	59
Figura 5 - Análise de correlação entre a intensidade de marcação ITPR3 e o percentual apoptótico (ssDNA).....	60
Figura 6 – Análise de correlação entre índice mitótico e porcentagem de apoptose.....	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Disposição das etiologias subjacentes das amostras de CHC analisadas.....	47
Tabela 2 – Dados clínicos dos pacientes com CHC.....	48
Tabela 3 – Características anatomopatológicas dos pacientes com CHC.....	50
Tabela 4 – Classificação do padrão histológico dos pacientes com CHC.....	51
Tabela 5 – Correlação entre a intensidade de marcação de ITPR3 e dados clínicos.....	58
Tabela 6 – Correlação entre a intensidade de marcação de ITPR3 e parâmetros anatomopatológicos.....	61

LISTA DE SIGLAS

AA: Acetaldeído
ALDH: Aldeído desidrogenase
ADH: Desidrogenase alcoólica
CHC: Carcinoma Hepatocelular
CC: Cirrose criptogênica
CYP2E1: Citocromo P450 2E1
CGA: Campo de grande aumento
DHA: Doença hepática alcoólica
DHT: Doença Hepática Terminal
DNA: Ácido desoxirribonucleico
GPCR: Receptores acoplados à proteína G
GDP: Difosfato de guanosina
GTP: Trifosfato de guanosina
HCV: Infecção pelo vírus da hepatite C
HGDN: Nódulo displásico de alto grau
ITPR: Receptor inositol 1,4,5-trifosfato
InsP3: Inositol 1,4,5-trifosfato
LPS: Lipopolissacarídeo
LGDN: Nódulo displásico de baixo grau
MELD: Modelo para doença hepática terminal
NAFLD: Non-alcoholic fatty liver disease
NASH: Esteato-hepatite não alcoólica
OMS: Organização Mundial de Saúde
PLC: Fosfolipase C
RTK: Receptores tirosinas quinases
RM: Ressonância magnética
RNA: Ácido ribonucleico
SNP: Polimorfismo de nucleotídeo único
SNT: Sistema nacional de transplante
SVR: Resposta virológica sustentada
TC: Tomografia computadorizada
TH: Transplante hepático

US: Ultrasonografia

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO	14
2 - OBJETIVOS	16
2.1- Objetivo geral	16
2.2- Objetivos específicos	16
3 – REFERENCIAL TEÓRICO	17
3.1 - Carcinoma Hepatocelular.....	17
3.2 - Sinalização de cálcio no fígado.....	27
3.3 - Hepatite C.....	32
3.4 - Doença Hepática Alcoólica.....	36
3.5 - Cirrose Criptogênica.....	40
4 - METODOLOGIA	41
4.1 – Amostras	41
4.2 - Imunohistoquímica das amostras de fígado com CHC	41
4.3 - Análise da intensidade de expressão de ITPR3 e do índice de marcação de ssDNA	42
4.4 - Avaliação do índice mitótico	43
4.5 - Análise em bioinformática	43
4.6 - Análises estatísticas	44
5 - RESULTADOS	45
5.1 - Caracterização da amostra	45
5.2 - Análise de bioinformática	49
5.3 - Análise imuno-histoquímica	50
5.4 - Correlação da intensidade de marcação de ITPR3 com os parâmetros clínicos numéricos	55
5.5 - Correlação da intensidade de marcação de ITPR3 e índice mitótico..	56
5.6 - Correlação da intensidade de marcação de ITPR3 e núcleos positivos para ssDNA	57
5.7 - Correlação do índice mitótico e percentual apoptótico	58
6 - DISCUSSÃO	61
7 - CONCLUSÃO	69
REFERÊNCIAS	70

1 - INTRODUÇÃO

O carcinoma hepatocelular (CHC), hepatocarcinoma ou hepatoma, é responsável por mais de 90% das neoplasias malignas primárias que acometem o fígado (KUMAR, *et al.*, 2014). Ela é a sexta doença maligna mais frequentemente diagnosticada no mundo e tem apresentado importante aumento de sua incidência, tornando-se a quarta causa mais comum de mortalidade relacionada ao câncer (GLOBOCAN, 2018). O CHC é o resultado da transformação maligna de hepatócitos e os principais fatores de risco são a ingestão excessiva de álcool, infecção pelos vírus da hepatite B (HBV) ou hepatite C (HCV), síndromes metabólicas genéticas (EL-SERAG & RUDOLPH, 2007), esteato-hepatite não alcoólica, hepatite autoimune, cirrose biliar primária e exposição à carcinógenos ambientais como a aflatoxina B (THOMAS; ABBRUZZESE, 2005). Embora sejam etiologias diferentes, todas estas doenças tem em comum o desenvolvimento de fibrose, cirrose e consequente alteração na transdução de sinais intracelulares (WANG *et al.*, 2014).

O íon cálcio (Ca^{2+}) é um poderoso segundo mensageiro intracelular, que participa da secreção biliar, expressão gênica, metabolismo energético, controle do ciclo celular e da regeneração hepática (AMAYA *et al.*, 2013; CRUZ *et al.*, 2010; GOMES *et al.*, 2008). O receptor inositol 1,4,5- trifosfato (ITPR) é o canal exclusivo de liberação de cálcio intracelular expresso no fígado, localizado no retículo endoplasmático dos hepatócitos (BERRIDGE *et al.*, 2000), e também no retículo nucleoplasmático regulando a sinalização de Ca^{2+} no núcleo (ECHEVARRIA *et al.*, 2003). Três isoformas de ITPR são descritas em humanos e roedores (PATEL *et al.*, 1999; WOJCIKIEWICZ, 1995). Essas isoformas, possuem variação de expressão, distribuição subcelular e propriedades biofísicas (YULE *et al.*, 1997). Em hepatócitos, ITPR do tipo 1 (ITPR1) e 2 (ITPR2) são as isoformas predominantes durante a homeostase (CRUZ *et al.*, 2010; HIRATA *et al.*, 2002).

O ITPR3 não é encontrado em hepatócitos em condições normais (DUFOR *et al.*, 1999). Porém, a linhagem imortalizada de hepatocarcinoma (HepG2) apresenta expressão significativa de ITPR3 (LEITE *et al.*, 2003). Colônócitos normais apresentam o mesmo perfil de expressão e distribuição subcelular das isoformas de ITPR que os hepatócitos, mas o carcinoma colorretal apresenta a expressão de ITPR3 no limite invasivo do tumor, e isso confere à doença uma maior agressividade, menor susceptibilidade à apoptose e maior capacidade proliferativa (SHIBAO *et al.*, 2010). Já em doenças hepáticas gordurosas não alcoólicas (NAFLD), observa-se a diminuição da expressão de ITPR2 em hepatócitos

(KHAMPHAYA *et al.*, 2018). Além disso, o aparecimento do ITPR3 é conhecido como um evento comum no desenvolvimento do CHC, com papel importante na patogênese (GUERRA, MATEUS *et al.*, 2019). Em conjunto, esses dados mostram que determinadas condições patológicas podem modular o perfil de expressão e a localização subcelular destes receptores.

Portanto, a proposta deste estudo foi examinar o perfil de expressão da isoforma 3 do ITPR (ITPR3) em amostras de CHCs humanos estabelecidos, explantados e decorrentes de infecção por vírus da hepatite C (HCV), doença hepática alcoólica (DHA) e cirrose criptogênica (CC) e correlacionar a expressão de ITPR3 com parâmetros clínicos dos pacientes, visto que a expressão e distribuição subcelular do ITPR é essencial para determinar a perfil de efeitos dos sinais de Ca^{2+} nos epitélios (HERNANDEZ *et al.*, 2007; MINAGAWA *et al.*, 2007).

2 - OBJETIVOS

2.1 - Objetivo geral

- Caracterizar o perfil de expressão de ITPR3 em amostras de CHCs humanos associados à cirrose hepática oriundas de infecção pelo vírus da hepatite C, doença hepática alcoólica e cirrose criptogênica.

2.2 - Objetivos específicos

- Comparar a expressão de ITPR3 em amostras de CHCs entre as três hepatopatias analisadas;
- Investigar a associação entre os achados moleculares referentes ao ITPR3 com os parâmetros clínicos dos pacientes com CHC;
- Investigar associação entre os achados moleculares referentes ao ITPR3 e as características anatomohistopatológicas do tumor.

3 - REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 - Carcinoma Hepatocelular

O carcinoma hepatocelular (CHC), atualmente, é a sexta doença maligna mais frequentemente diagnosticada no mundo, com cerca de 841.080 novos casos diagnosticados por ano, e apresenta importante aumento de sua incidência, tornando-se a quarta causa mais comum de mortalidade relacionada ao câncer, com uma estimativa de 782.000 novas mortes até o final do ano de 2018 (GLOBOCAN, 2018). Segundo o Observatório Global do Câncer da Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2040 esses números podem ser ainda mais drásticos, com uma estimativa de incidência atingindo 1.361.836 novos casos e 1.284.252 mortes por ano (OMS, 2018).

Assim como as demais malignidades, o CHC surge quando há mutações em genes de uma célula que passa a ter capacidade proliferativa indiscriminada (GOMES *et al.*, 2013). As doenças hepáticas crônicas ainda são as principais causas que predispoem ao CHC, incluindo infecção viral crônica pelo vírus da hepatite B (HBV) ou C (HCV), síndromes metabólicas genéticas (EL-SERAG *et al.*, 2007), esteato-hepatite não alcoólica, hepatite autoimune, cirrose biliar primária e exposição a carcinógenos ambientais como a aflatoxina B (THOMAS & ABBRUZZESE, 2005). Embora sejam etiologias diferentes, todas essas doenças têm como intersecção o desenvolvimento de fibrose, cirrose e consequente alteração na transdução de sinais (WANG *et al.*, 2014).

A fibrose é caracterizada pelo processo normal de cura de lesões hepáticas, resultando em uma continuação anormal da fibrogênese, dando origem ao encapsulamento ou a substituição do tecido lesionado por uma cicatriz constituída por colágeno (SCHUPPAN & AFDHAL, 2008). A progressão da fibrose apresenta taxas variáveis dependendo da causa da doença hepática, fatores ambientais e do indivíduo (SCHIFF; MADDREY; REDDY, 2017). A cirrose é o estadiamento avançado da fibrose hepática que é acompanhada pela deturpação da vascularização hepática. Tal alteração leva ao desvio do suprimento portal e do sangue arterial para as veias centrais, prejudicando a troca entre os sinusóides e o parênquima hepático adjacente (SCHUPPAN & AFDHAL, 2008; FRIEDMAN & SCHIANO, 2012). Histologicamente, a cirrose é caracterizada por septos fibróticos vascularizados que ligam os tratos portais entre si e com as veias centrais, formando ilhas de hepatócitos delimitadas em nódulos que são desprovidos de uma veia central. Esse desarranjo tecidual promove consequências clínicas como o comprometimento da função dos hepatócitos, aumento da

resistência intra-hepática (hipertensão portal) e o desenvolvimento de CHC (SCHUPPAN & AFDHAL, 2008). O conjunto desses eventos reflete um cenário do mundo ocidental, onde 90% dos casos de CHC surgem em associação com a cirrose (FORNER *et al.*, 2018). A inflamação crônica e a regeneração de hepatócitos que ocorrem na cirrose ocasionam danos ao DNA (ácido desoxirribonucleico), potencializando as chances de alterações genéticas e epigenéticas relacionadas à hepatocarcinogênese (HO *et al.*, 2016; SHIRAHARA *et al.*, 2013).

A instabilidade genômica é um evento chave em cânceres humanos, incluindo o CHC, podendo ocasionar ganho ou perda em cromossomos de diferentes extensões ou mutações somáticas no genoma (HO *et al.*, 2016). Além disso, polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) foram elucidados como contribuintes para o risco de CHC. SNPs influenciam o risco de CHC em diversas faces da doença, incluindo predisposição a fatores de risco (por exemplo, hepatite viral, ingestão de álcool ou obesidade), à gravidade da hepatopatia crônica e sua evolução para cirrose, ou para a malignidade e tumorigênese (NAHON *et al.*, 2012). A maioria dos polimorfismos relacionados ao desenvolvimento do CHC na hepatopatia crônica está associada a fatores de risco específicos, ou seja, há íntima relação entre a natureza da exposição a agentes carcinogênicos, o contexto genético e o mecanismo de transformação/proliferação de hepatócitos (BRESSAC *et al.*, 1991). Há um evento primordial durante a transformação maligna da cirrose que, possivelmente, envolve hepatócitos danificados envolvidos por fibrose e vascularizados principalmente pelo sistema porta que os transforma em células potencialmente proliferativas, vascularizadas por neovasos arteriais com capacidade invasiva e metastática (FARAZI & DEPINHO, 2006). Este processo envolve múltiplas etapas, por uma sequência de lesões: cirrose/nódulos displásicos de baixo grau (LGDN)/ nódulos displásicos de alto grau (HGDN)/ CHC inicial/ CHC progressivo/ CHC avançado (PARTY *et al.*, 2009).

Diversas evidências destacam a importância do telômero e da telomerase na cirrose e na tumorigênese (SATYANARAYANA; MANNIS; RUDOLPH, 2004). Os telômeros são sequências de DNA que protegem as extremidades dos cromossomos onde se localizam (CALADO & YOUNG, 2009). Durante a divisão celular, tais sequências encurtam, levando à senescência e apoptose celular (FARAZI & DEPINHO, 2006). A enzima telomerase é primordial para a síntese de telômeros e é constituída de TERC (Componente de RNA da Telomerase), o molde de RNA (ácido ribonucleico), e de TERT (Transcriptase Reversa da Telomerase), a porção enzimática limitante do complexo (GUNES & RUDOLPH, 2013). Em tecido hepático humano, a telomerase não é expressa em hepatócitos maduros. Visto que o tecido cirrótico apresenta encurtamento dos telômeros com a consequente senescência

replicativa, mutações em TERT, promovendo a diminuição da atividade da telomerase, estão associadas a maior probabilidade de cirrose (HARTMANN *et al.*, 2011). Em humanos, a reativação da telomerase ocorre em mais de 90% dos casos de CHC devido a mutações somáticas (54%-60%), amplificações de TERT (5%-6%) (TOTOKI *et al.*, 2014) ou inserção do HBV em TERT (SUNG *et al.*, 2012). Esses eventos mostram que a mutação do promotor TERT é a alteração genética somática primordial durante a sequência de transformação (ZUCMAN-ROSSI *et al.*, 2015).

O CHC desenvolve-se gradativamente, sendo observado no fígado como uma formação nodular. Quando associado à cirrose hepática, geralmente desenvolve-se a partir de um nódulo regenerativo hepatocitário, formando um pequeno foco displásico monoclonal milimétrico que se expande, acumulando mutações que, então, levam a formação da massa tumoral (CHEDID *et al.*, 2017; ROSKAMS & KOJIRO, 2010). Essa massa pode se apresentar como um tumor unifocal, multifocal ou difusamente infiltrativo (KUMAR *et al.*, 2014). Todas as variações apresentam grande potencial de invasão vascular (CHEDID *et al.*, 2017).

Histologicamente, o CHC pode apresentar diversos subtipos, morfológicamente heterogêneos (EDMONDSON & STEINER, 1954; SCHLAGETER *et al.*, 2014). No geral, as células tumorais de CHC proliferam em cordões de diferentes espessuras, sendo recobertos por células endoteliais, mas, outras disposições arquitetônicas são observadas associadas a uma variabilidade citológica (MACSWEEN *et al.*, 2011). Uma diversidade de subtipos de CHC especificados por diferentes características histológicas e de fácil reconhecimento foram afigurados (SALOMAO *et al.*, 2010). Os principais subtipos histológicos do CHC são trabecular (70%), sólido (20%), pseudo-glandular (10%) e macrotrabecular (1%) (MARTINS-FILHO *et al.*, 2017). Essa estratificação histológica inclui também o carcinoma fibrolamelar (CRAIG; PETERS; OMATA, 1980; KLEIN *et al.*, 2005), linfoepitelioma (GOLDIE *et al.*, 1995), esteatohepatite (SALOMAO *et al.*, 2010), hepatocolangiocarcinoma (TORBENSON, 2017) e o subtipo com marcação para células-tronco/progenitoras (FATOUROU *et al.*, 2015), todos com importância prognóstica independente. Investigações recentes sublinharam características clínicas, biológicas e moleculares diversas relacionadas a esses fenótipos e subtipos, com implicações clínicas legítimas (CALDERARO *et al.*, 2017; TAN *et al.*, 2017).

O subtipo macrotrabecular-maciço foi recentemente descrito, definido pela organização macrotrabecular (>50%), apresentando mais de seis células de espessura. Esse fenótipo foi relacionado a traços de pior prognóstico, como tamanho do tumor, nível de AFP, nódulos satélites e invasão vascular e, sozinho, foi eleito um fator preditivo independente de

recorrência tumoral. Os dados prognósticos advindos dos subtipos histológicos reforçam as potenciais vantagens da biopsia para reiterar sua importância (ZIOL *et al.*, 2018).

Essa gama fenotípica tumoral envolve a ativação de diferentes vias oncogênicas. Um estudo recente sequenciou o genoma de uma série de 343 tumores de pacientes acometidos por diversas hepatopatias subjacentes (CALDERARO *et al.*, 2017). Foi observado que mutações no CTNNB1 estiveram associadas à manutenção de marcadores de diferenciação e função hepatocelular, baixa expressão de AFP e baixa capacidade proliferativa em contraste com o CHC não mutado. Somado a isso, também foi constatada uma importante deturpação na expressão de transportadores de sais biliares, auxiliando o estabelecimento de um fenótipo colestático nesses tumores. No mesmo trabalho, os experimentos mostraram a associação de mutações no TP53 com o maximização da proliferação celular, transição epitélio-mesenquima e ativação angiogênica. Mutações em TP53 foram significativamente associadas com o subtipo macrotrabecular-macioso, com características histológicas agressivas. Esses resultados reforçam a existência da agregação de características clínicas, genéticas e patológicas na classificação dos subtipos histológicos do CHC (CALDERARO *et al.*, 2017).

O sistema de classificação das variações estruturais do CHC feita por Edmondson e Steiner (1964) é o mais utilizado dentro da rotina clínica, sendo um dos parâmetros para o prognóstico da doença. Tal classificação possui quatro graus, variando de acordo com o grau de diferenciação das características celulares, como tamanho do núcleo, formato da célula, relação núcleo-citoplasma e presença de hipercromasia (EDMONDSON & STEINER, 1954; SCHLAGETER *et al.*, 2014):

- Grau I: no geral, as células apresentam distribuição trabecular, organizadas em fileiras ou conjuntas, em forma de haste, com citoplasma abundante e atipias nucleares mínimas, assemelhando-se, portanto, ao parênquima hepático normal; geralmente é encontrado em tumores nodulares de células pequenas;
- Grau II: há pleomorfismo nuclear de maior intensidade e hipercromasia, nucléolos evidentes, citoplasma abundante e eosinofílico;
- Grau III: atipias nucleares mais evidentes e acompanhadas de angulação significativa;
- Grau IV: há pleomorfismo intenso e presença de células gigantes.

Tais características podem diversificar entre pacientes e até mesmo entre diferentes nódulos presentes em um único paciente. Isso é decorrente devido aos inúmeros fatores que influenciaram para o desenvolvimento tumoral, como os retratados anteriormente (SCHLAGETER *et al.*, 2014).

Geralmente, a minoria dos casos de CHC está apta a alguma intervenção cirúrgica com possibilidade de cura. Quando não há nenhum tipo de tratamento sobre o tumor, ele costuma crescer progressivamente, originando uma massa de células malignas que minimiza a função hepática e gera metástases intra e extra-hepáticas (KUMAR *et al.*, 2014). Nesse contexto, o paciente costuma falecer em um tempo médio de 10 meses, devido à caquexia, hemorragia de varizes esofágicas ou gástricas, insuficiência hepática ou, com menos frequência, devido à ruptura do tumor com hemoperitônio (KUMAR *et al.*, 2014). Isso evidencia a importância do diagnóstico precoce, aumentando a gama de opções de tratamento que podem levar a melhores resultados (BALOGH *et al.*, 2016).

Os métodos avaliativos para o escaneamento do CHC abrangem testes radiográficos e marcadores sorológicos (BALOGH *et al.*, 2016). Pacientes que estão dentro de um quadro de risco para CHC devem ser submetidos a rastreamento regular. Essa rotina possibilita o aumento da sobrevida para pacientes com cirrose hepática (BRUIX *et al.*, 2016). A ultrassonografia (US) não compreende o uso de radiações ionizantes, sendo amplamente disponível e de simples aplicação (KEE & LU, 2017). O exame possui uma sensibilidade que varia de 60-80%, e especificidade superior a 90% em pacientes cirróticos. Devido a isso, essa metodologia é adotada para rastreamento de CHC, geralmente com uma rotina a cada seis meses (CLAVIEN *et al.*, 2012; GALLE *et al.*, 2018).

A análise de α -fetoproteína (AFP), um antígeno oncofetal que tem como principal função a regulação do metabolismo de ácidos graxos em células adultas fetais e em proliferação (AGNI, 2017), analisada juntamente com US, tem se apresentado como um dos métodos mais amplamente utilizados para o acompanhamento do CHC nas últimas décadas. Em conjunto, os exames aumentam a sensibilidade para detecção do CHC para 90-99% com aceitável decréscimo da especificidade (CHANG *et al.*, 2015). A detecção de formação vascular deturpada, cirrose, múltiplos nódulos, baixo grau histológico, marcadores de função hepática elevados e altos níveis de AFP contribuem para um quadro de pior prognóstico (TSOULFAS *et al.*, 2012). O limite normal frequentemente adotado é de 20 ng/mL, pois níveis de AFP em indivíduos saudáveis raramente excedem essa concentração (BALOGH *et al.*, 2016). Uma sensibilidade minimizada de AFP acontece em lesões pequenas de CHC, estando aumentada em contexto de hepatite aguda, cirrose, colite, tumores de células

germinativas e colangiocarcinoma intra-hepático. Concentrações de AFP acima de 400 ng/mL podem ser categóricas no diagnóstico de CHC (MASUZAKI & OMATA, 2011), sendo que ao ultrapassar 1000 ng/mL há aumento de recorrência e diminuição da sobrevida (DUVOUX *et al.*, 2012; LEWIN *et al.*, 2015). Essa abordagem em vigilância do CHC já foi demonstrada como sendo custo-efetiva, independente da incidência da doença (LIN *et al.*, 2004). O fator de crescimento endotelial (VEGF) e a angiotensina 2 (Ang2) também podem ser biomarcadores com valores de prognóstico independentes em tumores avançados não tratados (LLOVET *et al.*, 2012).

A tomografia computadorizada (TC) é o método usado para diagnóstico definitivo com contraste endovenoso e/ou ressonância magnética (RM). TC realizada através de multidetectores apresenta sensibilidade em torno de 68% e especificidade de 93% quando comparada ao exame anátomo-patológico. A RM se mostra similar, com sensibilidade de 81% e especificidade de 85% (COLLI *et al.*, 2006), podendo potencializar sua eficácia quando são utilizados meios de contraste hepatoespecíficos (CHEDID *et al.*, 2017). Porém, alguns nódulos entre 1 a 2 cm podem se mostrar indeterminados nos exames de imagem. No entanto, estudos mostram que uma proporção significativa desses não apresenta histologia maligna e, portanto, é improvável que progrida para CHC durante o acompanhamento por imagem. Desta forma, a possibilidade de um exame por biópsia para confirmação do diagnóstico de todos os nódulos indeterminados seria consideravelmente desnecessária (HEIMBACH *et al.*, 2018). Em especial, devido aos riscos de sangramento, hemoperitônio, disseminação de células tumorais e a possibilidade de que a amostra seja negativa devido à falha na obtenção do tecido representativo do nódulo (CHEDID *et al.*, 2017; HEIMBACH *et al.*, 2018). Outras alternativas de diagnóstico nesses casos incluem imagens de acompanhamento, exames de imagens com uma modalidade alternativa ou agente de contraste e o direcionamento para um centro de especialidade (HEIMBACH *et al.*, 2018). Quando o diagnóstico é positivo para CHC, a verificação por TC de tórax é indicada como exame adicional de estadiamento (CLAVIEN *et al.*, 2012). Pacientes identificados com CHC em estágio avançado, possuindo invasão macrovascular e/ou metástases, devem ter uma abordagem de prognóstico e de tratamento dependente da severidade da cirrose, extensão da invasão vascular e metástases e do status de desempenho do paciente (HEIMBACH *et al.*, 2018). Aqueles que apresentam cirrose hepática e CHC sem lesões metastáticas distantes e linfonodais locais, assim como cirróticos com hepatopatia crônica em estágio avançado, poderão ser indicados ao transplante hepático (TH) (CHEDID *et al.*, 2017).

O CHC apresenta-se como única indicação geralmente aceita para a realização de transplante de órgãos sólidos em câncer. Além disso, o TH como método curativo do CHC representa um protótipo para outros contextos indicativos de transplante em diversas condições de câncer que afetam o fígado (MAZZAFERRO *et al.*, 2018). A perspectiva de sobrevida em cinco anos para aqueles que passam pelo TH para CHC e que estão dentro dos critérios convencionais de Milão (tumor único de até 5cm, ou até 3 nódulos de até 3cm cada, sem invasão vascular) (BENJAMIN *et al.*, 2018; MAZZAFERRO *et al.*, 1996; SÁ *et al.*, 2016; TORRES *et al.*, 2016) está presente em 65-80% dos casos, apresentando uma vantagem de sobrevivência quando comparados aos pacientes que estão além dos limites dos critérios (MAZZAFERRO *et al.*, 2011). O Critério de Milão é a diretriz mais confiável para o transplante em caso de CHC, tanto em países ocidentais quanto nos orientais (GALLE *et al.*, 2018). No Brasil, não há a adoção da prática de TH caso o paciente com CHC esteja fora desses critérios (CHEDID *et al.*, 2017). No entanto, há evidências de que alguns pacientes, que excedem os parâmetros dos Critérios de Milão, também possam ser contemplados com o transplante (MAZZAFERRO *et al.*, 2011).

O modelo para doença hepática terminal (MELD) foi adotado no Brasil em 2006 (FERREIRA *et al.*, 2015; MS, 2009). O escore MELD mínimo requerido para a entrada na lista de espera de TH para pacientes adultos é de 11 pontos, mas a maioria dos centros geralmente colocam pacientes para lista de espera quando os mesmos atingem escores MELD acima de 15 pontos (BITTENCOURT *et al.*, 2016). Essa política de alocação de fígado diminuiu o tempo de espera para o TH, redução na mortalidade e aumento das taxas THs realizados em adultos para CHC (FREEMAN *et al.*, 2004), inclusive no Brasil (SALVALAGGIO *et al.*, 2012). Além disso, não foi observado nenhum declínio nas taxas de sobrevida pós-transplante (CHAIB *et al.*, 2014). Mesmo com as alterações nos dados demográficos de doadores no Brasil, não foi observado alterações nos resultados pós-transplante após a implementação de MELD. Portanto, adoção do MELD apresentou sucesso para alocação de TH em países em desenvolvimento (SALVALAGGIO *et al.*, 2012).

Estudos já confirmaram que o TH é a terapia com maior potencialidade de curar o CHC (MURALI *et al.*, 2017). Sendo assim, o TH deve ser considerado sempre que possível, exceto quando a idade e comorbidades inviabilizarem a metodologia cirúrgica (GALLE *et al.*, 2018). No entanto, a escassez de órgãos doados se apresenta como um fator limitante importante do TH, juntamente com a ausência de um delineamento de estratégias eficazes para a distribuição equilibrada dos órgãos disponíveis entre as indicações de câncer e não-câncer (GALLE *et al.*, 2018). Pacientes candidatos a TH com CHC na fila de espera, se não

tratados, estão expostos ao risco de progressão e aumento da severidade da doença enquanto esperam, potencializando o risco de mortalidade no momento pós-transplante (PARIKH *et al.*, 2015). Para minimizar o impacto, tratamentos loco-regionais demonstram vantagens importantes na redução dos riscos de exclusão do paciente da lista de espera devido a progressão tumoral (YAO *et al.*, 2015). Entre esses, diversas metodologias químicas e térmicas de tratamento de tumores foram desenvolvidas nas últimas décadas (LENCIONI & CROCKETT, 2012). A injeção percutânea de etanol (IPE) foi a técnica inicialmente utilizada, promovendo necrose coagulativa devido a desidratação celular da lesão, desnaturação proteica e obliteração química de pequenos vasos tumorais. Em seguida, terapias térmicas ablativas despontaram, classificadas em hipertérmicas (aquecendo o tecido a 60°C-100°C) – abrangendo ablação por radiofrequência, por microondas e a laser – e crioablação (congelamento do tecido a -20°C e -60°C). A maioria dos procedimentos são realizados através de laparoscopia, e alguns ainda estão sob investigações para obter evidências robustas da aplicação sobre o manejo do CHC (GALLE *et al.*, 2018).

3.2 Transplante Hepático no Brasil

Em 2016, o Brasil ocupou a segunda posição mundial em números de TH, com cerca de 1.880 transplantes realizados (RBT, 2016). E esse número aumentou, visto que até setembro de 2018, foram contabilizados 2.148 TH no Brasil (RBT, 2018). Porém, por ser um país de dimensões continentais, com extremas disparidades regionais - como índices demográficos e socioeconômicos e acesso a prestação de serviços de saúde – há grandes impactos na realização de TH. Isso reflete no fato onde as regiões Sul e Sudeste geralmente mostram as maiores taxas de doação e melhor aquisição de órgãos, principalmente em função da maior educação e medidas de conscientização pública, além da maior e melhor disponibilidade de recursos. Sendo assim, o acesso à TH fica facilitado, pois a maioria dos grandes centros de TH localiza-se em regiões mais ricas e populosas do país (BITTENCOURT *et al.*, 2016). Por outro lado, tal questão, contribui com a problemática de que alguns estados brasileiros, o tempo de espera por um fígado pode exceder a um ano (SALVALAGGIO *et al.*, 2012).

A taxa global de TH no Brasil é de 10,5 por milhão de habitantes (pmh) (RBT, 2018), com uma ampla variação de 0,8 pmh no Norte para 18,3 pmh no Sul (RBT, 2017). Isso é devido a grande concentração de centros de transplante nas regiões Sul e Sudeste, visto que o Brasil possui 69 centros atuantes em TH distribuídos em 14 estados (RBT, 2018), com 38%

deles situados em São Paulo e apenas 21% localizados fora das regiões Sul e Sudeste (RBT, 2016). Para diminuir tal defasagem, é preciso uma dedicação para a implementação de centros de TH nas regiões mais pobres do Norte, Nordeste e Centro-Oeste, melhorar a atenção primária, o diagnóstico de doenças hepáticas terminais (DHT) e os sistemas de referência para TH. Porém, o subfinanciamento do sistema se mostra como grande entrave (BITTENCOURT *et al.*, 2016). Tais condições dificultam o diagnóstico e a superintendência adequada de pacientes com DHT antes do encaminhamento para o TH e durante seu tempo na lista de espera. O custo do TH aumentou desde que a alocação MELD foi adotada, devido à necessidade de uma intensa assistência médica para tratar pacientes com DHT. A utilidade de quimioembolização do CHC para evitar a exclusão de pacientes da lista de espera e a maior necessidade à assistência de terapia intensiva e de substituição renal são exemplos de medidas crescentes entre os candidatos da lista de espera para o TH (BITTENCOURT *et al.*, 2016).

Nos últimos anos, o Brasil vivenciou um importante aumento no estabelecimento de novos centros de transplantes e do número de doadores de órgãos e transplantes (RBT, 2014). Sob essa perspectiva, estudos sobre a situação da qualidade de vida desses pacientes tornam-se essenciais, pois possibilitam a análise do impacto dessas doenças na rotina e aquisição de dados que permitem a comparação entre diversos tipos de tratamento e análise de custos (AGUIAR *et al.*, 2016). Estudos constataram que a qualidade de vida em transplantados apresentaram um positivo impacto na vida pós-transplante hepático (GOTARDO *et al.*, 2007; MATOS, 2011). Entre tais parâmetros, os fatores sociodemográficos se apresentam como protagonistas (AGUIAR *et al.*, 2016).

A Constituição Brasileira (1988) prevê que a saúde é “um direito de todos e um dever do Estado”, tendo este o dever de assegurar o “acesso universal às ações e serviços” de saúde (BRASIL, 2018). Contraditoriamente, o cenário que nos aparece é que o acesso igualitário aos transplantes ainda não foi alcançado no Brasil. Levando em consideração a tremenda importância da realização de transplante pela medicina brasileira em nosso sistema de saúde, dados parecem apontar que as desigualdades ainda são preocupantes neste procedimento, prejudicando a equidade de acesso deste benefício de saúde pelos brasileiros (MARINHO; CARDOSO; ALMEIDA, 2011).

Dados na literatura indicam que, em vários países, a disparidade nos transplantes pode ser explicada pela baixa frequência de doadores com potenciais compatibilidades em função da cor ou raça (JCAHO, 2004). No contexto brasileiro, as causas de morte externas estão entre as maiores causas de mortalidade, ao analisarmos o sexo e raça para essa mortalidade,

vemos que a maioria é do sexo masculino e negro (preto ou pardo). Portanto, o argumento de restrição aos transplantes em receptores pretos ou pardos, devido à incompatibilidade entre doadores e receptores, com viés de cor ou raça, não seria corroborada pela baixa disponibilidade de doadores potenciais pretos ou pardos (MARINHO; CARDOSO; ALMEIDA, 2011). Segundo a Associação Brasileira de Transplantes de Órgãos (ABTO), em 2007, transplantes hepáticos preponderaram em 63% de receptores do sexo masculino e 81% da cor branca. Aproximadamente 70% desses transplantes ocorreram devido ao diagnóstico de cirrose. Apesar da maioria (57,45%) das mortes por cirrose se concentrarem na população branca (MS, 2007), este índice é muito menor que a proporção reportada para receptores de cor branca (81%), o que demonstra uma desigualdade na recepção de órgãos no país (MARINHO; CARDOSO; ALMEIDA, 2011). Analisando perfis demográficos e epidemiológicos, é confirmado que existe uma disparidade no recebimento dos órgãos, visto que mulheres, pretos e pardos apresentam necessidades semelhantes às dos homens brancos, além de representarem uma parcela equivalente na população brasileira (MARINHO; CARDOSO; ALMEIDA, 2011).

Há um consenso na literatura que denota maiores probabilidades de acesso de indivíduos do sexo masculino e brancos aos transplantes no Brasil, e que tais embaraços para transplantes para outros grupos sociais perpassam a atenção básica, média até de alta complexidade (MACHADO, 2007). Reforçando tal perfil discriminatório, receptores com maiores níveis de instrução e renda obtiveram melhores domínios do estigma da doença hepática e da importância da interação social (AGUIAR *et al.*, 2016). Isso pode ser entendido quando sabemos que o grau de escolaridade dos indivíduos tem ação direta na assistência à saúde da população, influenciando a criação de conceitos de autocuidado em saúde, cuidado do ambiente, comportamentos de risco, prevenção e qualidade de vida (CABIESES *et al.*, 2011). No quesito econômico, pacientes com maior nível de renda podem desfrutar de melhores condições de saúde, por meio da aquisição de bens e serviços em saúde, melhores condições de habitação, educação e cuidados preventivos (SANTOS, 2012). Assim como assinala Simmerling (2006): “Pobreza não é apenas uma barreira significativa para transplantes de órgãos. Ela é, de fato, uma contraindicação”.

Há uma urgente necessidade no estabelecimento de medidas que promovam a equidade no Sistema Nacional de Transplantes (SNT), melhorias normativas, especificação objetiva de princípios de justiça e de critérios de alocação, refinamento gerencial, planejamento estratégico, transparência de informações e abordagem sistêmica no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS) (GOMES, 2007). Garcia, Abbud Filho e Pestana (2006)

sublinham que “Equidade significa imparcialidade e que (...) portanto, a etnia, cor ou credo não devem desempenhar nenhum papel na alocação de órgãos”. Há a carência de estudos nesse porte, visto que a identificação de pacientes em situações de vulnerabilidade sociodemográfica pode acrescentar conhecimento nas equipes que atuam nos transplantes para a formulação de intervenções precoces e abordagens multidisciplinares que tenham como objetivo melhorar a qualidade de vida desses pacientes (AGUIAR *et al.*, 2016). Isso destaca a importância da prática contínua, eficaz e de excelência no tratamento juntamente com o incessante anseio de obter melhoras nos resultados para nortear o futuro do transplante de fígado (FERREIRA *et al.*, 2015)

A complexidade que envolve desigualdade de sexo e raça é enorme, mas com razões claramente perceptíveis. Preconceitos, medos, desinformação, biologia humana, subfinanciamento da saúde, racismo e delineamentos desfavoráveis às mulheres e às minorais e inúmeros tipos de diferenças reforçam as desigualdades nos transplantes de órgãos no Brasil e no mundo. A adversidade deve ser assumida com transparência, verdade, coerência e coragem, pautando o fato de que esse não é um fenômeno espontâneo, natural e intransigente. As desigualdades são resultados históricos que estruturam o tecido social brasileiro. O SUS é causa e efeito de nossas desigualdades socioeconômicas e sanitárias, então, ele pode e deve ser questionado e reestruturado (MARINHO; CARDOSO; ALMEIDA, 2011).

3.2 - Sinalização de cálcio no fígado

Diversas funções hepáticas são reguladas pela ativação da sinalização de Ca^{2+} intracelular. Isso abrange o tráfico de vesículas e contração canalicular, que são regulados pelo Ca^{2+} citosólico e integram o controle da secreção biliar (KRUGLOV *et al.*, 2011; MELDOLESI & POZZAN, 1998; NATHANSON *et al.*, 1996); metabolismo energético, que ocorre através de mudanças no Ca^{2+} mitocondrial (FERIOD *et al.*, 2017; ROBB-GASPERS *et al.*, 1998), controle do ciclo celular, que inclui modulação da transcrição gênica (HARDINGHAM *et al.*, 1997; PUSL *et al.*, 2002) e proteínas anti e pro-apoptóticas (LI *et al.*, 2002; MINAGAWA *et al.*, 2005) para regular a proliferação e morte celular, eventos regulados pela concentração de Ca^{2+} nucleoplasmático (RODRIGUES *et al.*, 2007). As diferentes propriedades temporais (por exemplo, através da amplitude de picos de Ca^{2+}), de espaço (por exemplo, através de gradientes e ondas de Ca^{2+}) e localização subcelular de canais de Ca^{2+} são os mecanismos capazes de regular essa variedade de processos e funções simultaneamente com precisão (AMAYA & NATHANSON, 2013; UHLÉN *et al.*, 2006).

Para acionar essa gama de propriedades, o sistema de sinalização de Ca^{2+} possui uma extensa maquinaria molecular de componentes (BERRIDGE *et al.*, 2003). O inositol 1,4,5-trifosfato (InsP_3) é um desses componentes de mobilização de Ca^{2+} , e opera através do receptor inositol 1,4,5-trifosfato (ITPR) (AMAYA & NATHANSON, 2013).

A liberação de Ca^{2+} inicia-se através da interação entre hormônios mobilizadores de Ca^{2+} ou fatores de crescimento com receptores acoplados à proteína G (GPCRs) da membrana plasmática ou receptores tirosinas cinases (RTKs) (BERRIDGE *et al.*, 2003; BERRIDGE *et al.*, 2000). Os GPCRs são constituídos de sete domínios transmembrana, hidrofóbicos, helicoidais e um sítio intracelular de ligação à proteína G. As proteínas G são heterotriméricas, com subunidades α , β e γ (KATRITCH *et al.*, 2012; WU *et al.*, 1992). As subunidades α tem atividade GTPase em locais de ligação específicos para proteínas efetoras, como a fosfolipase C (PLC). Uma vez o GPCR ativado pelo seu ligante específico, o difosfato de guanosina (GDP) é automaticamente substituído pelo trifosfato de guanosina (GTP), ocorre a separação da proteína G se associada ao receptor, o que por sua vez, faz com que a subunidade α separe do complexo β - γ . Com esses complexos formados, fica possível a ativação de proteínas efetoras em diferentes vias intracelulares. Com a hidrólise do GTP pela GTPase, a estrutura heterotrimérica da proteína G reassocia e esta pronta para ser reativada novamente (KATRITCH *et al.*, 2012). Uma diversidade de GPCRs são expressos no fígado, incluindo receptor de vasopressina V1a, receptor adrenérgico α 1B e vários subtipos da classe P2Y de receptores purinérgicos e receptores de angiotensina (GASPERS & THOMAS, 2005).

As RTKs exibem atividade de proteína cinase ativada por ligante e são estruturadas por apenas uma hélice de membrana, conectando o domínio de ligação ao ligante extracelular ao domínio de proteína tirosina cinase citoplasmática. A operação da cinase é ativada pela dimerização do receptor e pela transfosforilação dos resíduos de tirosina dentro da alça de ativação da cinase no domínio catalítico citoplasmático. A partir disso, há o recrutamento de diversas proteínas adaptadoras que tem como função a ativação de vias de sinalização que geralmente regulam a proliferação celular, migração e sobrevivência. As fosfatases podem finalizar a sinalização através da desfosforilação dos resíduos de tirosina, desarticulando os complexos de sinalização formados ao redor dos receptores ativados (LEMMON & SCHLESSINGER, 2010). A priori, entendia-se que a ativação de PLC por RTKs atuava de forma semelhante sob PIP2 (BERRIDGE *et al.*, 2003a) na membrana plasmática, mas estudos sugerem que ela pode intercorrer e hidrolisar PIP2 nuclear para originar InsP_3 e Ca^{2+} diretamente no nucleoplasma (RODRIGUES *et al.*, 2008), visto que ITPR é encontrado no envelope nuclear, bem como ao longo do retículo nucleoplasmático (ECHEVARRIA *et al.*,

2003; RODRIGUES *et al.*, 2007). Há uma variedade de RTKs que são expressos no fígado (RODRIGUES *et al.*, 2008), contais como o receptor c-Met do fator de crescimento de hepatócitos (HGF), o receptor de fator de crescimento epidérmico (EGF) e o receptor de insulina, e suas ações estão intrincadas no metabolismo lipídico e da glicose (MICHAEL *et al.*, 2000), fibrose hepática (BATALLER & BRENNER, 2005), regeneração (TRUSOLINO *et al.*, 2010) e hepatocarcinogênese (JOFFRE *et al.*, 2011).

Uma vez ativada por GPCRs, a PLC hidrolisa o fosfolipídio fosfatidilinositol 4-5-bifosfato (PIP₂) na membrana plasmática, dando origem ao diacilglicerol (DAG) e InsP₃. DAG permanece na membrana plasmática para ativar a proteína cinase C (PKC), e InsP₃ difunde através do citosol, ligando ao ITPR, promovendo a abertura destes canais e subsequente liberação de Ca²⁺ (BERRIDGE *et al.*, 2003).

Os ITPRs são geralmente localizados na membrana do retículo endoplasmático (RE) (SOULSBY & WOJCIKIEWICZ, 2005), no envelope nuclear (MAUGER, 2012), assim como no retículo nucleoplasmático (ECHEVARRIA *et al.*, 2003; RODRIGUES *et al.*, 2008). Há três isoformas de ITPRs em mamíferos (ITPR1, ITPR2 e ITPR3), apresentando grande homologia e mesma estrutura geral entre si, onde a porção N-terminal apresenta o ‘domínio de ligação ao ligante’, a C-terminal o ‘domínio de canal’ e um ‘domínio de acoplamento’ entre as porções, possuindo sítios de ligação putativos para diversos fatores de regulação (PATTERSON *et al.*, 2004). As isoformas variam na sensibilidade ao Ca²⁺ e ao InsP₃ além de padrões de expressão e distribuição subcelular em diferentes tecidos (WOJCIKIEWICZ, 1995). ITPR3 é menos sensível ao InsP₃ (TU *et al.*, 2005) e ATP ao comparado as outras duas isoformas, porém, é mais sensível ao Ca²⁺ (TU; WANG; BEZPROZVANNY, 2005). Essas variações são importantes para designar uma série de implicações da sinalização de Ca²⁺ mediadas por InsP₃ em epitélios (MINAGAWA *et al.*, 2007).

As diferenças na distribuição subcelular de ITPR é o fator que coordena os efeitos da sinalização de Ca²⁺ no fígado (KHAMPHAYA *et al.*, 2018). Por exemplo, sinais de Ca²⁺ na região pericanalicular em hepatócitos e colangiócitos regulam exocitose de componentes da bile (CRUZ *et al.*, 2010; KRUGLOV *et al.*, 2011; NATHANSON, MICHAEL H. *et al.*, 1996), sinais mitocondriais controlam ao metabolismo lipídico (FERIOD *et al.*, 2017) e sinais nucleares regulam a proliferação celular (RODRIGUES *et al.*, 2007). Em hepatócitos, os ITPR1 e ITPR2 são os principais canais de sinalização intracelular de Ca²⁺. ITPR2 é a isoforma mais abundante, sendo 80% dos ITPRs expressos nos hepatócitos, apresentando uma intensa concentração na região da membrana pericanalicular (HIRATA; PUSL; *et al.*, 2002). A disfunção na expressão dessa isoforma, com a sua diminuição, resulta em colestase

(KRUGLOV *et al.*, 2011) e deficiência da regeneração hepática em doença hepática gordurosa não alcoólica (NAFLD) (KHAMPHAYA *et al.*, 2018). ITPR1 representa 20% dos canais de Ca^{2+} expressos nos hepatócitos, com difusa distribuição pelo citoplasma (HIRATA *et al.*, 2002), e uma seletiva associação com mitocôndrias, o que permite desempenhar um papel importante no metabolismo hepático (ARRUDA & HOTAMISLIGIL, 2015) e na formação de gotas lipídicas. O aumento de sua expressão é associado com mecanismos de desenvolvimento e gravidade de NAFLD (FERIOD *et al.*, 2017).

Em contraste, nos colangiócitos, que são células que compõem o epitélio biliar e constituem 3%-5% da população de células no fígado (LAZARIDS *et al.*, 2004), há a expressão das três isoformas do ITPR (PUSL & NATHANSON, 2004). A isoforma 3 (ITPR3) é a mais intensamente expressa, representando aproximadamente 80% dos ITPRs nessas células, com uma intensa concentração apical. Já as outras duas isoformas representam cerca de 10% dos canais de Ca^{2+} , dispersas uniformemente pelo citoplasma (HIRATA; DUFOUR; *et al.*, 2002). A concentração apical do ITPR2 em hepatócitos e do ITPR3 em colangiócitos depende da integridade de balsas lipídicas onde as mesmas ficam ancoradas (NAGATA *et al.*, 2007), formando uma zona de disparo de ondas de Ca^{2+} (HIRATA; DUFOUR; *et al.*, 2002; HIRATA; PUSL; *et al.*, 2002), que possibilitam o desencadeamento de ondas de Ca^{2+} em epitélios polarizados como o fígado. Além disso, *gap junctions* também estão implicadas na formação dessa polaridade, sendo importantes para a manutenção da saúde do fígado (AMAYA & NATHANSON, 2014). Essas estruturas que são expressas na circunferência da borda da membrana pericanalicular nestas células, justamente na região onde o ITPR é concentrado (TORDJMAN *et al.*, 1998). Desta forma, o acúmulo perijuncional do ITPR pode auxiliar na comunicação intercelular através dos sinais de Ca^{2+} (HIRATA; PUSL; *et al.*, 2002).

O mecanismo que proporciona a propagação do sinal de Ca^{2+} apical a basolateral em hepatócitos permanece desconhecido (AMAYA & NATHANSON, 2013). Porém, nesse contexto, é importante destacar que a velocidade e amplitude das ondas de Ca^{2+} intracelulares não são modificadas em um meio extracelular livre de Ca^{2+} , o que evidencia que tal acontecimento depende exclusivamente do Ca^{2+} presente nos estoques intracelulares nessas células (NATHANSON *et al.*, 1994). Por sua vez, em colangiócitos, observa-se pequena expressão de ITPRs na região basolateral (HIRATA; DUFOUR; *et al.*, 2002). Sabendo que Ca^{2+} é capaz de coativar o ITPR (BEZPROZVANNY *et al.*, 1995), provavelmente, as ondas de Ca^{2+} em colangiócitos se propagam através do Ca^{2+} que se concentra na zona apical de

gatilho, que quando se espalha pelo citosol, sensibiliza os ITPRs basolaterais, possibilitando a formação das ondas (AMAYA; NATHANSON, 2013).

Os mecanismos envolvidos na sinalização intracelular de Ca^{2+} no fígado são administrados por um conjunto de ferramentas especializadas nessa função nos diferentes tipos celulares que compõe este grande órgão. Os padrões espaciais e temporais que contribuem para a variação da sinalização de Ca^{2+} são significativos a nível subcelular, celular e no contexto estruturante geral de todo o órgão, onde as células desempenham um serviço interconectado para alcançar a eficácia adequada da função hepática global (AMAYA & NATHANSON, 2013). O esquema representativo da maquinaria envolvida na sinalização de Ca^{2+} descrita anteriormente, se encontra na Figura 1.

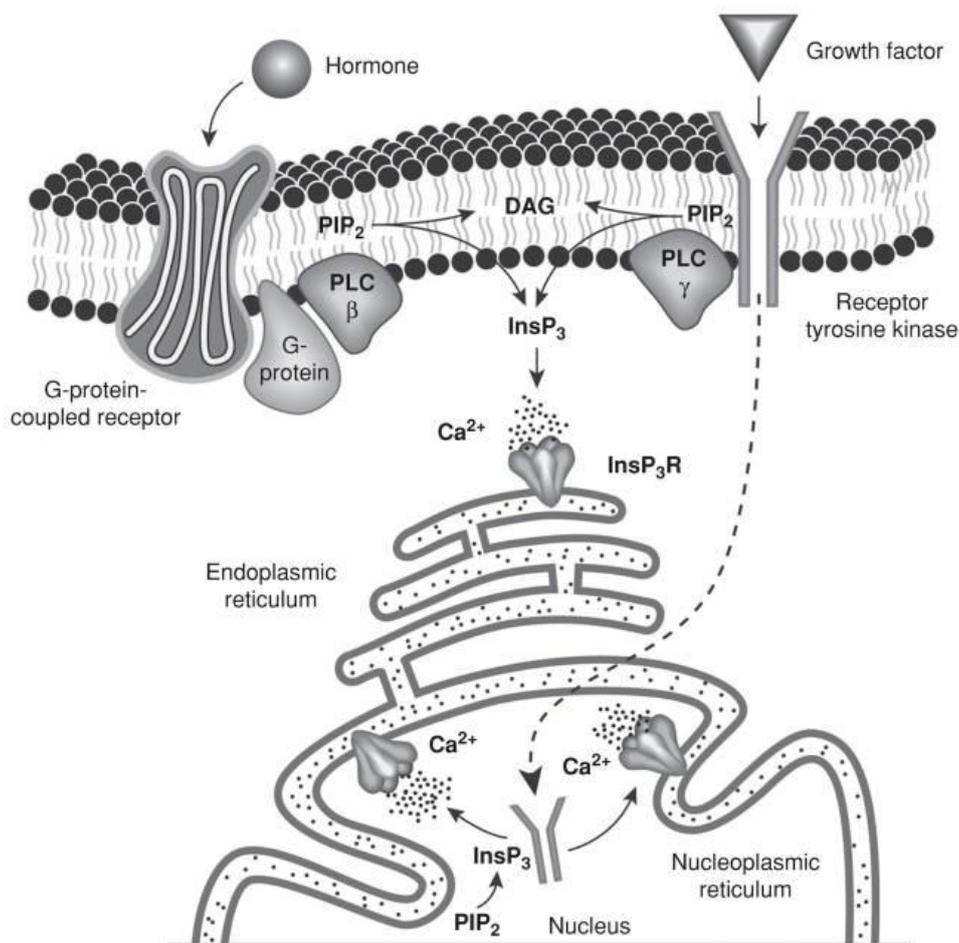


Figura 1: Maquinaria molecular para o estabelecimento da sinalização de Ca^{2+} em hepatócitos. Os sinais de Ca^{2+} podem ser iniciados através de hormônios de ativação de Ca^{2+} (por intermédio de receptores acoplados à proteína G) ou por fatores de crescimento (por intermédio de receptores de tirosina-quinases). A ativação desses receptores através de seu ligante específico leva ao estímulo de

fosfolipase C (PLC), que hidrolisa fosfatidilinositol-5-5-bisfosfato (PIP₂) em diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5-trifosfato (InsP₃). DAG permanece na membrana plasmática e o InsP₃ se difunde por todo o citosol, ligando-se ao receptor de InsP₃ (ITPR) presente no retículo endoplasmático, e possibilitando a liberação de Ca²⁺ no citosol. Alternativamente, os receptores tirosina cinases podem se translocar para o núcleo e ativar localmente a PLC e induzir a liberação de Ca²⁺ do retículo nucleoplasmático para o nucleoplasma. Figura adaptada de AMAYA & NATHANSON, 2013.

3.3 - Hepatite C

O vírus da hepatite C (HCV) é um vírus RNA, integrante da família *Flaviviridae*, gênero *Hepacivirus*, que também engloba o GB vírus B e os hepatovírus de roedores, morcegos e não-primatas, recentemente elucidados (BURBELO *et al.*, 2012). Uma das características do HCV é sua alta heterogeneidade, onde análises filogenéticas de cepas em diversas regiões ao redor do mundo identificaram sete principais genótipos de HCV, referidos 1-7 (MANNNS *et al.*, 2017). Os genótipos do HCV apresentam grande número de subtipos, referenciados por letras minúsculas (1a, 1b e assim por diante) (SIMMONDS, 2013). A característica genotípica influencia no desenvolvimento da doença e na resposta ao tratamento antiviral (MANNNS *et al.*, 2017). Os mecanismos de vigilância do HCV são precários em todo o mundo, impossibilitando a quantificação do status global exato da abrangência da infecção por este vírus (THRIFT; EL-SERAG; KANWAL, 2016). Para superar esse déficit, o Estudo sobre Carga, Doenças e Fatores de Risco Global 2010 (GBD 2010), publicado em 2013, reuniu um conjunto de elucidações derivadas de uma abrangente revisão da literatura disponibilizada juntamente com a análise de especialistas para estimar a prevalência mundial do HCV (HANAFIAH *et al.*, 2013). Tal estimativa mostrou que mais de 184 milhões de indivíduos foram infectados com o HCV, cerca de, aproximadamente, 2,8% da população mundial em 2005 (HANAFIAH *et al.*, 2013). Se incluirmos os grupos de alto risco que não foram analisados no estudo, como pessoas encarceradas, o número aumenta ainda mais, visto que aproximadamente 2,2 milhões de pessoas infectadas pelo HCV mundialmente estão em situações de confinamento (LARNEY *et al.*, 2013).

A infecção pelo HCV pode levar a hepatite C aguda, sendo que, 50%-80% dos pacientes evoluem para um quadro de hepatite C crônica (MANNNS *et al.*, 2017). Ao atingir o estado de cronicidade, o HCV promove um processo inflamatório crônico, podendo levar à fibrose hepática, cirrose, CHC e morte (STANAWAY *et al.*, 2016). O processo de fibrogênese é promovido pela ativação de células estreladas hepáticas, que se tornam

miofibroblastos que sintetizam matriz extracelular fibrosa. Este é o principal fator de complicação decorrente da infecção crônica pelo HCV (YAMANE *et al.*, 2013). O processo fibrogênico progressivo do fígado leva ao estabelecimento de um quadro cirrótico e suas consequentes complicações (MANNS *et al.*, 2017). O ambiente inflamatório local também desempenha um papel crucial na promoção da fibrogênese na hepatite C crônica, devido ao stress oxidativo e a resposta imune direcionada aos hepatócitos infectados que apresentam epítomos virais (HEIM & THIMME, 2014). Somado a isso, diversos fatores de crescimento, quimiocinas e citocinas sintetizadas pelos hepatócitos infectados e a apoptose de hepatócitos através de linfócitos T CD8+, potencializam o recrutamento de células imunes, expansão da inflamação local e ativação de células estreladas hepáticas em miofibroblastos (FRANCESCHINI *et al.*, 2012; NISHITSUJI *et al.*, 2013). Para reforçar isso, ainda há evidências que sugerem que o HCV interage de maneira direta com as células estreladas hepáticas, ocasionando um aumento da velocidade do processo fibrogênico (YAMANE *et al.*, 2013).

A deturpação na proliferação dos hepatócitos no contexto da infecção pelo HCV também está envolvida na progressão da fibrose hepática. Estas alterações podem ser ocasionadas devidas a interações intracelulares entre componentes proteicos do HCV e proteínas envolvidas na regulação do ciclo celular, e ao desarranjo dos pontos de verificação do ciclo celular pela degeneração do DNA que é induzida pelo estresse oxidativo, podendo direcionar a transformação maligna de hepatócitos. Além disso, o aumento da proliferação em resposta a perda de células infectadas pode agir como um mecanismo adicional na transformação de hepatócitos (RUSYN; LEMON, 2014). Sendo assim, a infecção pelo HCV desempenha um papel importante na carcinogênese hepática (MANNS *et al.*, 2017).

A incidência anual acumulada de CHC em pacientes cirróticos relacionados a hepatite C é de 4% a 5% (EL-SERAG, 2012). O desenvolvimento de CHC induzido por HCV é promovido por uma sequência de eventos que podem perdurar entre 20 e 40 anos, que promovem mutações genéticas e alterações epigenéticas somáticas irreversíveis, dando vantagem de progressão a clones malignos em um contexto de tecido carcinogênico (GOOSSENS & HOSHIDA, 2015). Estudos clínicos sugerem a importância de características virais do HCV na progressão do CHC. Nesse sentido, pacientes afligidos pelo genótipo 3 do HCV foram associados a rápida progressão da fibrose (PROBST *et al.*, 2011), além de apresentarem maiores riscos de CHC e risco de morte por todos os fatores em comparação com pacientes portadores de outros genótipos (MEER *et al.*, 2012). Isso reflete em dados, onde o genótipo 3 foi associado a um aumento de 31% e 80% no risco de cirrose e CHC,

respectivamente, em comparação com o genótipo 1 do HCV. Em contrapartida, os efeitos da infecção pelo genótipo 2 foram associados a um risco diminuído de desenvolvimento de cirrose e CHC em comparação com o genótipo 1 (KANWAL *et al.*, 2014).

A ligação viral do HCV ao hepatócito envolve a participação de duas glicoproteínas do envelope, E1 e E2, além de outros componentes e moléculas proteicas de superfície celular. A glicoproteína E2 é composta por regiões hipervariáveis que acabam sendo reconhecidas como epítomos virais pelo sistema imune. Através disso, anticorpos sintetizados contra essas regiões são imunoprotetores. Porém, a alta variabilidade genotípica do HCV no mesmo paciente, impossibilita o desenvolvimento de uma vacina profilática eficaz tendo como alvo proteínas virais (MANNNS *et al.*, 2017). Cada um desses eventos que levam a hepatite C crônica é um potencial alvo para ação terapêutica ou quimioprevenção (HOSHIDA *et al.*, 2014), assim como as várias etapas do ciclo de vida natural do HCV, que servem como alvos para os agentes antivirais de ação direta (DAAs) (PAWLITSKY, 2016).

A replicação viral, juntamente com a interrupção do ciclo de vida intracelular do vírus, foram tidos como principais alvos das drogas antivirais. O tratamento com a combinação de DAAs, leva a taxas de cura de 90% a 100% para todos os genótipos, quando o paciente atinge a resposta virológica sustentada (SVR), ou seja, com níveis indetectáveis de RNA viral no sangue. Todos os indivíduos com hepatite C crônica e níveis detectáveis de RNA de HCV pela sorologia devem ser considerados para o tratamento antiviral (MANNNS *et al.*, 2017). Pacientes com co-infecção por HIV, com insuficiência renal ou aqueles com doença hepática descompensada figuram um grupo de difícil tratamento do HCV e requerem maior atenção. No entanto, os DAAs também aprimoraram o impacto positivo dos tratamentos nessas populações. Porém, ainda há a necessidade de medidas que possibilitem a acessibilidade dos regimes DAAs, visto que, em muitas partes do mundo, as terapias baseadas em IFN ainda estão em prática (MANNNS *et al.*, 2017). Estudos clínicos mostraram que abordagens sem IFN, baseados em DAAs, atingiram taxas de SVR superiores a 90% em um amplo espectro da doença pelo HCV (EASL, 2015) e, conseqüentemente, reduzindo as taxas de desenvolvimento de CHC (MEER *et al.*, 2012). Desde 2016, diversos DAAs estão disponíveis para países subdesenvolvidos através da produção de medicamentos genéricos com efetividade no tratamento e custo menor que 1% quando comparado aos países desenvolvidos (HILL *et al.*, 2017). A inserção dos DAAs no tratamento de HCV tem sido revolucionária para pacientes que passaram pelo transplante hepático; o fornecimento de combinações seguras e de alta tolerabilidade de DAAs permite atingir taxas de SVR similares a pacientes não transplantados (PRICE & TERRAULT, 2015).

Em muitas partes do mundo, a hepatite C figura a principal causa de transplante hepático (THULUVATH *et al.*, 2010). A reinfeção do novo órgão é praticamente certa em pacientes que apresentam viremia pré-transplante (BERENGUER, MARINA *et al.*, 2000). Em média, o reaparecimento de cirrose se torna concreto em 8-10 anos após o transplante hepático (MANNNS *et al.*, 2017). Os principais fatores associados a recorrência da hepatite C mais grave são: o recebimento de órgãos de doadores mais velhos, tratamento de rejeição aguda, infecção por citomegalovírus, co-infecção pelo HIV, entre outros (TERRAULT, 2012). Geralmente, a sobrevida cumulativa do enxerto em pacientes com hepatite C tem sido 30% menor em comparação com pacientes transplantados para outras doenças hepáticas que não sejam HCV (THULUVATH *et al.*, 2010). A obtenção de SVR no pós-transplante hepático está associada a melhores resultados, com taxas de sobrevivência do enxerto similares àquelas sem infecção pelo HCV (BERENGUER *et al.*, 2008).

Pacientes que apresentam a coexistência de CHC e HCV e são submetidos ao transplante hepático, geralmente são tratados antes do transplante, desde que não tenham sido expostos a terapias direcionadas ao CHC, em um contexto de descompensação da cirrose, os pacientes devem ser tratados com DAAs atualmente disponíveis após o transplante (FERNÁNDEZ-CARRILLO *et al.*, 2016). O delineamento do tratamento dependerá principalmente do genótipo do HCV, tolerabilidade ao medicamento ribavirina, gravidade da doença hepática e renal, risco de interações medicamentosas e etapas anteriores ao tratamento. A escolha do tratamento é guiada pelo objetivo da terapia (MANNNS *et al.*, 2017). No entanto, um reservatório de indivíduos portadores do HCV permanecerá futuramente, visto que o tratamento com DAAs ainda é inviável financeiramente fora dos países desenvolvidos (GOOSSENS & HOSHIDA, 2015). Nas próximas décadas, pode haver a estabilização ou até a diminuição dos números de infectados pelo HCV, porém, as projeções preveem que os impactos negativos em decorrência do HCV continuarão aumentando e atingirão o auge entre os anos 2020-2030 (RAZAVI *et al.*, 2014).

3.4 - Doença Hepática Alcoólica

O crescimento progressivo da mortalidade por doença hepática alcoólica (DHA) protagoniza um dos mais graves problemas de saúde em países desenvolvidos e subdesenvolvidos (SUGIMOTO & TAKEI, 2017). A DHA promove um variado espectro clínico de lesão hepática, abrangendo esteatose, esteato-hepatite, fibrose, insuficiência hepática aguda ou crônica, hepatite alcoólica, cirrose e CHC (JOSHI; KOHLI; MANCH,

2016; SUGIMOTO & TAKEI, 2017; TESTINO, 2013). Os conceitos iniciais prevaletentes envolvendo doença induzida por álcool em humanos eram de que o álcool não exercia hepatocitotoxicidade direta por si só, a hepatopatia se desenvolvia, então, através do distúrbio alimentar e subnutrição (SUGIMOTO & TAKEI, 2017). Porém, em 1973, um estudo inédito em primata, provou que o álcool atua como agente hepatotóxico de forma direta (RUBIN & LIEBER, 1973). A partir disso, pesquisas elucidaram diversos fatores envolvidos no estabelecimento e progressão da DHA (SUGIMOTO & TAKEI, 2017).

O consumo excessivo de álcool promove a injúria hepática através de endotoxinas, estresse oxidativo e inflamação (TESTINO, 2013). Após a ingestão, parte da quantidade de álcool é absorvida pelo estômago, tendo acesso ao fígado através da veia porta (SUGIMOTO & TAKEI, 2017). No fígado, há três vias metabólicas responsáveis pela oxidação do etanol: a via dominante e mais importante, através da desidrogenase alcoólica citosólica (ADH); a via da catalase, ambas situadas nos peroxissomos; e o sistema de oxidação microsomal do etanol no retículo endoplasmático liso dos hepatócitos, envolvendo o citocromo P450 (CYP), principalmente em exposições a altas concentrações de álcool (SUGIMOTO & TAKEI, 2017; TESTINO *et al.*, 2014). O produto final de qualquer uma das vias enzimáticas é o acetaldeído (AA), que é oxidado em acetato pelas aldeído desidrogenase citosólica 1 (ALDH1) e aldeído desidrogenase mitocondrial 2 (ALDH2) (CRAWFORD, 2012; SUGIMOTO & TAKEI, 2017; TESTINO, 2013). Uma variedade de moléculas geradas nesses processos metabólicos podem ser os agentes causadores específicos para DHA (SUGIMOTO & TAKEI, 2017).

Diversos estudos apoiam a hipótese de que o AA desempenha um papel essencial na carcinogênese associada ao álcool, em especial no trato gastrointestinal superior e inferior, onde o acúmulo de AA na saliva e no intestino grosso é elevado o bastante para a promoção tumorigênica (JOKELAINEN *et al.*, 1996). Essas evidências elucidaram que há o acúmulo de AA em determinados indivíduos que detém alelos específicos dos genes codificadores para ADH ou ALDH e isso predispõe ao maior risco de câncer (YOKOYAMA; MURAMATSU; OHMORI, 1998). Estudos encontraram uma associação significativa entre a frequência alélica ADH1C*1 e a taxa de homozigose e um risco potencializado para cânceres relacionados ao álcool, incluindo CHC (VISAPAA *et al.*, 2004). O AA sintetizado por inúmeras ADHs é um aldeído que se associa rapidamente a proteínas e DNA. A sua degradação é promovida pelas ALDHs em acetato, que não é tóxico. AA tem três mecanismos de ação distintos e principais que fazem parte da carcinogênese: 1) a formação de adutos carcinogênicos de DNA; 2) inibição dos mecanismos de reparação de DNA; 3) efeitos epigenéticos na metilação do DNA (SEITZ & MUELLER, 2015). As concentrações de AA no tecido hepático são

significativamente menores, devido ao funcionamento metabólico eficaz. Sendo assim, na hepatocarcinogênese, o estresse oxidativo e a cirrose protagonizam ações essenciais (SEITZ & STICKEL, 2007).

O consumo agudo ou crônico de álcool promove a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) e déficit na atividade antioxidante, auxiliando o desenvolvimento de DHA (SUGIMOTO & TAKEI, 2017; TSUKAMOTO & LU, 2001). Diversos eventos promovem o estresse oxidativo na DHA, como inflamação e recrutamento de neutrófilos e macrófagos. Contudo, o ponto chave é a indução do citocromo P450 2E1 (CYP2E1) posterior ao consumo crônico de álcool (ONETA *et al.*, 2002). Hipotetiza-se que os indivíduos que desenvolvem um perfil de forte indução de CYP2E1 tem maiores chances de desenvolver DHA como consequência da EROs e seus efeitos danosos. Normalmente, cerca de 10% a 15% da oxidação do álcool acontece através de CYP2E1, mas, em estado induzido, mais de 30% da oxidação pode ser através do citocromo e nesse contexto, a geração de EROs acontece (SEITZ & MUELLER, 2015). Além disso, o CYP2E1 participa da ativação de diversos xenobióticos e procarcinogênicos, atividade significativa quando carcinógenos são consumidos em associação com o álcool (SEITZ & STICKEL, 2007). Somado a tudo isso, o CYP2E1 ainda catalisa o metabolismo do retinol e do ácido retinóide (AR), promovendo uma diminuição nas concentrações de AR corroboradas à perda da diferenciação celular e à proliferação celular (LIU; RUSSELL; SEITZ, 2001). Esse contexto se mostra importante ao reconhecer que o AR é o procedente fisiológico mais ativo da vitamina A e exerce relevância no controle da progressão da carcinogênese em uma variedade de cânceres (LOTAN, 1996). Pesquisas já demonstraram que o consumo crônico de álcool induz CHC em camundongos sem qualquer associação com outro carcinógeno, e que isso é devido à indução de CYP2E1 (TSUCHISHIMA & GEORGE, 2013). EROs podem formar adutos proteicos e DNA e são capazes de ligar-se a moléculas lipídicas presentes na membrana plasmática, possibilitando a síntese de moléculas aldeídicas biorreativas. (TESTINO *et al.*, 2014). Além disso, o dano genômico ocorre em linfócitos periféricos de pacientes com DHA, e tal característica parece correlacionar-se com a importância da cirrose hepática (TESTINO *et al.*, 2014).

Todo esse complexo metabolismo do etanol requer o aumento do consumo de oxigênio pelo fígado (VIDELA; BERNSTEIN; ISRAEL, 1973). Como o etanol, em especial, é metabolizado na região centrolobular do lóbulo hepático, a ampliação da necessidade de oxigênio promove um quadro de hipóxia relativa nessas regiões, ocasionando a necrose hepática centrolobular (TSUKAMOTO & XI, 1989). A hipóxia tecidual maximiza os níveis do fator de transcrição induzido por hipóxia (HIF) nos hepatócitos (SUGIMOTO & TAKEI,

2017), isso reflete na regulação de diversos genes implicados na inflamação, esteatose, fibrogênese, angiogênese e tumorigênese hepática, visto que HIF regula tais genes, promovendo a progressão da DHA para o CHC (NATH & SZABO, 2012).

A modulação da síntese de citocinas (adiponectina e leptina) por adipócitos brancos, células inflamatórias e células de Kupffer também faz parte da patogênese da DHA (SUGIMOTO & TAKEI, 2017). Enquanto a quantidade de triglicérides presente nos adipócitos aumenta, proporcionando seu crescimento, a secreção de adiponectina é minimizada e a síntese de adipocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IL-6, é maximizada pelos adipócitos (LEHRKE & LAZAR, 2004). Moléculas pró-inflamatórias originadas no tecido adiposo tem a capacidade de ativar vias oncogênicas em uma gama de tecidos não-adiposos, incluindo o tecido hepático (KARAGOZIAN; DERDÁK; BAFFY, 2014). Isso parece refletir em certas características mostradas em estudos, onde ratos expostos a uma dieta crônica com álcool apresentaram maiores níveis de mRNA de TNF- α em células de Kupffer (KAMIMURA & TSUKAMOTO, 1995). Isso foi corroborado em estudos translacionais, que mostraram que níveis séricos de TNF- α estão aumentados em pacientes com DHA e correlacionavam com a gravidade da hepatopatia (MCCLAIN *et al.*, 1997). Níveis séricos de IL-6 também se correlacionam com a gravidade da DHA (HILL *et al.*, 1992). Uma gama de citocinas e adipocinas, como resistina, proteína quimioatrativa de monócitos-1, inibidor do ativador de plasminogênio-1 e IL-10, também têm sido associadas a certas funções na patogênese da DHA, mas ainda requerem dados mais robustos e investigações mais claras se fazem essenciais (SUGIMOTO & TAKEI, 2017).

As junções entre as células epiteliais intestinais são prejudicadas pelo AA, promovendo o aumento da permeabilidade intestinal a endotoxinas e macromoléculas, incluindo o lipopolissacarídeo (LPS) (RAO; SETH; SHETH, 2004; TESTINO *et al.*, 2014). O LPS proveniente do intestino e sintetizado por bacilos gram-negativos tem acesso ao fígado por meio da veia porta e atua como um promotor central do processo inflamatório na DHA (SUGIMOTO & TAKEI, 2017). Através do LPS, células de Kupffer são ativadas e macrófagos são recrutados para o fígado por intermédio do receptor Toll-like 4 (TLR4) e seu co-receptor, CD14, que desencadeiam a produção de citocinas inflamatórias como TNF- α , IL-6, IL-1 β , e também EROs. Além disso, essas citocinas e o LPS ativam células estreladas hepáticas, promovendo a fibrogênese (SUGIMOTO & TAKEI, 2017). Os níveis séricos de endotoxina estão supostamente maximizados em humanos e modelos animais com DHA, e se correlacionam com a gravidade da doença (FUJIMOTO *et al.*, 2000). A participação do LPS na doença hepática foi demonstrada em um estudo recente, onde mostraram que a ativação do

TLR4 por LPS minimiza a expressão do ITPR3 em colangiócitos humanos, contribuindo para a colestase observada em condições de sepse e hepatite alcoólica (FRANÇA *et al.*, 2019).

Nesse cenário influenciado pelo álcool, a fibrogênese, a cirrose, em associação com um meio alterado de citocinas e fatores de crescimento, influenciam a malignidade (SEITZ & STICKEL, 2007). Pequenos focos pré-neoplásicos hepáticos são potencialmente aumentados em número e tamanho em exposição ao álcool (CROAGER; SMITH; YEOH, 2002). Nestes focos em roedores, foi observado a presença de células progenitoras hepáticas, denominadas “células ovais”(SMITH; TEE; YEOH, 1996). Células ovais são células-tronco hepáticas pluripotentes, e sabe-se que sua presença é uma das características precedentes de alguns CHCs (ROSKAMS, TANIA A.; LIBBRECHT; DESMET, 2003). Importantes estimulantes da proliferação de células-ovais são as citocinas TNF- α e TGF- β 1, ambas significativamente e positivamente reguladas em DHA (SEITZ & STICKEL, 2007).

Elucidar com detalhes o papel do álcool durante o desenvolvimento da hepatopatia e seu desenvolvimento em CHC é complexo. Estudos bioquímicos e genéticos permitiram analisar mecanismos pelos quais o álcool e, em especial, o metabolismo do álcool, são responsáveis pelo processo de transformação maligna dos hepatócitos (MCKILLOP & SCHRUM, 2009). O consumo crônico de álcool ocasiona a doença hepática progressiva passando pela esteatose simples, esteato-hepatite, fibrose e, por fim, cirrose por intermédio da ativação das células estreladas (SETSHEDI; WANDS; MONTE, 2010). Os efeitos intra-hepáticos e sistêmicos do álcool desempenham uma importância significativa, onde hepatócitos não podem ser considerados exclusivos ao se estudar os mecanismos que desencadeiam sua transformação (MCKILLOP & SCHRUM, 2009). A necessidade de mais estudos sobre a patogênese da DHA é essencial, estes auxiliarão a aumentar a gama de opções terapêuticas e potencializar a melhora do entendimento da esteato-hepatite não alcoólica (NASH).

3.5 - Cirrose Criptogênica

A cirrose criptogênica (CC) é a consequência de uma doença hepática crônica onde a etiologia permanece enigmática mesmo após detalhadas avaliações clínicas, sorológicas e patológicas (MERCADO-IRIZARRY & TORRES, 2016), tornando-a uma doença difícil de definir e investigar (HENRY *et al.*, , 2019). A prevalência de CC variou entre 5% a 30% em pacientes cirróticos em estudos prévios. Porém, a incidência de CC diminuiu cerca de 5% com o progresso do conhecimento e desenvolvimento de testes para hepatites virais, técnicas

em sorologia e biomarcadores (CHARLTON *et al.*, 1997). Além disso, os índices vem diminuindo à medida que hepatopatias emergentes, como a NAFLD e NASH são melhor elucidadas (HENRY *et al.*, 2019). Mais recentemente, de acordo com estimativas de bancos de dados de transplantes, a prevalência de CC é de aproximadamente 10%, mas essas análises costumam alocar a CC em categorias como “outros” diagnósticos, o que aumenta a dificuldade de determinar a prevalência com mais exatidão (WONG *et al.*, 2015). Com a evolução do entendimento e do conhecimento sobre doenças hepáticas crônicas espera-se que a prevalência de CC minimize (CHARLTON *et al.*, 2011).

Com o aprimoramento do entendimento sobre DHA e implementação do teste para HCV na prática regular, a influencia dessas duas entidades na definição de CC diminuiu expressivamente (SHEA *et al.*, 2010; KODALI; GORDON; SILVERMAN; McCRAY, 1994). Concomitantemente, os detalhes estruturais e a história natural mais elucidativa da NAFLD e NASH direcionaram a descoberta de muitos traços clínicos que se sobrepunham a CC (HENRY, ZACHARY H; CALDWELL; ARGO, 2016).

Estudos antigos já sugeriam que a doença hepática gordurosa relacionada ao metabolismo pode contribuir no desenvolvimento de uma cirrose branda. Análises mais conclusivas mostraram que o desenvolvimento de NASH e a progressão para uma cirrose micronodular leve, com perda ou intensa diminuição da esteatose pode ser observadas em alguns pacientes, fazendo com que NASH fosse considerada como causa significativa para CC (POWELL *et al.*, 1990). Reforçando isso, a maioria dos pacientes com CC nos EUA foi classificada como portadora de NASH (GOLABI *et al.*, 2018). Essa constatação foi corroborada indiretamente com dados que mostram que pacientes com CC transplantados apresentaram maiores taxas de obesidade e outras condições metabólicas e um maior risco de recidiva de NASH e alterações metabólicas pós-transplante (CONTOS *et al.*, 2001; ONG *et al.*, 2001). Até então, a maioria do conhecimento acumulado sobre CC ocorre a partir de bancos de dados de transplantes ou análises retrospectivas, havendo pouquíssimos dados que confrontem diretamente pacientes com CC e com NASH (GOLABI *et al.*, 2018; ONG *et al.*, 2001). No entanto, um estudo recente comparou um grande grupo de pacientes com NASH e CC através de parâmetros clínicos, dados laboratoriais e resultados advindos de acompanhamento prospectivo, identificando que ambas entidades possuem uma prevalência similar de traços da síndrome metabólica, sugerindo que elas devam fazer parte de um mesmo espectro patológico, independente de suas características histológicas (YOUNOSSI *et al.*, 2018). Younossi, Zobair e colaboradores (2018) ainda sublinham que, apesar de todas essas convergências clínicas e metabólicas e piores desfechos, os pacientes com CC são

habitualmente preteridos dos ensaios clínicos de NASH devido à obrigatoriedade de esteatose e degeneração de hepatócitos em suas biópsias hepáticas. O estudo propõe que pacientes com CC fazem parte do mesmo processo de cirrose similar à NASH em diversos estágios da doença, sendo assim, há a proposição de que nesse cenário de fatores de risco para síndrome metabólica e não existência de outras doenças hepáticas, a terminologia de CC não deve ser considerada, e os pacientes que apresentarem importante fibrose ou cirrose devem ser delineados de forma semelhante no estudo de drogas (YOUNOSSI *et al.*, 2018). Esses dados são reforçados quando análises do Registro Científico de Destinatários de Transplantes dos EUA mostram uma mudança na indicação de transplante hepático entre os anos de 2001 e 2009. Nesta análise, a indicação de pacientes com NASH para transplante aumentou significativamente, ao passo que os números de CC minimizaram concomitantemente no mesmo período de tempo (CHARLTON *et al.*, 2011).

Apesar da maioria dos pacientes com CC apresentarem traços clínicos e metabólicos associados com NASH, não necessariamente todos tem NASH (YOUNOSSI *et al.*, 2018). Doenças raras, como a deficiência de lipase ácida lisossomal, assim como algumas decorrências induzidas pelo uso de drogas, podem figurar um contexto de NAFLD-NASH em exames de imagens e histológicos e, dessa forma, se apresentarem como CC (HENRY, ZACHARY; ARGO; CALDWELL, 2019). Para minimizar esse problema, futuros estudos precisam abordar tal questão, quantificando a extensão das similaridades entre NASH e outras hepatopatias que podem ser encaradas como CC (YOUNOSSI *et al.*, 2018).

4 - METODOLOGIA

4.1 - Amostras

Trata-se de um estudo descritivo, retrospectivo, exploratório, de delineamento transversal realizado no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (ICB-UFMG) e no Departamento de Anatomia Patológica de Medicina Legal da Faculdade de Medicina da UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Investigação Humana local da UFMG – Protocolo n° 71206617.8.0000.5149.

Foram utilizadas amostras de fígado de 53 pacientes, maiores de 18 anos, que receberam o diagnóstico de CHC associado à hepatopatia crônica de etiologias de infecção pelo vírus C (HCV), doença hepática alcoólica (DHA) ou cirrose criptogênica (CC). Todos foram submetidos ao transplante hepático no Grupo de Transplante Hepático do Instituto Alfa de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas da UFMG (HC-UFMG). As amostras selecionadas foram colhidas e arquivadas no Serviço de Anatomia Patológica e Necropsia do Hospital das Clínicas da UFMG, no período de 2002 a 2014. Não foram incluídas amostras que possuíam somente parênquima cirrótico ou tumoral, tumores sincrônicos ou metacrônicos e a variante fibrolamelar do CHC. As cinco amostras de tecidos histologicamente normais foram obtidas a partir de ressecções hepáticas de pacientes acometidos por câncer de cólon metastático, conforme determinado por uma revisão de relatórios de patologia de 2004 a 2013 no Hospital de Yale New Haven e 2010 a 2017 no Hospital das Clínicas da UFMG (HC-UFMG).

As informações clínicas foram obtidas dos prontuários registrados no sistema eletrônico do HC-UFMG.

4.2 - Imunohistoquímica das amostras de fígado com CHC

As amostras de fígado dos pacientes foram fixadas em formalina tamponada, submetidas à parafinização e emblocamento, após isso, foram arquivadas. A partir dos blocos, cortes de 4µm, realizados em micrótomo (Leica RM2125RT) foram colocados em lâminas de vidro silanizadas. Os cortes foram, então, desparafinizados em estufa a 65°C por, pelo menos, 8 horas. A desparafinização seguiu com quatro banhos de xilol (o primeiro teve duração de 20 minutos e os demais, 1 minuto) e três banhos em álcool absoluto (o primeiro teve duração de

5 minutos e os outros, 1 minuto). Logo após, as lâminas foram banhadas em água corrente durante 3 minutos. A próxima etapa foi a recuperação antigênica, onde as lâminas foram submetidas à imersão em tampão citrato (pH 6,0), em panela a vapor (CuisinArt) por 30 minutos (aproximadamente 95°C). A imunomarcação foi feita utilizando o sistema de detecção do Polímero Novolink (Leica, Wetzlar, Alemanha). Após o resfriamento das lâminas, foram realizadas as etapas de bloqueio da peroxidase endógena (10 minutos); bloqueio de proteínas (10 minutos); incubação com anticorpo primário; bloqueio com reagente pós-primário (30 minutos); reação do polímero (anticorpo secundário – 30 minutos); detecção pelo sistema DAB (3,3'diaminobenzidina – por 2 minutos) e, finalmente, contra coloração dos cortes por hematoxilina (5 minutos). O período de incubação com o anticorpo primário foi de um dia para o outro (*overnight*) à temperatura ambiente. Uma vez feita as marcações, as lâminas foram lavadas com TRIS-TBS, passaram por 3 banhos em álcool absoluto (1 min cada), colocadas em estufa para secagem (5 min) e, por fim, banhadas em xilol 2 vezes (1 min cada). Após isso, os cortes foram cobertos por lamínulas.

Para este estudo, foram utilizados dois anticorpos primários: o primeiro, para marcação do ITPR3 (Anti-ITPR3 Sigma; Lot: A95424); e o segundo para marcação de ssDNA (Anti-Single Stranded DNA Immune-Biological Laboratories; Lot: 1D-114).

4.3 - Análise da intensidade de expressão de ITPR3 e do índice de marcação de ssDNA

Para a avaliação do perfil de expressão de ITPR3 em cada uma das amostras analisadas, foram utilizadas fotos no aumento de 40X, onde 10 campos foram fotografados em cada uma das regiões (tumor e parênquima cirrótico). A partir disso, através do software *ImageJ*, a intensidade da marcação em cada imagem foi avaliada delimitando 10 regiões citoplasmáticas, excluindo o núcleo. O software realiza essa análise através do histograma, dando a intensidade dos pixels em cada região selecionada em uma escala de 0 até 255. A intensidade de marcação de cada caso foi estipulada obtendo a média de marcação das 10 regiões analisadas nos 10 campos fotografados. Essa metodologia de análise de imagem refinou os dados apresentados, pois desta forma, temos uma variável contínua que pode retratar pequenas diferenças na intensidade de marcação entre as diferentes amostras, variando do que ocorreria se tal observação fosse realizada por patologistas que avaliariam tal intensidade e suas diferenças entre casos através de um score categórico e mais limitado.

Para a avaliação da marcação de ssDNA, que destaca células em processo apoptótico, em cada uma das amostras analisadas, foram utilizadas fotos no aumento de 40X, onde 10

campos foram fotografados somente na região tumoral. A partir disso, núcleos positivos e negativos foram contados em cada um dos campos. Por último, foi calculada uma porcentagem de núcleos positivos a partir do montante total de núcleos contados em cada amostra. Com base em Guerra e colaboradores (2019), estipulamos que casos com $\leq 50\%$ de células marcadas para ssDNA seriam considerados com baixo percentual apoptótico e, contrariamente, casos com $>50\%$ de células marcadas para o mesmo anticorpo, seriam considerados com alto percentual apoptótico.

4.4 - Avaliação do índice mitótico

Dois patologistas especialistas em fígado realizaram a contagem do número de células mitóticas em 10 campos de grande aumento (CGA) de lâminas coradas com hematoxilina e eosina (H&E), e identificaram áreas contendo mais figuras mitóticas, em metáfase ou anáfase, o chamado *hot spot*. Após a contagem das mitoses nessas áreas, a mesma foi estendida para as áreas adjacentes não sobrepostas. Se nenhum *hot spot* pudesse ser identificado e as mitoses fossem aleatoriamente dispersas por toda a região tumoral, uma mitose representativa foi eleita e a contagem começou com aquela região e foi estendida para os campos adjacentes. Com referência aos critérios de figuras mitóticas estipuladas por Baak (BAAK, 1990), as células em mitose foram contadas apenas se houvesse completa concordância entre os dois patologistas através de um microscópio de multi-cabeças. O delineamento entre baixo índice mitótico com amostras com menos de 5 figuras mitóticas em 10 CGA (≤ 5) e alto índice mitótico com amostras com 5 ou mais figuras mitóticas em 10 CGA (>5), foi considerado com referência em diversos trabalhos que se utilizaram do mesmo critério (HA *et al.*, 2016; HARAFAKE; TAKEDA; TAKAHIKO KASAI; *et al.*, 1993; NANASHIMA *et al.*, 2003; OSÓRIO *et al.*, 2015; OUCHI *et al.*, 2000).

4.5 - Análise em bioinformática

Os níveis de mRNA foram coletados em bancos de dados disponíveis gratuitamente para acesso. Os dados dos pacientes foram retirados *The Cancer Genome Atlas* – TCGA e utilizando os seguintes códigos: ENSG00000150995 (*ITPR1*), ENSG00000123104 (*ITPR2*) e ENSG00000096433 (*ITPR3*). Em uma primeira análise foi avaliado os níveis de mRNA para as isoformas do ITPR comparando o grupo controle com pacientes com carcinoma hepatocelular. Em uma segunda análise, os níveis de RNA mensageiro foram avaliados em

diferentes estágios da classificação TNM de tumores, que leva em consideração o tamanho do nódulo tumoral (T), o acometimento de linfonodos (N) e o desenvolvimento de metástase (M). Os valores estão expressos em TPM (*Transcripts Per Million*).

4.6 - Análises estatísticas

Para análise estatística, foi utilizado o *software* IBM SPSS. As médias de ITPR3 tumoral e do parênquima cirrótico e as variáveis numéricas foram correlacionadas pelo teste de Spearman. Para a correlação das médias de ITPR3 com os dados categóricos, foram utilizados Teste T e ANOVA, conforme indicado nas legendas das tabelas. Um valor de $p \leq 0,05$ foi usado para indicar significância estatística.

5 - RESULTADOS

5.1 - Caracterização da amostra

Para o estudo, foram selecionadas amostras de 53 pacientes advindas de explantes e distribuídas em três diferentes etiologias subjacentes com diferentes frequências: HCV (31), DHA (16) e CC (6). Representando 58,5%, 30,2% e 11,3%, respectivamente (TABELA 1).

Tabela 1 – Disposição das etiologias subjacentes das amostras de CHC analisadas.

Etiologia	Frequência	% válido
HCV	31	58,5%
DHA	16	30,2%
CC	06	11,3%
Total	53	100%

Vírus da hepatite C (HCV); Doença Hepática Alcoólica (DHA); Cirrose Criptogênica (CC).

A maioria das amostras analisadas era oriunda de pacientes do sexo masculino, 45 pacientes (84,9%), e apenas 8 pacientes (15,1%) eram do sexo feminino. A descrição dos dados clínicos e laboratoriais analisados nesse estudo – idade, MELD, níveis séricos de alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), AFP, bilirrubina total (BT), *international normalized ratio* (INR) e creatinina – encontra-se na Tabela 2 com os valores mínimos, médios e máximos de acordo com a quantidade dos casos que apresentaram tais informações.

Os parâmetros para idade, variaram de no mínimo 41,11 anos, ao máximo de 74,03 anos, com a média em 57,9 anos. MELD apresentou uma variação mínima de 6,0; máxima de 32,0 e média de 15,0. Os níveis séricos de AFP foram avaliados em nanogramas por mililitro (ng/mL), com variação mínima de 1,0; máxima de 2883,0 e média de 123,78. BT teve seus níveis avaliados em micrograma por decilitro ($\mu\text{g/dL}$), variando do valor mínimo de 0,50; máximo de 2,65 e média de 8,70. INR, um sistema que relata tempos de protrombina e variações nos tempos de coagulação, teve seu valor mínimo em 0,990, máximo 2,690 e média em 1,45. Creatinina foi mensurada em miligramas por decilitro (mg/dL), com valores variando de no mínimo 0,14; máximo 3,0 e média em 1,02. A mensuração das transaminases

hepáticas ocorreram em unidade por litro (U/L), com ALT variando em mínimo de 24,0; ao máximo de 325,0; com média de 91,3. AST apresentou mínimo de 25,0; máximo 267 e média de 85,54. ALB sérica foi avaliada em grama por decilitro (g/dL), com valor mínimo de 2,0; máximo de 4,80; e média de 3,20. O número de figuras mitóticas contatadas em 10 CGA variaram em no mínimo de 0; máximo de 22 e média de 5. O tamanho dos nódulos tumorais foram medidos em centímetros, com mínimo de 1 cm; máximo de 10,5 cm e média de 3 cm.

Tabela 2- Dados clínicos dos pacientes com CHC.

	Mínimo	Média	Máximo
Idade (anos)	41,11	57,9	74,03
MELD	6,0	15,0	32,0
AFP (ng/mL)	1,0	123,78	2883,0
BT (mg/dL)	0,50	2,65	8,70
INR	0,990	1,45	2,690
Creatinina (mg/dL)	0,14	1,02	3,0
ALT (U/L)	24,0	91,3	325,0
AST (U/L)	25,0	85,54	267
ALB (g/dL)	2,0	3,20	4,80
Mitoses (10 CGA)	0	5,0	22
Tamanho dos nódulos (cm)	1,0	3,0	10,5

Modelo para doença hepática terminal (MELD); α -fetoproteína (AFP); Bilirrubina total (BT); *international normalized ratio* (INR); Creatinina; Alanina aminotransferase (ALT); Aspartato aminotransferase (AST); Albumina (ALB); Contagem de figuras mitóticas em 10 campos de grande aumento (10 CGA) e tamanho dos nódulos.

As demais características anatomopatológicas – número de nódulos, presença de invasão vascular, necrose, fibrose, inflamação tumoral, características intracelulares e grau de diferenciação de acordo com Edmondson e Steiner – encontram-se apresentadas na Tabela 3, com o percentual válido de acordo com a quantidade dos casos que apresentaram tais informações. O número de nódulos foi categorizado em casos com três ou menos nódulos (≤ 3) e casos com mais de três nódulos (> 3). O nosso grupo amostral apresenta 26 (55,3%)

casos apresentando três ou menos nódulos e 21 (44,7%) casos apresentando mais de três nódulos. Os parâmetros de invasão vascular, necrose, fibrose, inflamação tumoral e características intracelulares foram todos categorizados em presentes e ausentes. Nesse estudo, 23 (54,8%) casos tinham invasão vascular presente e 19 (45,2%) casos não apresentaram tal característica. Ao avaliar lesão necrótica, em 18 (38,3%) casos foram observadas necrose, enquanto 29 (61,7%) dos casos não foram relatadas tais lesões. A presença de fibrose tumoral foi encontrada em 21 (45,7%) casos e ausente em 25 (54,3%). A infiltração de elementos imunes e a consequente inflamação tumoral foi observada em 24 (51,1%) casos, e ausente em 23 (48,9%) casos. A presença de características intracelulares como esteatose, pigmento biliar e corpúsculos de Mallory foram observadas em 30 (66,7%) casos, enquanto 15 (33,3%) casos não apresentaram nenhuma das características. Por fim, o grau de diferenciação de acordo com Edmonson e Steiner foi classificado e agrupado em I e II (Baixo grau; bem diferenciado) e III e IV (Alto grau; mal diferenciado). Trinta e cinco (72,9%) casos foram classificados em baixo grau, e treze (27,1%) dos casos em alto grau.

Tabela 3 - Características anatomopatológicas dos pacientes com CHC.

Parâmetros clínicos	N(%)
Número de nódulos	
≤3	26 (55,3%)
>3	21 (44,7%)
Invasão vascular	
Presente	23 (54,8%)
Ausente	19 (45,2%)
Necrose	
Presente	18 (38,3%)
Ausente	29 (61,7%)
Fibrose	
Presente	21 (45,7%)
Ausente	25 (54,3%)
Inflamação tumoral	
Presente	24 (51,1%)
Ausente	23 (48,9%)
Características intracelulares	
Presente (inclusão celular)	30 (66,7%)
Ausente	15 (33,3%)
Grau de diferenciação	
Baixo grau (I-II)	35 (72,9%)
Alto grau (III-IV)	13 (27,1%)

A análise referente ao tipo histológico do CHC – trabecular, pseudo-acinar, pseudo-acinar/trabecular e sólido – está apresentada na Tabela 4 com a frequência do número de casos e percentual válido de acordo com a quantidade dos casos que apresentaram tais informações. Três (6,4%) casos apresentaram o tipo sólido na morfohistologia. O tipo pseudo-acinar foi observado em seis (12,8%) casos. O misto de pseudo-acinar/trabecular foi observado em dezesseis (34%) dos casos, e o tipo trabecular teve predominância com vinte e dois (46,8%) casos. Os últimos dois tipos histológicos foram os predominantes.

Tabela 4 – Classificação do padrão histológico dos pacientes com CHC.

Tipo histológico*	Frequência	% válido
Pseudo-acinar	6	12,8%
Sólido	3	6,4%
Trabecular	22	46,8%
Pseudo-acinar/ trabecular	16	34,0%
Total	47	100%

Classificação do padrão histológico de acordo com Edmondson e Steiner (1954).

5.2 - Análise de bioinformática

Através dos resultados da primeira análise dos dados de bioinformática, constatamos que houve um leve aumento dos níveis de mRNA de *ITPR1* e *ITPR2*, porém, nenhum deles se mostrou estatisticamente significativo em relação ao controle normal. Mas ao observarmos o *ITPR3*, constatamos que houve um aumento de ~2,5 vezes e que se mostrou estatisticamente significativo em relação ao controle (FIGURA 2A). Através dos resultados da segunda análise, com a estratificação por estágio da doença, podemos observar nos diferentes estágios, os níveis de mRNA de *ITPR1* e *ITPR2* não se mostraram significativamente diferentes em relação ao tecido normal. Porém, no contexto do *ITPR3*, o que vimos é que quanto maior o estágio da doença, ou seja, quanto maior a progressão tumoral, maior é os nível de mRNA de *ITPR3*, e isso se mostrou significativo quando comparados os estágios II e III com o controle normal (FIGURA 2B).

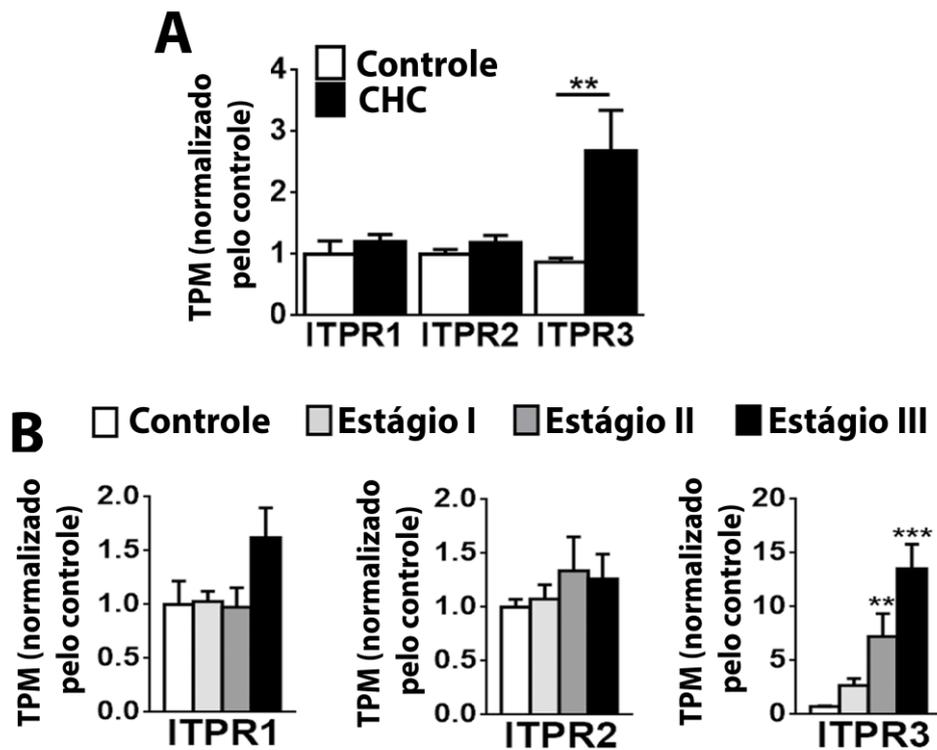


Figura 2: Análises de bioinformática em TPM (*Transcripts Per Million*). (A) Expressão de mRNA de *ITPR1-3* em pacientes controle (n=26) e CHC (n=89). As isoformas *ITPR1* e *ITPR2*, que são fisiologicamente expressas em hepatócitos, não são alteradas no CHC, mas a expressão de *ITPR3* é significativamente maior no CHC ($p < 0,05$, pós-testes de Bonferroni). (B) A expressão de mRNA do *ITPR3* não se mostrou significativo no estágio clínico I. Contudo, o mRNA de *ITPR3* está significativamente maior nos estágios II e III em comparação com o controle (** $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$, pós-testes de Bonferroni, respectivamente).

5.3 - Análise imuno-histoquímica

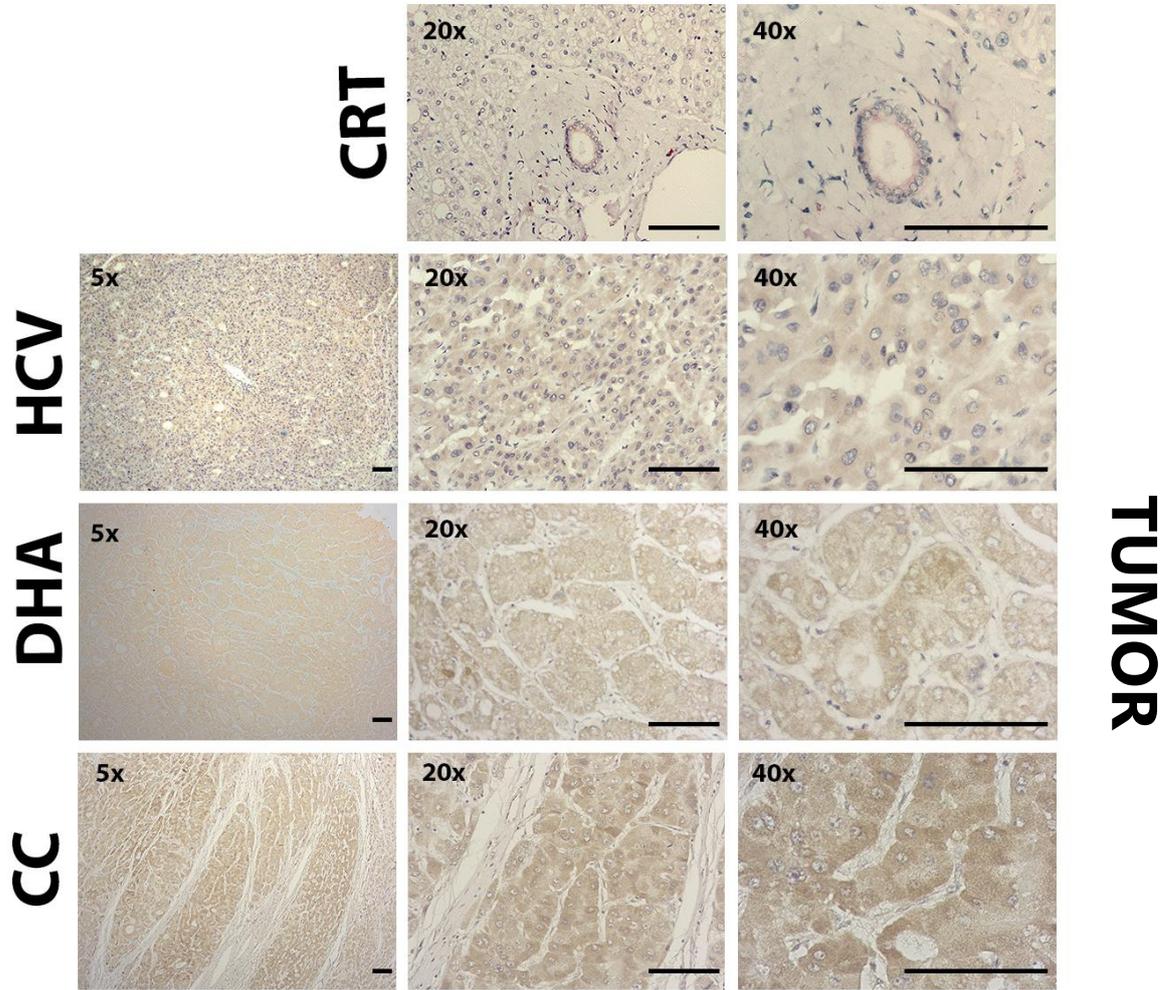
A marcação imuno-histoquímica da proteína ITPR3 no tumor e no parênquima cirrótico adjacente das três etiologias subjacentes esta ilustrada na Figura 3. Como se pode observar, a marcação na região tumoral (FIGURA 3A) apresentou uma intensidade expressivamente maior em relação ao parênquima cirrótico (FIGURA 3B) e, principalmente, em relação ao controle no contexto de todas as hepatopatias crônicas apresentadas. A intensidade da marcação no parênquima cirrótico também foi mais expressiva em relação ao controle normal nas três etiologias. Para comprovar a especificidade do anticorpo para a marcação de ITPR3 através da observação da marcação de colangiócitos. A distribuição da

marcação observada foi bem homogênea e dispersa pelo citoplasma dos hepatócitos, tanto na região tumoral quanto na cirrótica, com alguns casos apresentando uma maior marcação em torno do núcleo.

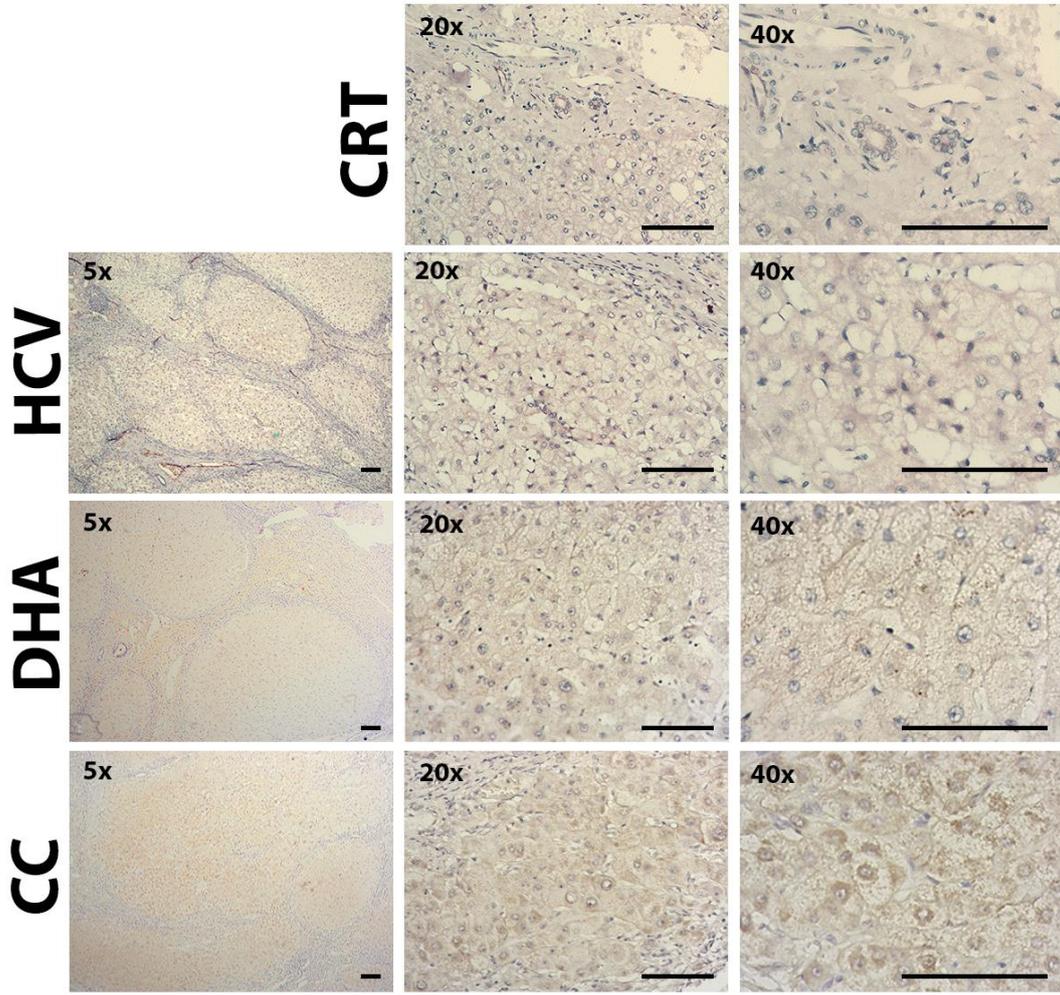
As médias da intensidade da marcação nas regiões tumorais associadas à CC, HCV e DHA são 129.698, 126.244 e 124.308, respectivamente. Não há diferenças estatisticamente significativas entre as etiologias. As médias da intensidade da marcação nas regiões de parênquima cirrótico associadas à CC, HCV e DHA são 121.247, 112.774 e 112.819, respectivamente. E, assim como nas regiões tumorais, não houve diferenças estatisticamente significativas entre as etiologias. Sendo assim, não houve diferença expressiva na intensidade de marcação do ITPR3 entre as regiões tumorais e entre o parênquima cirrótico quando comparada as três etiologias subjacentes. Porém, houve diferença estatística significativa entre a região tumoral e o parênquima cirrótico dentro de cada etiologia, exceto no contexto da CC (FIGURAS 3C-E)

A média da intensidade de marcação do ITPR3 nos casos controles (n=5) foi de 56.391, e tanto a média da intensidade de marcação destas proteínas nas regiões tumorais quanto nas regiões de parênquima cirrótico das três etiologias apresentaram diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle (FIGURA3F).

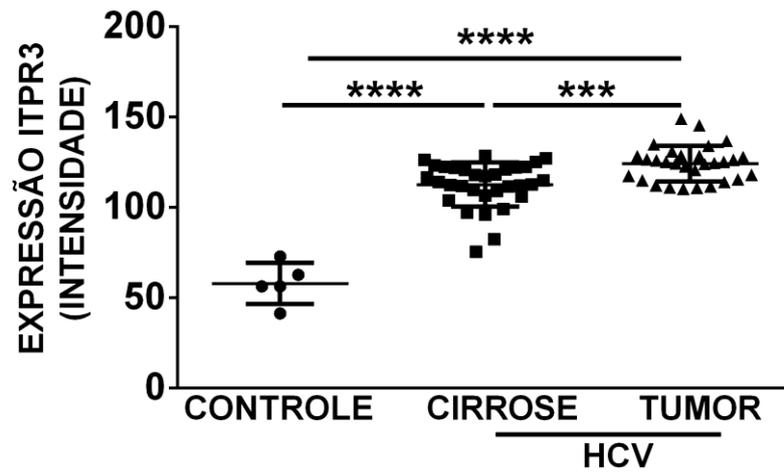
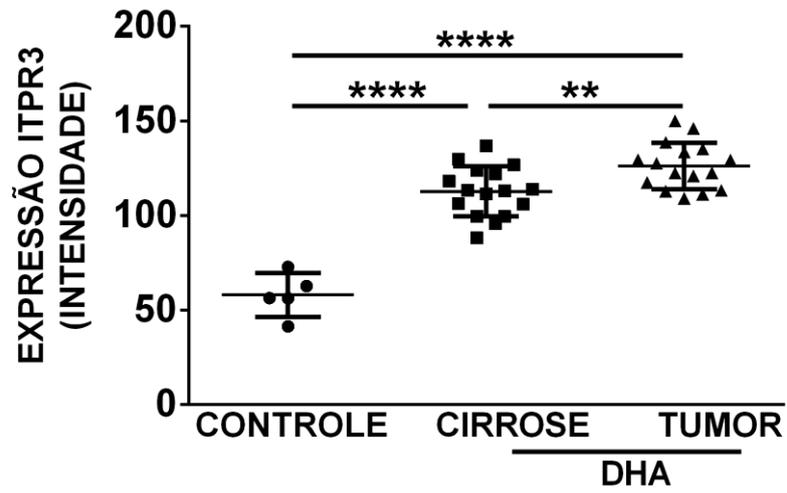
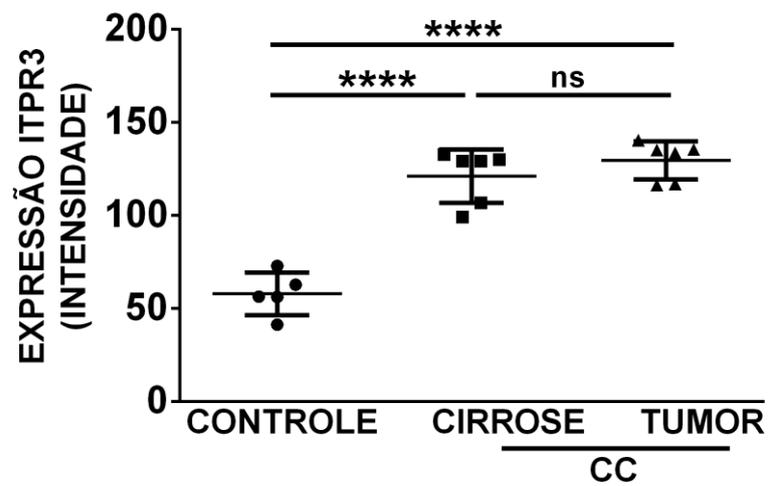
A



B



CIRROSE

C**D****E**

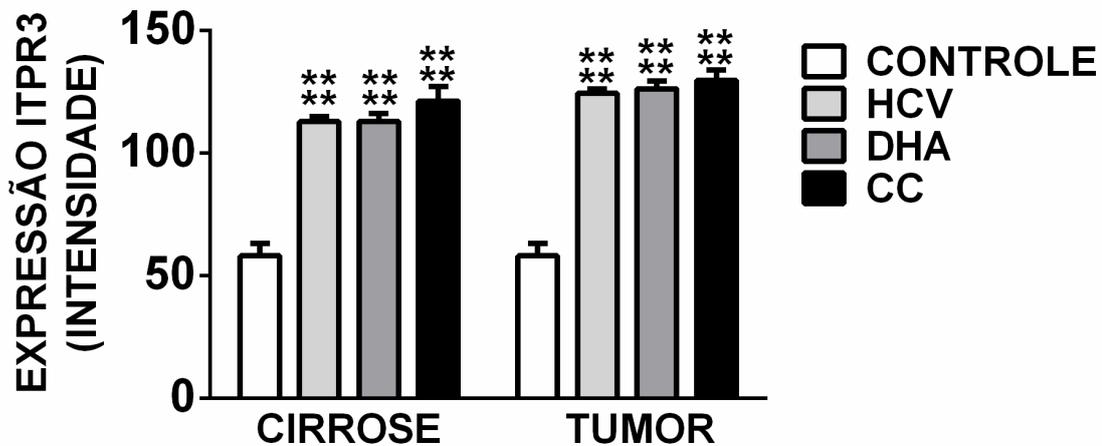
F

Figura 3: Imagens representativas de marcação e quantificação de ITPR3 em espécimes coletados na Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). (A) Imagens representativas da marcação de ITPR3 na região de CHC com diagnóstico de hepatite viral C (HCV; n=31), doença hepática alcoólica (DHA; n=16), cirrose criptogênica (CC; n=6) e controle (CRT, n=3). (B) Imagens representativas da marcação de ITPR3 no parênquima cirrótico adjacente ao CHC com diagnóstico de HCV (n=31), DHA (n=16), CC (n=6) e CRT (n=2). Barra de escala, 200µm (5x), 50µm (20x) e 25µm (40x). (C) Análise quantitativa da intensidade de marcação de ITPR3 nas amostras de CHC e parênquima cirrótico de etiologia por HCV (n=31, **** p<0.0001; ***p<0.0001). (D) Análise quantitativa da intensidade de marcação de ITPR3 nas amostras de CHC e parênquima cirrótico de etiologia por DHA (n=16, ** p<0.0057; **** p<0.0001). (E) Gráfico representativo da intensidade de marcação de ITPR3 nas amostras de CHC e parênquima cirrótico de CC (n=6, **** p<0.0001). (F) Gráfico representativo da intensidade de marcação de ITPR3 nas amostras de CHC e parênquima cirrótico comparativo entre as três etiologias (**** p<0.0001). Todas as análises foram através do Teste T Student.

5.4 - Correlação da intensidade de marcação de ITPR3 com os parâmetros clínicos numéricos

O teste estatístico de Spearman foi utilizado para compararmos a intensidade do perfil de marcação de ITPR3 tumoral e cirrótico com as variáveis clínicas disponíveis, exceto o índice mitótico (10 CGA) que foi avaliado por teste T. Observamos, que a maioria dos parâmetros clínicos não apresentaram correlação estatisticamente significativa com nenhum dos tipos de intensidade de marcação de ITPR3, exceto ALT (p<0.018) e o índice mitótico

($p < 0.0098$), que apresentaram correlação significativa com a intensidade de marcação de ITPR3 tumoral. (TABELA 5).

Tabela 5 – Correlação entre a intensidade de marcação de ITPR3 e dados clínicos.

Parâmetros clínicos	CIRROSE p-valor	TUMOR p-valor
MELD	0.395	0.393
AFP (ng/mL)	0.703	0.781
BT (mg/dL)	0.496	0.694
RNI	0.403	0.344
Creatinina (mg/dL)	0.216	0.248
ALT (U/L)	0.410	0.281
AST (U/L)	0.497	0.018
ALB (g/dL)	0.845	0.919
Mitoses (10 HPF)	---	0.0098
Tamanho dos nódulos (cm)	0.623	0.684

Modelo para doença hepática terminal (MELD); α -fetoproteína (AFP); Bilirrubina total (BT); *international normalized ratio* (INR); Creatinina; Alanina aminotransferase (ALT, * $p < 0.098$, pós-teste de Spearman); Aspartato aminotransferase (AST); Albumina (ALB); Contagem de figuras mitóticas em 10 campos de grande aumento (10 CGA, ** $p < 0.098$, pós-teste T) e tamanho dos nódulos.

5.5 - Correlação da intensidade de marcação de ITPR3 e índice mitótico

Após realizada a contagem das figuras mitóticas nas amostras disponíveis, avaliamos a relação entre as intensidades de marcação de ITPR3 das mesmas amostras entre aquelas apresentaram baixo índice mitótico (≤ 5) e alto índice mitótico (>5). A maioria dos casos ($n=22$; 62,8%) apresentou baixo índice mitótico, sendo que a minoria ($n=13$; 37,2%) se mostrou com alto índice mitótico. Além disso, observamos que houve uma tendência dos casos que apresentaram maiores intensidades de marcação de ITPR3 se mostrarem com menores índices mitóticos. Contrariamente, os casos que apresentaram menores intensidades de marcação de ITPR3, mostraram maiores índices mitóticos (FIGURA 4).

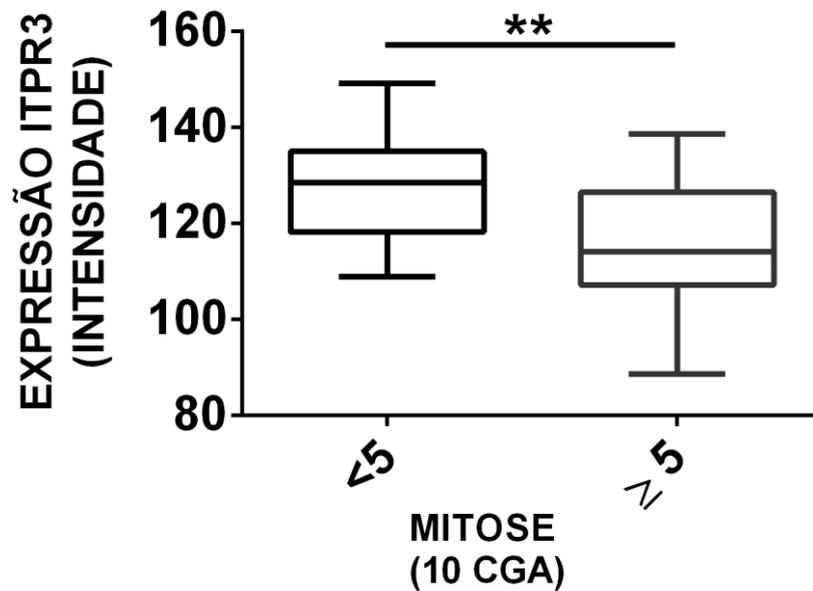


Figura 4: Gráfico representativo da análise de correlação entre a intensidade de marcação de ITPR3 e o índice mitótico. Baixo índice mitótico (<5), alto índice mitótico (≥5); n=35,** p<0.0098 pós-teste T.

5.6 - Correlação da intensidade de marcação de ITPR3 e núcleos positivos para ssDNA

Sabendo que o processo de proliferação celular também depende da apoptose, avaliamos o perfil apoptótico presente em nossas amostras através da marcação de ssDNA, marcador para apoptose, por imunohistoquímica. E o que constatamos foi que a maioria dos casos (n=23; 69,7%) apresentou baixos percentuais apoptóticos (≤50%), e a minoria se mostrou com altos percentuais apoptóticos (n=10; 30,3%). Além disso, observamos que houve uma correlação entre os casos que apresentaram maiores intensidade de marcação de ITPR3 se mostrarem com baixos percentuais apoptóticos. Contrariamente, os casos que apresentaram menores intensidades de marcação de ITPR3, mostrarem maiores percentuais apoptóticos (FIGURA 5).

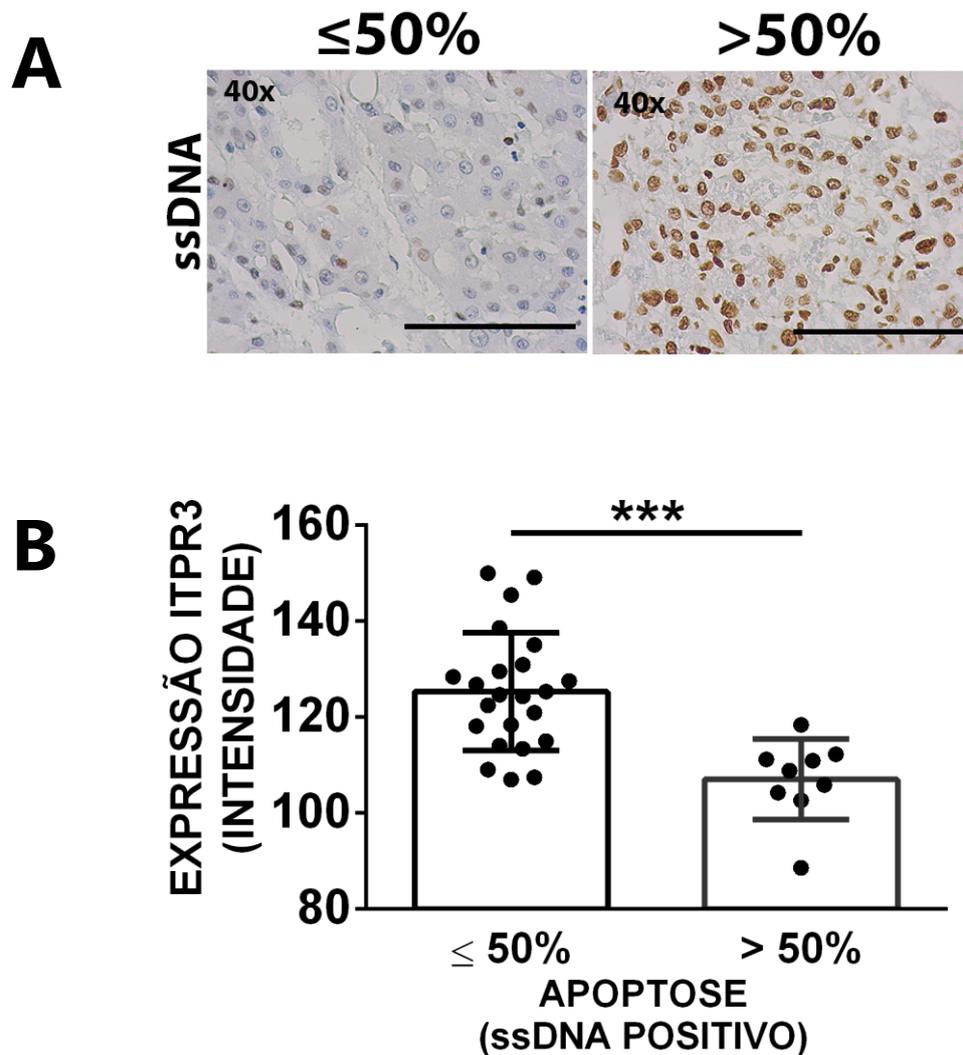


Figura 5: Análise de correlação entre a intensidade de marcação ITPR3 e o percentual apoptótico (ssDNA). (A) Imagens representativas da marcação de ssDNA por imunohistoquímica, à direita, baixa marcação nuclear para ssDNA ($\leq 50\%$); à esquerda, alta marcação para ssDNA ($> 50\%$). Barra de escala, 25 μ m (40x). (B) Gráfico de correlação entre intensidade de marcação de ITPR3 e percentual apoptótico. Baixo percentual apoptótico ($\leq 50\%$), alto percentual apoptótico ($> 50\%$); n=33, *** p<0.0003 pós-teste T.

5.7 - Correlação do índice mitótico e percentual apoptótico

Ao observarmos o comportamento similar do índice mitótico e percentual apoptótico em relação às intensidades de marcação de ITPR3 tumoral, avaliamos se esses dois parâmetros se correlacionavam no CHC. Em nosso estudo, apoptose e mitose estabelecem uma relação direta, onde quanto maior os índices mitóticos, maiores são as porcentagens de

apoptose. E o contrário é verdadeiro, visto que quanto menor os índices mitóticos, menores são as porcentagens de apoptose (FIGURA 6).

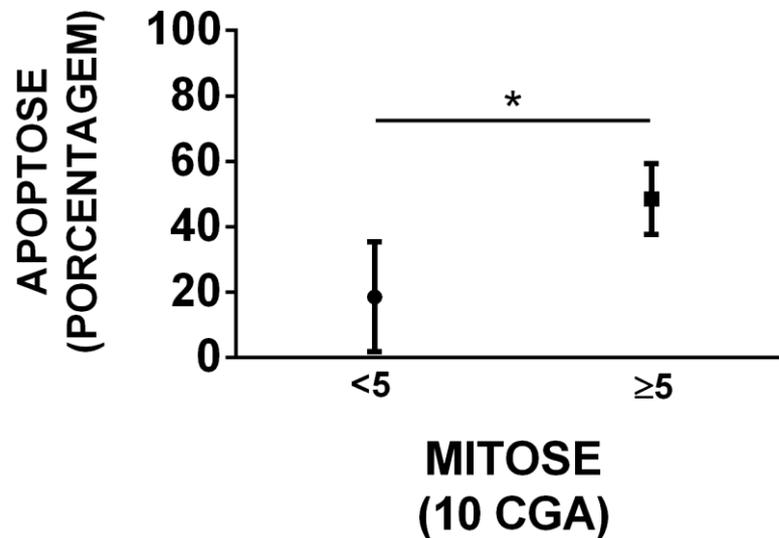


Figura 6: Análise de correlação entre índice mitótico e porcentagem de apoptose. Observa-se que quanto maiores os índices mitóticos (≥ 5), maiores as porcentagens de apoptose. Da mesma forma, quanto menores os índices mitóticos (< 5), menores as porcentagens de apoptose; $n=15$, * $p<0.0220$ pós-teste T.

Para correlacionar os parâmetros clínicos categóricos, em sua totalidade representando características morfo-histológicas, utilizamos o Teste t em sua maioria, visto que apresentaram distribuição normal. A correlação feita com a categoria “padrão histológico” o teste ANOVA foi empregado. E o que observamos, é que não houve nenhuma correlação estatisticamente significativa entre os parâmetros disponíveis com as médias das intensidades de marcação de ITPR3 (TABELA 6).

Tabela 6 – Correlação entre a intensidade de marcação de ITPR3 e parâmetros anatomopatológicos.

Parâmetros anatomopatológicos	CIRROSE p-valor	TUMOR p-valor
Número de nódulos	0.120	0.296
Invasão vascular	0.637	0.746
Necrose	0.114	0.461
Fibrose	0.752	0.456
Inflamação tumoral	0.383	0.552
Características intracelulares	0.927	0.825
Grau de diferenciação	0.677	0.668
Padrão histológico*	0.601	0.941

Valores obtidos pós- teste T; *Valores obtidos pós-teste ANOVA.

6 - DISCUSSÃO

O aparecimento do ITPR3 em hepatócitos no contexto do CHC acontece através de eventos de modificação epigenética (GUERRA *et al.*, 2019). A região promotora do ITPR3 é constituída de 16 ilhas CpG (GUERRA *et al.*, 2019), que são locais de metilação iminentes na possibilidade de suprimir a expressão gênica (CHEN & RIGGS, 2012). No CHC, há hipometilação da maioria dessas ilhas identificadas, viabilizando a expressão do ITPR3 (GUERRA *et al.*, 2019). Além disso, constatou-se também que as regiões promotoras das outras isoformas, ITPR1 e ITPR2, já estavam desmetiladas em hepatócitos normais (GUERRA *et al.*, 2019), corroborando com o conhecimento de que ITPR1 e ITPR2 são constitutivamente expressos em hepatócitos (CRUZ *et al.*, 2010). A partir disso, através do presente estudo, avaliou-se o perfil de expressão do ITPR3 em CHCs de três diferentes etiologias: HCV, DHA e CC advindos de amostras humanas que foram submetidos ao transplante hepático. Além disso, avaliou-se também a correlação desse perfil de expressão com alguns parâmetros clínicos importantes. Com a metodologia descrita, visou-se investigar a influência da expressão *de novo* de ITPR3 no fígado e correlacionar com o estadiamento do HCC.

Nosso grupo amostral apresenta uma dominância de pacientes do sexo masculino (84,9%) em relação ao sexo feminino (15,1%). Isso reflete a incidência de CHC mundialmente, onde a doença representa 6,3% de todos os cânceres em pessoas do sexo masculino, enquanto no sexo feminino é de 2,8% (GLOBOCAN, 2018). Os motivos para essa disparidade entre os sexos incluem diversos fatores, como a maior prevalência de infecções virais persistentes, abuso do consumo de álcool e tabaco maior em homens do que em mulheres (WANDS, 2007). Além disso, fatores genéticos e hormonais também podem ser agentes influenciadores, visto que há evidências em modelo animal mostrando que a castração ou a administração de estrogênios minimizam a taxa de formação de CHC em camundongos machos (NAKATANI *et al.*, 2001).

No âmbito da distribuição das etiologias, neste estudo tivemos uma maior prevalência de CHCs oriundos de infecção por HCV (58,5%), seguido por DHA (30,2%) e CC (11,35%). Esse cenário é corroborado por dados do Registro Científico de Destinatários de Transplantes sobre as transformações na indicação de transplante hepático entre os anos de 2001 e 2009. De acordo com esse estudo, HCV e DHA figuram entre as duas principais indicações para transplante hepático, com NASH ocupando o terceiro lugar (CHARLTON *et al.*, 2011). O

mesmo conjunto de dados também destaca o considerável aumento do número de indicações de transplante por NASH, enquanto as taxas de CC diminuíram no decorrer do mesmo recorte temporal (CHARLTON *et al.*, 2011). Isso indica uma forte relação, pois, embora a etiologia subjacente exata da CC seja obscura, existem fortes correlações onde a NASH desempenha um papel protagonista (CALDWELL, 2010). Um estudo mais recente mostrou que NASH continua a aumentar como indicação para transplante, excedendo DHA como a segunda principal indicação para transplante hepático (WONG *et al.*, 2015).

A elucidação de eventos primordiais que promovem o surgimento e progressão de tumores possibilitou o delineamento de novas perspectivas para o desenvolvimento de novos alvos e biomarcadores que influenciam decisões no tratamento do CHC (ZUCMAN-ROSSI *et al.*, 2015). Dentre essas elucidações, as classificações moleculares têm como objetivo viabilizar o entendimento da complexidade molecular dos diversos eventos biológicos que orientam as subclasses do tumor e também na definição de biomarcadores e alvos pontuais para tratamentos (ZUCMAN-ROSSI *et al.*, 2015). A elaboração do perfil de expressão completo do genoma que ocorreu no fim da década de 90 trouxe importantes fagulhas de conhecimento na biomedicina (GOLUB *et al.*, 1999). A hipótese era que, embora no mesmo estágio clínico, os tumores possuem disparidades significativas no contexto molecular. As inferências são enormes, visto que as decisões na oncologia dependem, em primeira instância, do estadiamento clínico e dificilmente considera as inconsistências moleculares do tumor (ZUCMAN-ROSSI *et al.*, 2015). O conhecimento dessas características moleculares no CHC derivaram duas vertentes de conhecimento: 1) sua relevância como biomarcador prognóstico ou preditivo; 2) a possibilidade de potencializar o entendimento da patogênese molecular que envolve a doença (ZUCMAN-ROSSI *et al.*, 2015).

Diversos grupos se empenharam para relatar a classificação molecular com base nas características genômicas para o CHC (GUICHARD *et al.*, 2012; HOSHIDA *et al.*, 2013; LEE *et al.*, 2006; YAMASHITA *et al.*, 2008). A análise integrativa mostra que a maioria destes estudos pontuou traços genômicos comuns que espelham os processos biológicos subjacentes (VILLANUEVA *et al.*, 2011). Ou seja, diferentes pesquisas identificaram subclasses moleculares que agruparam pacientes similares, levando em conta alterações gênicas centrais. A partir disso, mesmo com as denominações específicas para cada classe, o CHC pode ser distribuído em duas classes moleculares principais (HOSHIDA *et al.*, 2009). Uma é extensamente caracterizada por uma maior disponibilidade de sinais envolvidos na proliferação e progressão de células no ciclo celular (classe de proliferação) e, no geral, está relacionada à um perfil mais agressivo; a segunda classe geralmente conserva características

moleculares parecidas à fisiologia hepática normal (classe de não proliferação) (ZUCMAN-ROSSI *et al.*, 2015).

As principais características da classe de proliferação, que representa cerca de 50% dos pacientes, estão associadas à ativação de cascatas de sinalização implicadas na proliferação/sobrevivência celular, aumento de assinaturas de mal prognóstico e relação com características clínicas de tumores agressivos e desfechos negativos (ZUCMAN-ROSSI *et al.*, 2015). Somado a isso, a classe também agrega o enriquecimento de sinais genômicos que marcam células progenitoras, como a molécula de adesão de células epiteliais (YAMASHITA & WANG, 2013). Os tumores dessa classe apresentam alta plasticidade e heterogeneidade devido a taxas mais altas de instabilidade cromossômica ou em deturpações epigenéticas em grande escala (VILLANUEVA *et al.*, 2015; ZUCMAN-ROSSI *et al.*, 2015). Sob o olhar clínico, os pacientes da classe de proliferação possuem tumores agressivos, com níveis mais elevados de AFP, diferenciação celular moderada/baixa e frequente invasão vascular (CHIANG *et al.*, 2008; VILLANUEVA *et al.*, 2012), além de apresentarem maiores chances de recorrência após ressecção e menores taxas de sobrevida (LEE *et al.*, 2004; VILLANUEVA *et al.*, 2012). O CHC oriundo da infecção pelo HBV é de maioria pertencente a essa classe (ZUCMAN-ROSSI *et al.*, 2015).

A classe de não proliferação apresenta-se em, no mínimo, duas características centrais: no contexto molecular, há o predomínio da sinalização Wnt em até 25% dos casos, e o restante são caracterizados pela resposta imune; no contexto fisiológico, o transcriptoma tumoral é semelhante à fisiologia hepática normal (ZUCMAN-ROSSI *et al.*, 2015). Um subconjunto de tumores pertencentes a essa classe é especificado por amplos ganhos no cromossomo 7, relacionados à superexpressão do receptor EGF (*epidermal growth factor*) e à predominância do sexo masculino (KENG *et al.*, 2012). Notavelmente, o domínio semelhante de fatores genômicos associados à inflamação também foi observado em análises moleculares em subclasse menos agressiva de colangiocarcinoma intra-hepático (SIA *et al.*, 2013). Sob a perspectiva clínica, os tumores pertencentes a essa classe apresentam traços menos agressivos, como melhor diferenciação células, menor AFP e ausência de domínio em assinatura de mau prognóstico (ZUCMAN-ROSSI *et al.*, 2015). Em relação à etiologia subjacente, o HCV e o CHC relacionado à DHA são mais frequentes nessa classe (ZUCMAN-ROSSI *et al.*, 2015).

Tais características relacionadas à classe de não proliferação são corroboradas em vários pontos com os dados apresentados no presente estudo. Como foi descrito, a influência do sistema imune é uma das características centrais da classe, e 51,1% dos casos aqui analisados, apresentaram infiltrado inflamatório tumoral. Ao partir para as análises clínicas,

observamos que 72,9% dos casos foram classificados nas categorias iniciais (I e II) de acordo com Edmondson e Steiner (1954), ou seja, as que apresentam maior diferenciação celular e menor agressividade. A média do índice de AFP entre nossas amostras foi de 123,78 ng/mL, que foi alta em comparação com o limite considerado normal que é de 20 ng/mL (BALOGH *et al.*, 2016), porém, ainda foi muito menor em relação às concentrações acima de 400 ng/mL, que é o índice categórico no contexto do CHC (MASUZAKI & OMATA, 2011). Extrapolando ainda mais, ao compararmos com os índices acima de 1000 ng/mL, que são os quadros que apresentam maiores chances de recorrência e menor sobrevida (DUVOUX *et al.*, 2012; LEWIN *et al.*, 2015), o índice de AFP apresentado pelo nosso grupo amostral foi ainda expressivamente menor. Com isso, podemos concluir que apesar de fora da normalidade, no geral, os pacientes com CHC avaliados aqui apresentaram baixos níveis de AFP. Em relação às transaminases, as concentrações normais séricas são de 5 a 40 U/L para AST e de 5 a 35 U/L para ALT (HUANG *et al.*, 2006). Os pacientes aqui avaliados apresentaram elevações de ambas as transaminases, com AST apresentando níveis médios em 85,5 U/L e ALT em 91,3 U/L. Ainda assim, são elevações leves e moderadas, com os valores das enzimas hepáticas dentro do limite de cinco vezes superior ao normal (ANDERSON *et al.*, 2000). Em nossa correlação estatística dos parâmetros clínicos com a intensidade de marcação de ITPR3, AST apresentou uma correlação significativa direta com a intensidade de ITPR3 tumoral, porém, somente com esses dados não podemos concluir que tal relação é específica no contexto da hepatocarcinogênese, visto que AST está presente em outros órgãos (HUANG *et al.*, 2006). Por isso, níveis de AST podem elevar-se sozinhos, sem nenhuma ligação com ALT (ANDERSON *et al.*, 2000). INR apresentou seu valor máximo de 2,690 e, ainda assim, comparando com os níveis adequados para uma anticoagulação eficaz e segura, para a maioria das indicações que é entre 2,0 e 3,0 (KITCHEN & PRESTON, 1999), está dentro da normalidade. No contexto etiológico, todas as hepatopatias subjacentes aqui amostradas são as que geralmente apresentam características da classe de não proliferação. Sendo assim, esse pode ser um fator contribuinte e interferente nas correlações entre as intensidades de ITRP3 tumoral e do parênquima cirrótico com os parâmetros clínicos e anatomopatológicos, visto que pacientes aqui avaliados, no geral, apresentam tumores com um perfil de menor agressividade, podendo haver um outro perfil de expressão de ITPR3 e outras correlações clinico-patológicas em tumores da classe de proliferação, tornando esse um novo alvo de estudos.

O aumento da potencialidade proliferativa é um clássico traço tumoral, em especial devido à autossuficiência de sinais de crescimento, insensibilidade a sinais de anti-

crescimento e potencial replicativo ilimitado (HANAHAN & WEINBERG, 2011). A importância prognóstica do índice mitótico na sobrevivência do paciente e do estágio tumoral é atestada em diversos cânceres, entre eles o de mama e de ovário (BLOOM & RICHARDSON, 1957; VANG; SHIH; KURMAN, 2010). No conjuntura do CHC, estudos precedentes sugeriram um iminente papel do alto índice mitótico como um indicador prognóstico desfavorável (HARAFAKE; TAKEDA; KASAI; *et al.*, 1993; NANASHIMA *et al.*, 2003; SOINI *et al.*, 1996; TANNAPFEL *et al.*, 1999). Mais recentemente, um estudo mostrou que o alto índice mitótico é um fator preditivo independente para a sobrevivência a curto prazo em pacientes que passaram pela hepatectomia curativa para o CHC (HA *et al.*, 2016) e ainda propuseram que tal parâmetro seja utilizado na prática clínica para auxiliar pacientes com a doença. Somado a isso, o alto índice mitótico ($\geq 5/10$ CGA) está relacionado a metástase intra-hepática, maior tamanho do tumor, maiores níveis de AFP e estágio tumoral avançado (HA *et al.*, 2016; OUCHI *et al.*, 2000), além de invasão vascular, baixa diferenciação histológica e alta taxa de recorrência (NANASHIMA *et al.*, 2003). Devido a tamanha relevância, analisamos o índice mitótico em nossas amostras, e observamos que a maioria dos pacientes (62,8%) apresentaram baixo índice mitótico ($< 5/10$ CGA). Isso é corroborado à luz de estudos *in vivo e in vitro* que elucidaram que tanto HCV quanto o etanol acometem negativamente o avanço do ciclo celular, promovendo uma parada no estágio G2/M em linhagens celulares de CHC (ALISI *et al.*, 2005; CLEMENS *et al.*, 2003). Isso pode ser mais uma característica do perfil do nosso grupo amostral, visto que altos índices mitóticos se correlacionam, principalmente, em CHCs com etiologia do HBV (HA *et al.*, 2016).

O índice mitótico em nossas amostras mostrou correlação significativa com a intensidade de expressão de ITPR3 tumoral. Observamos que os dois parâmetros se comportaram de maneira inversa entre si, onde quanto maior a intensidade de ITPR3, menor é o número de figuras mitóticas. Por outro lado, quanto menor a intensidade de ITPR3, maior foi o número de mitoses. Esse dado pode se mostrar contraditório, visto que é elucidado que ITPR3 está envolvido no processo de proliferação celular, em especial em células hepáticas (BERRIDGE; BOOTMAN; RODERICK, 2003a; GUERRA, MATEUS *et al.*, 2019; RODRIGUES *et al.*, 2007). Porém, é conhecido que o processo de proliferação celular também é ordenado pela apoptose, tanto na regeneração hepática (GUERRA, MATEUS *et al.*, 2011) quanto em outras malignidades, como no mesotelioma e câncer de próstata (BONONI *et al.*, 2017). O desencadeamento da sinalização de Ca^{2+} através de ITPR3 faz parte dos eventos de morte celular apoptótica (MENDES *et al.*, 2005). Através da marcação de ssDNA

analisamos o nível de apoptose em algumas amostras de CHC, e o que observamos ao compararmos com a intensidade de ITPR3 tumoral foi algo similar ao observado no índice mitótico: quanto maior a intensidade de marcação de ITPR3, menor a marcação para ssDNA, ao passo que quanto menor a intensidade de marcação de ITPR3, maior a marcação para apoptose. Esse resultado é corroborado à luz de um recente estudo, onde mostra que a expressão de ITPR3 em culturas celulares de hepatócitos e células de CHC induz proteção anti-apoptótica por meio do controle da expressão gênica e atividade proteica (GUERRA, MATEUS *et al.*, 2019). Em resumo, tanto o índice mitótico quanto a porcentagem de células apoptóticas se mostraram diminuídos frente ao aumento de ITPR3, enquanto os mesmos parâmetros aumentaram frente a diminuição do canal de cálcio no CHC humano. Ao observamos esse comportamento similar frente ao ITPR3, correlacionamos tais variáveis e observamos que mitose e apoptose se relacionam entre si significativamente dentro do contexto do CHC humano. Tal elucidação nos permite sugerir que existe um mecanismo subjacente no CHC, envolvendo a sinalização intracelular de Ca^{2+} e o ITPR3, que promove uma espécie de ação compensatória a favor do tumor. Isso se dá ao vermos que quanto mais células morrem por apoptose, há mais proliferação, possibilitando assim, a manutenção do número de células do tumor. Porém, isso pode limitar o crescimento tumoral, visto que mais células malignas estão morrendo. Algo parecido acontece no câncer de próstata, onde mecanismos que promovem a degradação do ITPR3 e dificultam a morte celular por apoptose foram elucidados, possibilitando uma nova estratégia terapêutica, visando evitar a degradação do canal de Ca^{2+} e promover a apoptose (KUCHAY *et al.*, 2017).

A relevância do envolvimento de ITPR3 na apoptose está alcançando um lugar de importância como um tópico comum no estudo de câncer (BONONI *et al.*, 2017; SZALAI; KRISHNAMURTHY; HAJNOCZKY, 1999). Embora o ITPR3 possa participar tanto da inibição quanto da promoção apoptótica, dependendo do tipo do tumor (GUERRA, MATEUS *et al.*, 2019). Os ITPRs podem se associar aos canais de ânions dependentes de voltagem presentes na membrana mitocondrial externa via GRP75, uma proteína chaperona residente na matriz mitocondrial, estabelecendo uma espécie de “sinapse” que facilita a transmissão de cálcio do lúmen do RE para a mitocôndria (SZABADKAI *et al.*, 2006). A concentração excessiva de Ca^{2+} mitocondrial fomenta a abertura do poro de transição de permeabilidade, com extravasamento do conteúdo mitocondrial para a região citoplasmática e, conseqüentemente, a promoção da apoptose através da formação do apoptosoma (ICHAS; JOUAVILLE; MAZAT, 1997; SZALAI; KRISHNAMURTHY; HAJNOCZKY, 1999). A isoforma 3 do ITPR é especialmente eficaz na modulação do Ca^{2+} mitocondrial e da apoptose,

visto que o citocromo c que vaza da mitocôndria se liga ao ITPR, facilitando a liberação de quantidades tóxicas de Ca^{2+} (BOEHNING *et al.*, 2003). Mas, sob determinadas circunstâncias, o ITPR3 não dispõe de inibição por *feedback* em situações de altas concentrações de Ca^{2+} , que é exibida pelo ITPR1, por exemplo (HAGAR *et al.*, 1998). Sendo assim, o ITPR3 pode dar início a um ciclo de retroalimentação positiva para a sinalização de Ca^{2+} , estabelecendo a formação de poros de transição de permeabilidade e liberação do citocromo c. Contudo, há uma variabilidade de maneiras como o ITPR3 pode modular e afetar a apoptose em diversos tipos tumorais. Por exemplo, no âmbito do melanoma e do mesotelioma, deturpações na expressão do ITPR3, envolvendo desubiquitinação e estabilização molecular, foram associadas à perda do supressor tumoral BAP1, que estabiliza o ITPR3. A ausência de BAP1, então, leva a perda de ITPR3 e, conseqüentemente, minimiza sinais apoptóticos de Ca^{2+} mitocondrial (BONONI *et al.*, 2017). No câncer de próstata, a deterioração do ITPR3 foi vinculada a mutações em PTEN, que competem com o FBXL2 para impedir que ele se ligue e que degrade o ITPR3. Na falta de PTEN, ou a presença de formas mutantes, a degradação de ITPR3 é maximizada, levando a diminuição da apoptose (KUCHAY *et al.*, 2017). O aparecimento de ITPR3 também foi relatado em câncer de cólon e, nesse caso, o canal de Ca^{2+} foi relacionado a um pior prognóstico, com aumento de metástase, diminuição da sobrevivência do paciente e da apoptose (SHIBAO *et al.*, 2010). No cenário da hepatocarcinogênese, o ITPR3 também está associado à uma menor sobrevivência e resistência a sinais apoptóticos (GUERRA, MATEUS *et al.*, 2019). O presente trabalho corroborou tais elucidações em amostras de CHC humanas, dando ainda mais embasamento científico para tal evento.

Ao partirmos para a análise do perfil de intensidade de marcação do ITPR3 nas amostras humanas aqui utilizadas, observamos que a marcação é dispersa por todo o citoplasma do hepatócito e, em alguns casos, podemos observar uma marcação mais evidente na região perinuclear. Isso é corroborado com experimento de microscopia de super resolução feito em HepG2, onde relataram a distribuição dispersa do ITPR3 por todo o citosol, e uma co-localização de cerca de ~15% com mitocôndrias (GUERRA, MATEUS *et al.*, 2019). O mesmo estudo também mostrou que o ITPR3 também foi expresso na região perinuclear de HepG2, potencializando a chance deste canal de Ca^{2+} ser um contribuinte para o desenvolvimento de CHC (GUERRA, MATEUS *et al.*, 2019). Fazendo outro paralelo, um outro grupo de pesquisa analisou a marcação desta mesma isoforma de canal de Ca^{2+} no câncer de cólon humano, e observaram que o ITPR3 aparecia nos colonócitos em forma de agregados em ilhas, principalmente concentrados no limite invasivo do tumor (SHIBAO *et*

al., 2010). Porém, não foi o que observamos em nosso trabalho, visto que a marcação para ITPR3 foi dispersa por todo o tecido tumoral e parênquima cirrótico adjacente no fígado, sem a aglomeração em focos pontuais. Isso pode refletir o caráter importante de que, além do aparecimento da isoforma, a localização subcelular e tecidual ocupada pela mesma em diferentes órgãos, pode ocasionar diversas ações.

A natureza retrospectiva do presente estudo pode apresentar-se como uma limitação, uma vez que algumas informações clínicas foram perdidas. Porém, isso não impossibilitou o delineamento de metodologias e análises robustas para a obtenção dos resultados que se mostraram significativos.

7 - CONCLUSÃO

Os resultados corroboram a hipótese de que o aumento da expressão da isoforma 3 do ITPR participa de condições clínicas e anatomopatológicas no contexto do CHC humano, mais especificamente na proliferação celular por mitose e morte celular por apoptose.

O conjunto de dados aqui apresentados, sugerem e reforçam ainda mais estudos precedentes que mostram que o aparecimento de ITPR3 no âmbito da hepatocarcinogênese é um evento comum entre diferentes etiologias, é antecedente à formação do tumor e promove uma ação protetiva contra sinais apoptóticos externos em hepatócitos malignos de linhagem celular tumoral. Sendo assim, o presente trabalho se mostra com um papel importante na contribuição para o conhecimento da integração entre eventos moleculares e aspectos clínicos e anatomohistopatológicos do CHC em âmbito translacional. Além disso, elucidamos que há participação da sinalização intracelular de Ca^{2+} via ITPR3 em um mecanismo inerente à hepatocarcinogênese, como uma espécie de ação compensatória, onde quanto mais mortes por apoptose, maior é a proliferação, a título de sustentar a manutenção tumoral. Tais dados, carecem de maiores estudos futuros para o conhecimento detalhado dos elementos envolvidos em tal mecanismo e, possivelmente, a formulação de novas ações de tratamento.

REFERÊNCIAS

- AGNI, R.M. Diagnostic histopathology of hepatocellular carcinoma: A case-based review. *Seminars in Diagnostic Pathology*, [S.I], v.34, n.2, p. 126–137, 2017.
- AGUIAR, M.I.F.D *et al.* Qualidade de vida em receptores de transplante de fígado e a influência dos fatores sociodemográficos. *Journal of School of Nursing - University of São Paulo, São Paulo*, v. 50, n. 3, p. 411–418, 2016.
- ALISI, A *et al.* Thr 446 Phosphorylation of PKR by HCV Core Protein Deregulates G2 / M Phase in HCC Cells. *Journal of Cellular Physiology*, [S.I] v. 31, n. 10, p. 25–31, 2005.
- AMAYA, M. J; NATHANSON, M. H. Calcium signaling in the liver. *Comprehensive Physiology*, [S.I], v. 3, n. 1, p. 515–539, 2013.
- AMAYA, M.J; NATHANSON, M. H. Cell Calcium Calcium signaling and the secretory activity of bile duct epithelia. *Cell Calcium*, [S.I], v. 55, n. 6, p. 317–324, 2014.
- ANDERSON, F.H *et al.* An assessment of the clinical utility of serum ALT and AST in chronic hepatitis C. *Hepatology Research*, [S.I],v. 18, p. 63–71, 2000.
- ARRUDA, A.P; HOTAMISLIGIL, G.S. Calcium Homeostasis and Organelle Function in the Pathogenesis of Obesity and Diabetes. *Cell Metabolism*, [S.I], v. 22, n. 7, p. 381–397, 2015.
- BAAK, J.P.A. Mitosis Counting in Tumors. *Human Pathology*, [S.I],v. 21, n. 7, p. 683–685, 1990.
- BALOGH, J. *et al.* Hepatocellular carcinoma: a review. *Journal of Hepatocellular Carcinoma*, [S.I], v. 3, n. 10, p. 41–53, 2016.
- BATALLER, R; BRENNER, D.A. Liver fibrosis. *The Journal of Clinical Investigation*, [S.I], v. 115, n. April, p. 209–218, 2005.
- BENJAMIN, A. J *et al.* Liver transplant offers a survival benefit over margin negative resection in patients with small unifocal hepatocellular carcinoma and preserved liver function. *Surgery*, [S.I], v. 163, n. 3, p. 582–586, 2018.
- BERENGUER, M *et al.* Clinical Benefits of Antiviral Therapy in Patients with Recurrent Hepatitis C Following Liver Transplantation. *American Journal of Transplantation*, [S.I], v. 8, p. 679–687, 2008.
- BERENGUER, M. *et al.* HCV-related fibrosis progression following liver transplantation: increase in recent years. *Journal of Hepatology*, [S.I], v. 32, p. 673–684, 2000.
- BERRIDGE, M. J.; BOOTMAN, M.D.; RODERICK, H. L. Calcium signalling: Dynamics, homeostasis and remodelling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, [S.I], v. 4, n. 7, p. 517–529, 2003a.

- BERRIDGE, M.J; BOOTMAN, M.D; RODERICK, H.L. CALCIUM SIGNALLING: DYNAMICS, HOMEOSTASIS AND REMODELLING. *Nature Reviews*, [S.I], v. 4, n. 7, p. 517–529, 2003b.
- BERRIDGE, M.J; LIPP, P; BOOTMAN, M.D. The versatility and universality of calcium signalling. *Nature Reviews*, [S.I], v. 1, n. 10, p. 11–21, 2000.
- BEZPROZVANNY, L; WATRAS, J; EHRLICH, B.E. Bell-shaped calcium-response curves of Ins(1,4,5)P₃- and calcium-gated channels from endoplasmic reticulum of cerebellum. *Nature*, [S.I], v. 351, n. June, p. 751–754, 1991.
- BITTENCOURT, P. L; FARIAS, A. Q; COUTO, C. A. Liver Transplantation in Brazil. *Transplant International*, [S.I], v. 22, n. 9, p. 1254–1258, 2016.
- BLOOM, H.J.G; RICHARDSON, W.W. Histological Grading and Prognosis in Brest Cancer a Study os 1409 Cases of Which 359 Have Been Followed for 15 Years. *British Journal of Cancer*, [S.I], v. 11, p. 359–377, 1957.
- BOEHNING, D. *et al.* Cytochrome c binds to inositol (1,4,5) trisphosphate receptors, amplifying calcium-dependent apoptosis. *Nature Cell Biology*, [S.I], v. 5, n. 12, p. 1051–1061, 2003.
- BONONI, A. *et al.* BAP1 regulates IP₃R3-mediated Ca²⁺ flux to mitochondria suppressing cell transformation. *Nature*, [S.I], v. 546, n. 6, p. 549–553, 2017.
- BRESSAC, B. *et al.* Selective G to T mutations of p53 gene in hepatocellular carcinoma from southern Africa. *Nature*, [S.I], v. 350, n. 4, p. 429–431, 1991.
- BRUIX, J; REIG, M; SHERMAN, M. Evidence-Based Diagnosis, Staging, and Treatment of Patients with Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology*, [S.I], v. 150, n. 4, p. 836–853, 2016.
- BURBELO, P.D. *et al.* Serology-Enabled Discovery of Genetically Diverse Hepaciviruses in a New Host. *Journal of Virology*, [S.I], v. 86, n. 11, p. 6171–6178, 2012.
- CABIESES, B. *et al.* ¿Cómo se ha medido la posición social en investigación en salud? Una revisión de la literatura internacional. *Revista Panamericana de Salud*, [S.I], v. 29, n. 6, p. 457–468, 2011.
- CALADO, R.T.; YOUNG, N.S. Telomere Diseases. *New England Journal of Medicine*, [S.I], v. 361, n. 24, p. 2353–2365, 2009.
- CALDERARO, J. *et al.* Histological subtypes of hepatocellular carcinoma are related to gene mutations and molecular tumour classification. *Journal of Hepatology*, [S.I], v. 67, n. 4, p. 727–738, 2017.
- CALDWELL, Stephen. Cryptogenic Cirrhosis: What Are We Missing? *Current*

Gastroenterology Reports, [S.I], v. 12, n. 1, p. 40–48, 2010.

CHAIB, E. *et al.* The Impact of the Introduction of MELD on the Dynamics of the Liver Transplantation Waiting List in São Paulo , Brazil. *Journal of Transplantation*, [S.I], v. 2014, n. 11, p. 1–4, 2014.

CHANG, T-S. *et al.* Alpha-Fetoprotein Measurement Benefits Hepatocellular Carcinoma Surveillance in Patients with Cirrhosis. *The American Journal of Gastroenterology*, [S.I], v. 110, n. 6, p. 836–844, 2015.

CHARLTON, M.R. *et al.* Frequency and Outcomes of Liver Transplantation for Nonalcoholic Steatohepatitis in the United States. *YGASt*, [S.I], v. 141, n. 4, p. 1249–1253, 2011.

CHEDID, M.F. *et al.* Hepatocellular Carcinoma: Diagnosis and Operative Management. *ABCD. Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva (São Paulo)*, [S.I], v. 30, n. 4, p. 272–278, 2017.

CHEN, Z-X; RIGGS, A.D. DNA Methylation and Demethylation in Mammals. *The Journal of Biological Chemistry*, [S.I], v. 286, n. 21, p. 18347–18353, 2012.

CHIANG, D.Y. *et al.* Focal Gains of VEGFA and Molecular Classification of Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Research*, [S.I], v. 68, n. 16, p. 6779–6789, 2008.

CLAVIEN, P.A. *et al.* Recommendations for liver transplantation for hepatocellular carcinoma: an international consensus conference report. *Lancet Oncology*, [S.I], v. 13, n. 1, p. e1–e21, 2012.

CLEMENS, D.L. *et al.* Ethanol Metabolism Results in a G2/M Cell-Cycle Arrest in Recombinant Hep G2 Cells. *Hepatology*, [S.I], v. 38, n. 2, p. 385–393, 2003.

COLLI, A. *et al.* Accuracy of Ultrasonography , Spiral CT , Magnetic Resonance , and Alpha-Fetoprotein in Diagnosing Hepatocellular Carcinoma : A Systematic Review. *American Journal of Gastroenterology*, [S.I], v. 101, n. 3, p. 513–523, 2006.

CONTOS, M.J. *et al.* Development of Nonalcoholic Fatty Liver Disease After Orthotopic Liver Transplantation for Cryptogenic Cirrhosis. *Liver Transplantation*, [S.I], v. 7, n. 4, p. 363–373, 2001.

CRAIG, J.R; PETERS, R.L; OMATA, M. Fibrolamellar Carcinoma of the Liver. *American Cancer Society*, [S.I], v. 46, n.2, p. 372–379, 1980.

CRAWFORD, J.M. Histologic Findings in Alcoholic Liver Disease Steatosis Alcoholic hepatitis Cirrhosis Mallory bodies Fibrosis. *Clinics in Liver Disease*, [S.I], v. 16, n. 4, p. 699–716, 2012.

CROAGER, E.J; SMITH, P.GJ; YEOH, G.C.T. Ethanol interactions with a choline-deficient ,

- ethionine- supplemented feeding regime potentiate pre-neoplastic cellular alterations in rat liver induced by a choline-deficient , ethionine-supplemented immunochemical techniques and northern analysis . *Ov. Carcinogenesis*, [S.I], v. 23, n. 10, p. 1685–1693, 2002.
- CRUZ, L.N. *et al.* Regulation of multidrug resistance-associated protein 2 by calcium signaling in mouse liver. *Hepatology*, [S.I], v. 52, n. 1, p. 327–337, 2010.
- DUFOUR, J.F.*et al.* Expression of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor isoforms in rat cirrhosis. *Hepatology*, [S.I], v. 30, n. 4, p. 1018–1026, 1999.
- DUVOUX, C. *et al.* Liver Transplantation for Hepatocellular Carcinoma : A Model Including α -Fetoprotein Improves the Performance of Milan Criteria. *YGAST*, [S.I], v. 143, n. 4, p. 986–994.e3, 2012.
- EASL. Guidelines EASL Recommendations on Treatment of Hepatitis C 2015. *Journal of Hepatology*, [S.I], v. 63, n. 1, p. 199–236, 2015.
- ECHEVARRIA, W. *et al.* Regulation of calcium signals in the nucleus by a nucleoplasmic reticulum. *Nature Cell Biology*, [S.I], v. 5, n. 5, p. 440–446, 2003.
- EDMONDSON, H.A; STEINER, P.E. Primary Carcinoma of the Liver: a study of 100 cases among 48.900 necropsies. *Revista de la Facultad de Ciencias Medicas Cordoba*, [S.I], v. 22, n. 7, p. 329–335, 1964.
- EL-SERAG, Hashem B. Epidemiology of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, [S.I], v. 142, n. 6, p. 1264–1273.e1, 2012.
- EL-SERAG, H.B.; RUDOLPH, K.L. Hepatocellular Carcinoma: Epidemiology and Molecular Carcinogenesis. *Gastroenterology*, [S.I], v. 132, n. 7, p. 2557–2576, 2007.
- FARAZI, P.A; DEPINHO, R.A. Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment. *Nature Reviews Cancer*, [S.I], v. 6, n. 7, p. 674–687, 2006.
- FATOUROU, E. *et al.* Keratin 19 protein expression is an independent predictor of survival in human hepatocellular carcinoma. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, [S.I], v. 27, n. 9, p. 1094–1102, 2015.
- FERIOD, C.N. *et al.* Hepatic inositol 1,4,5 trisphosphate receptor type 1 mediates fatty liver. *Hepatology Communications*, [S.I], v. 1, n. 1, p. 23–35, 2017.
- FERNÁNDEZ-CARRILLO, C. *et al.* Treatment of Hepatitis C Virus in Patients with Advanced Cirrhosis_ Always Justified? Analysis of the Hepa-C Registry. *Journal of Hepatology*, [S.I], v. 64, n. April, p. 2016, 2016.
- FERREIRA, Roberto *et al.* Transplante de fígado : história , resultados e perspectivas Liver transplantation : history , outcomes and perspectives. *Einstein*, [S.I] v. 13, n. 1, p. 149–152, 2015.

- FORNER, Alejandro; REIG, María; BRUIX, Jordi. Hepatocellular carcinoma. *The Lancet*, [S.I.], v. 391, n. 03, p. 1301–1314, 2018.
- FRANÇA, A. *et al.* Effects of Endotoxin on Type 3 Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor in Human Cholangiocytes. *Hepatology*, [S.I.], v. 69, n. 2, p. 817–830, 2019.
- FRANCESCHINI, D. *et al.* Polyfunctional Type-1, -2, and -17 CD8⁺ T Cell Responses to Apoptotic Self-Antigens Correlate with the Chronic Evolution of Hepatitis C Virus Infection. *PLoS ONE*, [S.I.], v. 8, n. 6, p. 1–16, 2012.
- FREEMAN, R.B. *et al.* Improving liver allocation : MELD and PELD. *American Journal of Transplantation*, [S.I.], v. 4, n. Suppl.9, p. 114–131, 2004.
- FUJIMOTO, M. *et al.* Plasma Endotoxin and Serum Cytokine Levels in Patients With Alcoholic Hepatitis : Relation to Severity of Liver Disturbance. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, [S.I.], v. 24, n. 4, p. 48–54, 2000.
- GALLE, P.R. *et al.* Clinical Practice Guidelines Of Hepatology EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology*, [S.I.], v. 69, n. 1, p. 182–236, 2018.
- GASPERS, L.D; THOMAS, A.P. Calcium signaling in liver. *Cell Calcium*, [S.I.], v. 38, n. 6, p. 329–342, 2005.
- GELU-SIMEON, M. *et al.* Imaging Features and Prognosis of Hepatocellular Carcinoma in Patients with Cirrhosis Who Are Coinfected with Human Immunodeficiency Virus and Hepatitis C Virus. *Radiology*, [S.I.], v. 277, n. 2, p. 443–453, 2015.
- GOLABI, P. *et al.* Liver Transplantation (LT) for Cryptogenic Cirrhosis (CC) and Nonalcoholic Steatohepatitis (NASH) Cirrhosis: Data from the Scientific Registry of Transplant Recipients (SRTR): 1994 to 2016. *Medicine*, [S.I.], v. 97, n. 31, p. 1–6, 2018.
- GOLDIE, A.S *et al.* Natural Cytokine Antagonists and Endogenous Antiendotoxin Core Antibodies in Sepsis Syndrome. *The Journal the American Medical Association*, [S.I.], v. 274, p. 172–177, 1995.
- GOLUB, T.R *et al.* Molecular Classification of Cancer : Class Discovery and Class Prediction by Gene Expression Monitoring. *Science*, [S.I.], v. 286, n. 10, p. 531–538, 1999.
- GOMES, Dawidson A. *et al.* c-Met must translocate to the nucleus to initiate calcium signals. *Journal of Biological Chemistry*, [S.I.], v. 283, n. 7, p. 4344–4351, 2008.
- GOMES, D.A *et al.* The type III inositol 1,4,5-trisphosphate receptor preferentially transmits apoptotic Ca²⁺ signals into mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, [S.I.], v. 280, n. 49, p. 40892–40900, 2005.
- GOMES, M.A; GONÇALVES, D. Carcinoma hepatocelular: epidemiologia, biologia,

- diagnóstico e terapias. Associação Médica Brasileira, [S.I],v. 9, n. 5, p. 514–524, 2013.
- GOOSSENS, N; HOSHIDA, Y. Hepatitis C virus-induced hepatocellular carcinoma. *Clinical and Molecular Hepatology*, [S.I], v. 21, n. 2, p. 105–114, 2015.
- GOTARDO, D.R.M *et al.* Liver transplantation and quality of life: relevance of a specific liver disease questionnaire. *Liver International*, [S.I], v. 28, n. 1, p. 99–106, 2007.
- GUERRA, M. *et al.* Expression of the type 3 InsP3 receptor is a final common event in the development of hepatocellular carcinoma. *Gut*, 2019.
- GUERRA, M. *et al.* Mitochondrial Calcium Regulates Rat Liver Regeneration Through the Modulation of Apoptosis. *Hepatology*, [S.I], v. 54, n. 1, p. 296–306, 2011.
- GUERRA, M. *et al.* Expression of the type 3 InsP 3 receptor is a final common event in the development of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, [S.I], v. 68, p. 1676–1687, 2019.
- GUICHARD, C. *et al.* Integrated analysis of somatic mutations and focal copy-number changes identifies key genes and pathways in hepatocellular carcinoma. *Nature Genetics*, [S.I], v. 44, n. 6, p. 694–698, 2012.
- GUNES, C; RUDOLPH, K. L. Minireview The Role of Telomeres in Stem Cells and Cancer. *Cell*, [S.I], v. 152, n. 1, p. 2010–2013, 2013.
- HA, S.Y. *et al.* The Prognostic Role of Mitotic Index in Hepatocellular Carcinoma Patients after Curative Hepatectomy. *Cancer Research and Treatment*, [S.I], v. 48, n. 1, p. 180–189, 2016.
- HAGAR, R.E *et al.* Type III InsP3 receptor channel stays open in the presence of increased calcium. *Nature*, [S.I], v. 396, n. 11, p. 81–84, 1998.
- HANAFIAH, K. M. *et al.* Global Epidemiology of Hepatitis C Virus Infection: New Estimates of Age-Specific Antibody to HCV Seroprevalence. *Hepatology*, [S.I], v. 57, n. 4, p. 1333–1342, 2013.
- HANAHAN, D; WEINBERG, R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, [S.I], v. 144, n. 5, p. 646–74, 2011.
- HARAFAKE, J; TAKEDA, S; TAKAHIKO, K. *et al.* Predictable Factors for Estimating Prognosis of Patients after Resection of Hepatocellular Carcinoma. *Cancer*, [S.I], v. 72, n. 4, p. 1178–1183, 1993.
- HARAFAKE, J; TAKEDA, S; KASAI, Takahiko. *et al.* Predictable Factors for Estimating Prognosis of Patients after Resection of Hepatocellular Carcinoma. *Cancer*, [S.I], v. 72, n. 4, p. 1178–1183, 1993.
- HARDINGHAM, G.E *et al.* Distinct functions of nuclear and cytoplasmic calcium in the control of gene expression. *Nature*, [S.I], v. 385, n. 01, p. 260–265, 1997.

- HARTMANN, D. *et al.* Telomerase Gene Mutations Are Associated with Cirrhosis Formation. *Hepatology*, [S.I], v. 53, n. 5, p. 1608–1617, 2011.
- HEIM, M. H; THIMME, R. Innate and adaptive immune responses in HCV infections *Basic. Journal of Hepatology*, [S.I], v. 61, n. 1, p. S14–S25, 2014.
- HEIMBACH, J.K *et al.* AASLD Guidelines for the Treatment of Hepatocellular Carcinoma. *Hepatology*, [S.I], v. 67, n. 1, p. 358–380, 2018.
- HENRY, Z; ARGO, C.K; CALDWELL, S. H. Cryptogenic Cirrhosis. In:WONG, R; GISH, R. 1st ed. Alemanha. cap.18, p. 331-348.
- HENRY, Z.H; CALDWELL, S.H; ARGO, C.K. Nonalcoholic Fatty Liver Disease : Prognosis and Progression of Disease. *Current Hepatology Reports*, [S.I], v. 15, p. 117–124, 2016.
- HERNANDEZ, E. *et al.* The spatial distribution of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor isoforms shapes Ca²⁺ waves. *Journal of Biological Chemistry*, [S.I], v. 282, n. 13, p. 10057–10067, 2007.
- HILL, A. *et al.* High sustained virological response rates using imported generic direct acting antiviral treatment for hepatitis C. *Journal of Virus Eradication*, [S.I], v. 3, p. 200–203, 2017.
- HIRATA, K; DUFOUR, J.F. *et al.* Regulation of Ca²⁺ signaling in rat bile duct epithelia by inositol 1,4,5-trisphosphate receptor isoforms. *Hepatology*, [S.I], v. 36, n. 2, p. 284–296, 2002.
- HIRATA, K; PUSL, T *et al.* The type II inositol 1,4,5, trisphosphate receptor can trigger Ca²⁺waves in rat hepatocytes. *Gastroenterology*, [S.I],v. 122, n. 4, p. 1088–1100, 2002.
- HO, D.W.H *et al.* Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma. *Liver Cancer*, [S.I], v. 5, n. 4, p. 290–302, 2016.
- HOSHIDA, Y *et al.* Integrative Transcriptome Analysis Reveals Common Molecular Subclasses of Human Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Research*, [S.I], v. 69, n. 18, p. 7385–7393, 2009.
- HOSHIDA, Y *et al.* Molecular classification and novel targets in hepatocellular carcinoma: recent advancements. *Seminars in Liver Disease*, [S.I], v. 30, n. 1, p. 35–51, 2013.
- HOSHIDA, Y *et al.* Pathogenesis and prevention of hepatitis C virus-induced hepatocellular carcinoma *Journal of Hepatology Update : Hepatitis C. Journal of Hepatology*, [S.I],v. 61, n. 1, p. S79–S90, 2014.
- HUANG, X-J *et al.* Aspartate Aminotransferase (AST/GOT) and Alanine Aminotransferase (ALT/GPT) Detection Techniques. *Sensors*, [S.I], v. 6, p. 756–782, 2006.
- ICHAS, F; JOUAVILLE, L.S.; MAZAT, J-P. Mitochondria Are Excitable Organelles Capable of Generating and Conveying Franc. *Cell*, [S.I], v. 89, n. 6, p. 1145–1153, 1997.

- JOFFRE, C *et al.* A direct role for Met endocytosis in tumorigenesis. *Nature Cell Biology*, [S.I.], v. 13, n. 5, p. 1–13, 2011.
- JOKELAINEN, K *et al.* In Vitro Alcohol Dehydrogenase-Mediated Acetaldehyde Production by Aerobic Bacteria Representing the Normal Colonic Flora in Man. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, [S.I.], v. 20, n. 6, p. 967–972, 1996.
- JOSHI, K; KOHLI, A; MANCH, R. Alcoholic Liver Disease High Risk or Low Risk for Developing Hepatocellular Carcinoma? *Clinics in Liver Disease*, [S.I.], v. 20, n. 3, p. 563–580, 2016.
- KAMIMURA, S; TSUKAMOTO, H. Cytokine Gene Expression by Kupffer Cells in Experimental Alcoholic Liver Disease. *Hepatology*, [S.I.], v. 22, n. 4, p. 1304–1309, 1995.
- KANWAL, F *et al.* HCV Genotype 3 Is Associated With an Increased Risk of Cirrhosis and Hepatocellular Cancer in a National Sample of U.S. Veterans With HCV. *Hepatology*, [S.I.], v. 60, n. 1, p. 98–105, 2014.
- KARAGOZIAN, R; DERDÁK, Z; BAFFY, G. Obesity-associated mechanisms of hepatocarcinogenesis. *Metabolism: Clinical and Experimental*, [S.I.], v. 63, n. 5, p. 607–617, 2014.
- KATRITCH, V; CHEREZOV, V; STEVENS, R.C. Diversity and modularity of G protein-coupled receptor structures. *Trends in Pharmacological Sciences*, [S.I.], v. 33, n. 1, p. 17–27, 2012.
- KEE, K-M; LU, S-N. Diagnostic efficacy of ultrasound in hepatocellular carcinoma diagnosis. *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology*, [S.I.], v. 11, n. 4, p. 277–279, 2017.
- KENG, V.W *et al.* Sex Bias Occurrence of Hepatocellular Carcinoma in Poly7 Molecular Subclass Is Associated With EGFR. *Hepatology*, [S.I.], v. 57, n. 1, p. 120–130, 2012.
- KHAMPHAYA, T *et al.* Nonalcoholic fatty liver disease impairs expression of the type II inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *Hepatology*, [S.I.], v. 67, n. 2, p. 560–574, 2018.
- KITCHEN, S; PRESTON, F.E. Standardization of Prothrombin Time for Laboratory Control of Oral Anticoagulant Therapy. *Seminars in thrombosis and hemostasis*, [S.I.], v. 25, n. 1, p. 17–25, 1999.
- KLEIN, Walter M *et al.* Primary Liver Carcinoma Arising in People Younger Than 30 Years. *American Society for Clinical Pathology*, [S.I.], v. 124, p. 512–518, 2005.
- KRUGLOV, E.A *et al.* Type 2 Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor Modulates Bile Salt Export Pump Activity in Rat Hepatocytes. *Hepatology*, [S.I.], v. 54, n. 5, p. 1790–1799, 2011.
- KUCHAY, S. *et al.* PTEN counteracts FBXL2 to promote IP3R3- and Ca²⁺-mediated

- apoptosis limiting tumour growth. *Nature*, [S.I],v. 546, n. 22, p.554-558, 2017.
- KUMAR; ABBAS; ASTER. *Robbins & Cotran Patologia: bases patológicas das doenças*. Brasil: Elsevier, 2014.
- LARNEY, S *et al.* Incidence and Prevalence of Hepatitis C in Prisons and Other Closed Settings: Results of a Systematic Review and Meta-Analysis. *Hepatology*, [S.I], v. 58, n. 4, p. 1215–1224, 2013.
- LAZARIDS, K.N.; STRAZZABOSCO, M.; LARUSSO, N.F. The Cholangiopathies : Disorders of Biliary Epithelia. *Gastroenterology* [S.I], v. 127, n. 5, p. 1565–1577, 2004.
- LEE, J-S *et al.* A novel prognostic subtype of human hepatocellular carcinoma derived from hepatic progenitor cells. *Nature Medicine*, [S.I], v. 12, n. 4, p. 410–416, 2006.
- LEE, J-S *et al.* Classification and Prediction of Survival in Hepatocellular Carcinoma by Gene Expression Profiling. *Hepatology*, [S.I], v. 40, n. 3, p. 667–676, 2004.
- LEITE, M. F. *et al.* Nuclear and cytosolic calcium are regulated independently. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, [S.I], v. 100, n. 5, p. 2975–2980, 2003.
- LEMMON, M.A; SCHLESSINGER, J. Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases. *Cell*, [S.I], v. 141, n. 6, p. 1117–1134, 2010.
- LENCIONI, R CROCETT, L. Local-Regional Treatment of Hepatocellular Carcinoma. *Radiology*, [S.I], v. 262, n. 1, p. 43–58, 2012.
- LI, C. *et al.* Bcl-X L affects Ca²⁺ homeostasis by altering expression of inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptors. *PNAS*, [S.I],v. 99, n. 15, p. 9830–9835, 2002.
- LIN, O.S *et al.* Cost-effectiveness of screening for hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis due to chronic hepatitis C. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, [S.I], v. 19, n. 4, p. 1159–1172, 2004.
- LIU, C; RUSSELL, R.M; SEITZ, H.K. Ethanol Enhances Retinoic Acid Metabolism Into Polar Metabolites in Rat Liver via Induction of Cytochrome P450E1. *Gastroenterology*, [S.I], v. 120, n. 1, p. 179–189, 2001.
- LLOVET, J.M. *et al.* Plasma Biomarkers as Predictors of Outcome in Patients with Advanced Hepatocellular Carcinoma. *Clinical Cancer Research*, [S.I], v. 18, n. 8, p. 2290–2301, 2012.
- LOTAN, R. Retinoids in cancer chemoprevention. *The FASEB Journal*, [S.I], v. 10, p. 1031–1039, 1996.
- MANNS, M. P *et al.* Hepatitis C virus infection. *Nature Reviews*, [S.I], v. 3, p. 1–19, 2017.
- MARINHO, A; CARDOSO, S.S; ALMEIDA, V.V. Desigualdade de Transplantes de Órgãos no Brasil: Análise do perfil dos receptores por sexos e raça ou cor. Disponível em: <http://www.ipea.gov.br/portal/index.php?option=com_content&view=article&id=9811>. Acesso em:

5 jun 2019.

MARTINS-FILHO, S.N. *et al.* Histological Grading of Hepatocellular Carcinoma—A Systematic Review of Literature. *Frontiers in Medicine*, [S.I], v. 4, n.11, p. 1–9, 2017.

MAUGER, J-P. Role of the nuclear envelope in calcium signalling. *Biology of The Cell*, [S.I], v. 104, n.2, p. 70-83, 2012.

MAZZAFERRO, V. *et al.* Milan Criteria in Liver Transplantation for Hepatocellular Carcinoma: An Evidence-Based Analysis of 15 Years of Experience. *Liver Transplantation*, [S.I], v. 17, n. 10, p. S44–S57, 2011.

MAZZAFERRO, V. *et al.* Liver Transplantation for the Treatment of Small Hepatocellular Carcinomas in Patients With Cirrhosis. *The New England Journal of Medicine*, [S.I], v. 334, n. 11, p. 693–699, 1996.

MAZZAFERRO, V; BATTISTON, C; SPOSITO, C. Pro (With Caution): Extended Oncologic Indications in Liver Transplantation. *Liver Transplantation*, [S.I], v. 24, n. 1, p. 98–103, 2018.

MCCLAIN, C. J *et al.* Cytokines and Alcoholic Liver Disease. *Alcohol Health & Research World*, [S.I], v. 21, n. 4, p. 317–320, 1997.

MCKILLOP, I.H; SCHRUM, L.W. Role of Alcohol in Liver Carcinogenesis. *Seminars in Liver Disease*, [S.I], v. 29, n. 2, p. 222–232, 2009.

MEER, A.J.V.D *et al.* Association Between Sustained Virological and Advanced Hepatic Fibrosis. *Journal of the American Medical Association*, [S.I], v. 308, n. 24, p. 2584–2593, 2012.

MELDOLESI, J; POZZAN, T. The endoplasmic reticulum Ca²⁺ store: a view from the lumen. *Trends in Biochemical Sciences*, [S.I], v. 4, n. 97, p. 10–14, 1998.

MERCADO-IRIZARRY, A; TORRES, E.A. Cryptogenic Cirrhosis: Current Knowledge and Future Directions. *Clinical Liver Disease*, [S.I], v. 7, n. 4, p. 69–72, 2016.

MICHAEL, M.D *et al.* Loss of Insulin Signaling in Hepatocytes Leads to Severe Insulin Resistance and Progressive Hepatic Dysfunction. *Molecular Cell*, [S.I], v. 6, n. 7, p. 87–97, 2000.

MINAGAWA, N. *et al.* Cyclic AMP Regulates Bicarbonate Secretion in Cholangiocytes Through Release of ATP Into Bile. *Gastroenterology*, [S.I], v. 133, n. 5, p. 1592–1602, 2007.

MINAGAWA, N. *et al.* The Anti-apoptotic Protein Mcl-1 Inhibits Mitochondrial. *The Journal of Biological Chemistry*, [S.I], v. 280, n. 39, p. 33637–33644, 2005.

MURALI, A.R. *et al.* Locoregional Therapy With Curative Intent Versus Primary Liver Transplant for Hepatocellular Carcinoma: Systematic Review and Meta-Analysis.

- Transplantation, [S.I], v. 101, n. 8, p. e249–e257, 2017.
- NAGATA, J. *et al.* Lipid Rafts Establish Calcium Waves in Hepatocytes. *Gastroenterology*, [S.I], v. 133, n. 1, p. 256–267, 2007.
- NAHON, P. *et al.* Single nucleotide polymorphisms and risk of hepatocellular carcinoma in cirrhosis. *Journal of Hepatology*, [S.I], v. 57, n. 3, p. 663–674, 2012.
- NAKATANI, T. *et al.* Sex Hormone Dependency of Diethylnitrosamine-induced Liver Tumors in Mice and Chemoprevention by Leuprorelin. *Japanese Journal of Cancer Research*, [S.I], v. 1, n. 3, p. 249–256, 2001.
- NANASHIMA, A. *et al.* Fibrosis and Inflammatory Activity in Noncancerous Tissue and Mitotic Index of Cancer Tissue in Patients with Hepatocellular Carcinoma Relationship to Clinicopathological Factors and Prognosis After Hepatic Resection. *Digestive Diseases and Sciences*, [S.I], v. 48, n. 8, p. 1517–1522, 2003.
- NATH, B; SZABO, G. Hypoxia and Hypoxia Inducible Factors: Diverse Roles in Liver Diseases. *Hepatology*, [S.I], v. 55, n. 2, p. 622–633, 2012.
- NATHANSON, M.H; BURGSTHALER, A.D; FALLON, M.B. Multistep mechanism of polarized Ca²⁺ wave patterns in hepatocytes. *American Journal of Physiology*, [S.I], v. 267, n. 9, p. G338–G349, 1994.
- NATHANSON, M.H. *et al.* Characterization of cytosolic Ca²⁺ signaling in rat bile duct epithelia. *The American Journal of Physiology*, [S.I] v. 271, n. 34, p. G86–G96, 1996.
- NISHITSUJI, H. *et al.* Hepatitis C Virus Infection Induces Inflammatory Cytokines and Chemokines Mediated by the Cross Talk between Hepatocytes and Stellate Cells. *Journal of Virology*, [S.I], v. 87, n. 14, p. 8169–8178, 2013.
- ONETA, C. M. *et al.* Dynamics of cytochrome P4502E1 activity in man: induction by ethanol and disappearance during withdrawal phase. *Journal of Hepatology*, [S.I], v. 36, p. 47–52, 2002.
- ONG, J. *et al.* Cryptogenic Cirrhosis and Posttransplantation Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Liver Transplantation*, [S.I], v. 7, n. 9, p. 797–801, 2001.
- OSÓRIO, F.M.F. *et al.* Histologic Grade and Mitotic Index as Predictors of Microvascular Invasion in Hepatocellular Carcinoma. *Experimental and Clinical Transplantation*, [S.I], v. 13, n. 5, p. 421–425, 2015.
- OUCHI, K. *et al.* Mitotic Index Is the Best Predictive Resected Hepatocellular Carcinoma. *Digestive Surgery*, [S.I], v. 17, n.1, p. 42–48, 2000.
- PARIKH, N. D.; WALJEE, A. K.; SINGAL, A. G. Downstaging Hepatocellular Carcinoma: A Systematic Review and Pooled Analysis. *Liver Transplantation*, [S.I], v. 21, n. 9, p. 1142–

1152, 2015.

PARTY, I.W. *et al.* Pathologic Diagnosis of Early Hepatocellular. *Hepatology*, [S.I], v. 49, n. 2, p. 658–664, 2009.

PATEL, S.; JOSEPH, S. K.; THOMAS, A. P. Molecular properties of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. *Cell Calcium*, [S.I], v. 25, n. 3, p. 247–264, 1999.

PATTERSON, R.L; BOEHNING, D; SNYDER, S.H. Inositol 1,4,5- triphosphate Receptors as Signal Integrators. *Annual Review of Biochemistry*, [S.I], v. 73, n. 3, p. 437–465, 2004.

PAWLOTSKY, J-M. Hepatitis C Virus Resistance to Direct-Acting Antiviral Drugs in Interferon-Free Regimens. *Gastroenterology*, [S.I], v. 151, n. 1, p. 70–86, 2016.

POWELL, E. E. *et al.* The Natural History of Nonalcoholic Steatohepatitis : A Follow-up Study of Forty-two Patients for Up to 21 Years. *Hepatology*, [S.I], v. 11, n. 1, p. 74–80, 1990.

PRICE, J.C; TERRAULT, N.A. Treatment of Hepatitis C in Liver Transplant Patients : Interferon Out , Direct Antiviral Combos In. *Liver Transplantation*, [S.I], v. 21, n. 4, p. 423–434, 2015.

PROBST, A. *et al.* Role of Hepatitis C virus genotype 3 in liver fibrosis progression – a systematic review and meta-analysis. *Journal of Viral Hepatitis*, [S.I], v. 18, p. 745–759, 2011.

PUSL, T. *et al.* Epidermal Growth Factor-mediated Activation of the ETS Domain Transcription Factor Elk-1 Requires Nuclear Calcium Epidermal Growth Factor-mediated Activation of the ETS Domain Transcription Factor Elk-1 Requires Nuclear Calcium. *Journal of Biological Chemistry*, [S.I], v. 277, n. 7, p. 27517–27527, 2002.

PUSL, T; NATHANSON, M.H. The role of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in the regulation of bile secretion in health and disease. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, [S.I], v. 322, n. 8, p. 1318–1325, 2004.

RAO, R K; SETH, A; SHETH, P. Recent Advances in Alcoholic Liver Disease I . Role of intestinal permeability and endotoxemia in alcoholic liver disease. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, [S.I], v. 286, n. 6, p. G881–G884, 2004.

RAZAVI, H *et al.* The present and future disease burden of hepatitis C virus (HCV) infection with today’s treatment paradigm. *Journal of Viral Hepatitis*, [S.I], v. 21, n. Suppl.1, p. 34–59, 2014.

ROBB-GASPERS, L.D *et al.* Integrating cytosolic calcium signals into mitochondrial metabolic responses. *The EMBO Journal*, [S.I], v. 17, n. 17, p. 4987–5000, 1998.

RODRIGUES, M. A. *et al.* Nucleoplasmic calcium is required for cell proliferation. *Journal of Biological Chemistry*, [S.I], v. 282, n. 23, p. 17061–17068, 2007.

- RODRIGUES, M. A *et al.* Insulin Induces Calcium Signals in the Nucleus of Rat Hepatocytes. *Hepatology*, [S.I.], v. 48, n. 11, p. 1621–1631, 2008.
- ROSKAMS, T. A.; LIBBRECHT, L.; DESMET, V.J. Progenitor Cells in Diseased Human Liver. *Seminars in Liver Disease*, [S.I.], v. 23, n. 4, p. 385–396, 2003.
- ROSKAMS, T; PH, D; KOJIRO, M. Pathology of Early Hepatocellular Carcinoma: Conventional and Molecular Diagnosis. *Seminars in liver disease*, [S.I.], v. 30, n. 1, p. 17–25, 2010.
- RUBIN, E; LIEBER, CS. Experimental Alcoholic Hepatitis : A New Primate Model. *Science*, [S.I.], v. 182, n.16, p. 712–713, 1973.
- RUSYN, I; LEMON, S.M. Mechanisms of HCV-induced liver cancer: What did we learn from in vitro and animal studies? *Cancer Letters*, [S.I.], v. 345, n. 2, p. 210–215, 2014.
- SÁ, G.P.D. *et al.* O Transplante Hepático por Hepatocarcinoma na era MELD em São Paulo: Análise de 414 casos transplantados pelo Critério de Milão/Brasil. *Arquivo Brasileiro de Cirurgia Digestiva*, [S.I.], v. 29, n. 4, p. 240–245, 2016.
- SALOMAO, M *et al.* Steatohepatitic hepatocellular carcinoma (SH-HCC): a distinctive histological variant of HCC in hepatitis C virus-related cirrhosis with associated NAFLD/NASH. *The American Journal of Surgical Pathology*, [S.I.], v. 34, n. 11, p. 1630–1636, 2010.
- SALVALAGGIO, P *et al.* The MELD system and liver transplant waiting-list mortality in developing countries : lessons learned from São Paulo , Brazil. *Einstein*, [S.I.], v. 10, n. 3, p. 278–285, 2012.
- SANTOS, A.M.A.D. Causalidade entre Renda e Saúde : Uma Análise Através da Abordagem de Dados em Painel com os Estados do Brasil. *Estudos Econômicos (São Paulo)*, [S.I.], v. 42, n. 2, p. 229–261, 2012.
- SATYANARAYANA, A; MANNNS, M. P; RUDOLPH, K. L. Telomeres and Telomerase: a Dual Role in Hepatocarcinogenesis. *Hepatology*, [S.I.],v. 40, n. 2, p. 276–283, 2004.
- SCHLAGETER, M *et al.* Histopathology of hepatocellular carcinoma. *World Journal of Gastroenterology*, [S.I.], v. 20, n. 43, p. 15955–15964, 2014.
- SCHUPPAN, D; AFDHAL H, N. Liver cirrhosis. *Lancet*, [S.I.], v. 371, n. 8, p. 838–851, 2008.
- SEITZ, H.K; MUELLER, S. Alcohol and Cancer : An Overview with Special Emphasis on the Role of Acetaldehyde and Cytochrome P450 2E1. *Biological Basis of Alcohol-Induced Cancer*. [S.I: s.n.], 2015. p. 59–70.
- SEITZ, H.K; STICKEL, F. Molecular mechanisms of alcohol-mediated carcinogenesis.

- Nature Reviews, [S.I], v. 7, n. 8, p. 599–612, 2007.
- SETSHEDI, M; WANDS, J.R; MONTE, S.M.D. Acetaldehyde adducts in alcoholic liver disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, [S.I], v. 3, n. 3, p. 178–185, 2010.
- SHEA, R.S.O *et al.* Alcoholic Liver Disease. *Hepatology*, [S.I], v. 51, n. 1, p. 307–328, 2010.
- SHIBAO, Kazunori *et al.* The type III inositol 1,4,5-trisphosphate receptor is associated with aggressiveness of colorectal carcinoma. *Cell Calcium*, v. 48, n. 6, p. 315–323, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ceca.2010.09.005>>.
- SHIRAHA, Hidenori; YAMAMOTO, Kazuhide; NAMBA, Masayoshi. Human hepatocyte carcinogenesis (review). *International Journal of Oncology*, v. 42, n. 4, p. 1133–1138, 2013.
- SIA, Daniela *et al.* Integrative Molecular Analysis of Intrahepatic Cholangiocarcinoma Reveals 2 Classes That Have Different Outcomes. *YGAST*, v. 144, n. 4, p. 829–840, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2013.01.001>>.
- SIMMONDS, Peter. The Origin of Hepatitis C Virus. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, v. 369, p. 1–15, 2013.
- SMITH, PATRICK G. J.; TEE, LISA B. G.; YEOH, GEORGE C. T. Appearance of Oval Cells in the Liver of Rats After Long-term Exposure to Ethanol. *Hepatology*, v. 23, n. 1, p. 145–154, 1996.
- SOINI, Y *et al.* Hepatocellular carcinomas with a high proliferation index and a low degree of apoptosis and necrosis are associated with a shortened survival. *British Journal of Cancer*, v. 73, p. 1025–1030, 1996.
- STANAWAY, Jeffrey D *et al.* The global burden of viral hepatitis from 1990 to 2013: findings from the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet*, v. 388, n. 10049, p. 1081–1088, 2016.
- SUGIMOTO, Kazushi; TAKEI, Yoshiyuki. Pathogenesis of alcoholic liver disease. *Hepatology Research*, v. 47, n. 4, p. 70–79, 2017.
- SUNG, Wing-kin *et al.* Genome-wide survey of recurrent HBV integration in hepatocellular carcinoma. *Nature Genetics*, v. 44, n. 7, p. 765–769, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/ng.2295>>.
- SZABADKAI, György *et al.* Chaperone-mediated coupling of endoplasmic reticulum and mitochondrial Ca²⁺ channels. *The Journal of Cell Biology*, v. 175, n. 6, p. 901–911, 2006.
- SZALAI, Gabor; KRISHNAMURTHY, Rajeshwari; HAJNOCZKY, Gyorgy. Apoptosis driven by IP₃-linked mitochondrial Gα. *The EMBO Journal*, v. 18, n. 22, p. 6349–6361, 1999.
- TAN, Poh Seng *et al.* Clinicopathological indices to predict hepatocellular carcinoma

molecular classification. *Liver International*, v. 36, n. 1, p. 108–118, 2017.

TANNAPFEL, Andrea *et al.* APOPTOSIS AND PROLIFERATION IN RELATION TO HISTOPATHOLOGICAL VARIABLES AND PROGNOSIS IN HEPATOCELLULAR CARCINOMA. *Journal of Phatology*, v. 187, n. 1, p. 439–445, 1999.

TERRAULT, Norah. Liver transplantation in the setting of chronic HCV. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, v. 26, n. 4, p. 531–548, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bpg.2012.09.010>>.

TESTINO, Gianni *et al.* Alcohol and hepatocellular carcinoma : A review and a point of view. *World Journal of Gastroenterology*, v. 20, n. 43, p. 15943–15954, 2014.

TESTINO, Gianni. Alcoholic hepatitis. *Journal of Medicine and Life*, v. 6, n. 2, p. 161–167, 2013.

THOMAS, Melanie B.; ABBRUZZESE, James L. Opportunities for targeted therapies in hepatocellular carcinoma. *Journal of Clinical Oncology*, v. 23, n. 31, p. 8093–8108, 2005.

THRIFT, Aaron P; EL-SERAG, Hashem B; KANWAL, Fasiha. Global epidemiology and burden of HCV infection and HCV-related disease. *Nature Publishing Group*, v. 14, n. 2, p. 122–132, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrgastro.2016.176>>.

THULUVATH, P. J. *et al.* Liver Transplantation in the United States , 1999 – 2008. *American Journal of Transplantation*, v. 10, n. 2, p. 1003–1019, 2010.

TORBENSON, Michael S. Morphologic Subtypes of Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology Clinics of NA*, v. 46, n. 2, p. 365–391, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.gtc.2017.01.009>>.

TORDJMANN, Thierry *et al.* Receptor-oriented intercellular calcium waves evoked by vasopressin in rat hepatocytes. *The EMBO Journal*, v. 17, n. 16, p. 4695–4703, 1998.

TORRES, Orlando Jorge Martins *et al.* BRAZILIAN CONSENSUS FOR MULTIMODAL TREATMENT OF COLORECTAL LIVER METASTASES. MODULE 3: CONTROVERSIES AND UNRESECTABLE METASTASES. *Arquivo Brasileiro de Cirurgia Digestiva*, v. 29, n. 3, p. 173–179, 2016.

TOTOKI, Yasushi *et al.* Trans-ancestry mutational landscape of hepatocellular carcinoma genomes. *Nature Genetics*, v. 46, n. 12, p. 1267–1273, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/ng.3126>>.

TRUSOLINO, Livio; BERTOTTI, Andrea; COMOGLIO, Paolo M. MET signalling : principles and functions in development , organ regeneration and cancer. *Nature Publishing Group*, v. 11, n. 12, p. 834–848, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrm3012>>.

TSOULFAS, Georgios; MEKRAS, Alexandros; KISKINIS, Dimitrios. Surgical treatment for

large hepatocellular carcinoma: does size matter? *ANZ Journal of Surgery*, v. 82, n. 5, p. 510–517, 2012.

TSUCHISHIMA, Mutsumi; GEORGE, Joseph. Chronic Ingestion of Ethanol Induces Hepatocellular Carcinoma in Mice Without Additional Hepatic Insult. *Digestive Diseases and Sciences*, v. 58, p. 1923–1933, 2013.

TSUKAMOTO, Hidekazu; LU, Shelly C. Current concepts in the pathogenesis of alcoholic. *The FASEB Journal*, v. 15, n. 6, p. 1335–1349, 2001.

TSUKAMOTO, Hidekazu; XI, Xiao Ping. Incomplete Compensation of Enhanced Hepatic Oxygen Consumption in Rats with Alcoholic Centrilobular Liver Necrosis. *Hepatology*, v. 9, n. 2, p. 302–306, 1989.

TU, Huiping *et al.* Functional Characterization of Mammalian Inositol 1 , 4 , 5-Trisphosphate Receptor Isoforms. *Biophysical Journal*, v. 88, n. 2, p. 1046–1055, 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1529/biophysj.104.049593>>.

TU, Huiping; WANG, Zhengnan; BEZPROZVANNY, Ilya. Modulation of Mammalian Inositol 1 , 4 , 5-Trisphosphate Receptor Isoforms by Calcium : A Role of Calcium Sensor Region. *Biophysical Journal*, v. 88, n. 2, p. 1056–1069, 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1529/biophysj.104.049601>>.

UHLÉN, Per *et al.* Gain-of-function/Noonan syndrome SHP-2/Ptpn11 mutants enhance calcium oscillations and impair NFAT signaling. *PNAS*, v. 103, n. 7, p. 2160–2165, 2006.

VANG, Russell; SHIH, Ie-; KURMAN, Robert J. OVARIAN LOW-GRADE AND HIGH-GRADE SEROUS CARCINOMA: Pathogenesis, Clinicopathologic and Molecular Biologic Features, and Diagnostic Problems. *Advances in Anatomic Pathology*, v. 16, n. 5, p. 267–282, 2010.

VIDELA, By L; BERNSTEIN, J; ISRAEL, Y. Metabolic Alterations Produced in the Liver by Chronic Ethanol Administration. *Biochemical Journal*, v. 134, p. 507–514, 1973.

VILLANUEVA, Augusto *et al.* Combining Clinical, Pathology, and Gene Expression Data to Predict Recurrence of Hepatocellular Carcinoma. *YGAST*, v. 140, n. 5, p. 1501–1512.e2, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2011.02.006>>.

VILLANUEVA, Augusto *et al.* Combining Clinical, Pathology, and Gene Expression Data to Predict Recurrence of Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology*, v. 140, n. 5, p. 1501–1512, 2012.

VILLANUEVA, Augusto *et al.* DNA Methylation-Based Prognosis and Epidrivers in Hepatocellular Carcinoma. *Hepatology*, v. 61, n. 6, p. 1945–1956, 2015.

VISAPAA, J-P *et al.* Increased cancer risk in heavy drinkers with the alcohol dehydrogenase

- 1C * 1 allele, possibly due to salivary acetaldehyde. *Gut*, v. 53, p. 871–876, 2004.
- WANDS, Jack. Hepatocellular Carcinoma and Sex. *The New*, v. 357, n. 11, p. 1974–1976, 2007.
- WANG, Fu Sheng *et al.* The global burden of liver disease: The major impact of China. *Hepatology*, v. 60, n. 6, p. 2099–2108, 2014.
- WOJCIKIEWICZ, R.J.H. Type I,II and III Inositol 1,4,5-Triphosphate Receptors are Unequally Susceptible to Down-regulation and are expressed in markedly different proportions in different cell types. *The Journal os Biological Chemistry*, v. 270, n. 19, p. 11678–11683, 1995.
- WONG, Robert J *et al.* Nonalcoholic Steatohepatitis Is the Second Leading Etiology. *Gastroenterology*, v. 148, n. 3, p. 547–555, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2014.11.039>>.
- WU, Dianqing; LEE, Chang Ho; RHEEQ, Sue Goo. Activation of Phospholipase C by the a Subunits of the G, and G11 Proteins in Transfected cos-7 Cells. *The Journal os Biological Chemistry*, v. 267, n. 3, p. 1811–1817, 1992.
- YAMANE, Daisuke *et al.* Liver Injury and Disease Pathogenesis in Chronic Hepatitis C. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, v. 369, p. 263–288, 2013.
- YAMASHITA, Taro *et al.* EpCAM and A -Fetoprotein Expression Defines Novel Prognostic Subtypes of Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Research*, v. 68, n. 5, p. 1451–1462, 2008.
- YAMASHITA, Taro; WANG, Xin Wei. Cancer stem cells in the development of liver cancer. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 123, n. 5, p. 1911–1918, 2013.
- YAO, Francis Y *et al.* Downstaging of Hepatocellular Cancer Before Liver Transplant: Long-Term Outcome Compared to Tumors Within Milan Criteria. *Hepatology*, v. 61, n. 6, p. 1968–1977, 2015.
- YOKOYAMA, Akira; MURAMATSU, Taro; OHMORI, Tai. Alcohol-related cancers and aldehyde dehydrogenase-2 in Japanese alcoholics. *Carcinogenesis*, v. 19, n. 8, p. 1383–1387, 1998.
- YOUNOSSI, Zobair *et al.* The Conundrum of Cryptogenic Cirrhosis : Adverse Outcomes without Treatment Options. *Journal of Hepatology*, v. 69, n. 6, p. 1365–1370, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.08.013>>.
- YULE, David I. *et al.* Evidence that zymogen granules are not a physiologically relevant calcium pool: Defining the distribution of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in pancreatic acinar cells. *Journal of Biological Chemistry*, v. 272, n. 14, p. 9093–9098, 1997.
- ZIOL, Marianne *et al.* Macrotrabecular-Massive Hepatocellular Carcinoma: A Distinctive

Histological Subtype With Clinical Relevance. *Hepatology*, v. 68, n. 1, p. 103–112, 2018.

ZUCMAN-ROSSI, Jessica *et al.* Genetic Landscape and Biomarkers of Hepatocellular Carcinoma. *YGAST*, v. 149, n. 5, p. 1226–1239.e4, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2015.05.061>>.