



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas; Departamento de Fisiologia e Biofísica
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia

KEMPER NUNES DOS SANTOS

**EXPRESSÃO DE CANAIS DE CÁLCIO EM COLANGIÓCITOS NA DOENÇA
HEPÁTICA ALCOÓLICA**

BELO HORIZONTE - MG

2021

KEMPER NUNES DOS SANTOS

**EXPRESSÃO DE CANAIS DE CÁLCIO EM COLANGIÓCITOS NA DOENÇA
HEPÁTICA ALCOÓLICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas; área de concentração: Farmacologia.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Maria de Fátima Leite

Co-orientador: Dr Igor Brasil Costa

BELO HORIZONTE - MG

2021

043 Santos, Kemper Nunes dos.
Expressão de canais de cálcio em colangiócitos na doença hepática alcoólica
[manuscrito] / Kemper Nunes dos Santos. – 2021.
133 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria de Fátima Leite. Co-orientador: Dr. Igor Brasil
Costa.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia.

1. Farmacologia. 2. Hepatopatias Alcoólicas. 3. Canais de Cálcio. 4. Receptores
de Inositol 1,4,5-Trifosfato. I. Leite, Maria de Fátima. II. Costa, Igor Brasil. III.
Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV.
Título.

CDU: 615



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

FOLHA DE APROVAÇÃO DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO N° 334 DE KEMPER NUNES DOS SANTOS

"Expressão de Canais de Cálcio em Colangiócitos na Doença Hepática Alcoólica"

KEMPER NUNES DOS SANTOS

Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia **08 de abril de 2021**, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:

Prof. Dr. Luciano de Figueiredo Borges, EPM/Universidade Federal de São Paulo
Profa. Dra. Hellen Thais Fuzii, NMT/Universidade Federal do Pará
Profa. Dra. Ana Cristina do Nascimento Pinheiro Ferreira, Centro Universitário de Sete Lagoas
Prof. Dr. Paulo Henrique Costa Diniz, HC/Universidade Federal de Minas Gerais
Profa. Dra. Maria de Fátima Leite, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais - Orientadora

Belo Horizonte, 08 de abril de 2021.

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Hellen Thais Fuzii, Usuário Externo**, em 09/04/2021, às 08:13, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luciano de Figueiredo Borges, Usuário Externo**, em 12/04/2021, às 15:03, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Paulo Henrique Costa Diniz, Médico**, em 14/04/2021, às 10:30, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ana Cristina do Nascimento Pinheiro Ferreira, Usuário Externo**, em 27/04/2021, às 10:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Maria de Fatima Leite, Professora do Magistério Superior**, em 28/04/2021, às 09:24, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0659748** e o código CRC **D667685A**.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO N° 334 DE KEMPER NUNES DOS SANTOS

Às 14:00 horas do dia 08 do mês de abril de 2021, transmitida através de webconferência na plataforma Zoom, realizou-se a sessão pública para a defesa da Tese de **Kemper Nunes dos Santos**. A presidência da sessão coube à **Profa. Dra. Maria de Fátima Leite**, orientadora. Inicialmente, a presidente fez a apresentação da Comissão Examinadora assim constituída: **Prof. Dr. Luciano de Figueiredo Borges**, EPM/Universidade Federal de São Paulo, **Profa. Dra. Hellen Thais Fuzii**, NMT/Universidade Federal do Pará, **Profa. Dra. Ana Cristina do Nascimento Pinheiro Ferreira**, Centro Universitário de Sete Lagoas, **Prof. Dr. Paulo Henrique Costa Diniz**, HC/Universidade Federal de Minas Gerais, e **Profa. Dra. Maria de Fátima Leite**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais, orientadora. Em seguida, o candidato fez a apresentação do trabalho que constitui sua **Tese de Doutorado**, intitulada: "**Expressão de Canais de Cálcio em Colangiócitos na Doença Hepática Alcoólica**". Seguiu-se a arguição pelos examinadores e logo após, a Comissão reuniu-se, sem a presença do candidato e do público e decidiu considerar **APROVADA** a Tese de Doutorado. O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pela presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ata que, depois de lida, se aprovada, será assinada pela Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 08 de abril de 2021.

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Hellen Thais Fuzii, Usuário Externo**, em 09/04/2021, às 08:13, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Maria de Fatima Leite, Professora do Magistério Superior**, em 11/04/2021, às 20:02, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luciano de Figueiredo Borges, Usuário Externo**, em 12/04/2021, às 15:05, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Paulo Henrique Costa Diniz, Médico**, em 14/04/2021, às 10:30, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ana Cristina do Nascimento Pinheiro Ferreira, Usuário Externo**, em 27/04/2021, às 10:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0659745** e o código CRC **4EE6D8D3**.

FOMENTO E APOIO INSTITUCIONAL

Este projeto foi desenvolvido no Laboratório de Sinalização Intracelular de Cálcio/Calcium Lab, do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais – ICB-UFMG, com a colaboração do Departamento de Anatomia Patológica e Medicina Forense do Hospital da Faculdade de Medicina/UFMG, e do Laboratório de Vírus *Epstein-Barr* da Seção Científica de Virologia do Instituto Evandro Chagas – IEC-PA, tendo como auxílio de fomento à pesquisa as seguintes instituições:

- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG);
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior (CAPES);
- *Liver Center at UFMG.*

AGRADECIMENTOS

À DEUS por todos os dias da minha vida, pelas experiências vividas e pelo conhecimento adquirido. Por aquilo que não fui capaz de enxergar, mas hoje aprendi a aceitar. Por cada benção que me fez superar os obstáculos para depois poder conquistar, e nos momentos de desesperança, por ter me dado forças para continuar e superar.

Aos meus pais, MINHA FAMÍLIA, que mesmo sem compreender algumas das minhas escolhas e aceitarem certas decisões, sempre confiaram em mim e acreditaram naquilo que me propus ser capaz de realizar. Por nunca se afastarem, por nunca desistirem de me amar, por nunca me abandonarem em meus defeitos, por chorarem e sorrirem por mim sem deixar de me amar. Por um dia terem tocado meu coração para que eu pudesse amá-los devidamente como merecem ser amados.

À você, MARCELLA ALMEIDA, que me acompanhou e me ajudou a ser quem eu sou, por me desafiar por saber que seria capaz de vencer, por evitar que eu fosse quem provavelmente seria. Por me mostrar que mesmo com perdas, sempre há algo à receber; um mistério, uma escolha, um caminho, que sempre virá como um recomeço após o fim de algo. Hoje ainda é o passado, e o amanhã será o presente momento em que essas palavras poderão ou não fazer mais sentido ou ter sua importância, mesmo assim elas permanecerão no passado, pois nada mudará o que já aconteceu um dia.

À mulher, mãe, profissional e minha orientadora MARIA DE FÁTIMA LEITE, por ter me acolhido e acreditado que eu poderia cumprir meu propósito. Por não me abandonar em minhas falhas e dificuldades científicas, por ter confiado e me permitido chegar a este momento de realização pessoal e profissional. Muito obrigado.

Ao meu co-orientador IGOR BRASIL, por ter aceitado me acompanhar neste desafio, mesmo sem contato prévio ou conhecimento sobre mim, Obrigado!

À todos os colegas do CALCIUM LAB que sempre me auxiliaram e contribuíram para a realização deste trabalho. Por terem feito parte deste processo de maneira integral e indispensável, pois sem a ajuda de cada um de vocês e suas contribuições científicas para este momento eu não teria alcançado o encerramento deste ciclo da forma como estou encerrando. Meu imenso agradecimento à todos. E à todos os meus reais AMIGOS!

Que Deus guarde minhas palavras lhes fazendo sentir todo meu reconhecimento e gratidão.

Kemper dos Santos

Nós somos a consequência plena de todas as
escolhas que um dia fizemos na vida.

Kemper dos Santos

RESUMO

O álcool é a substância viciante mais utilizada pelo homem e seu consumo excessivo é a terceira principal causa de morte evitável no mundo, com mais de 3 milhões de mortes (5,3%) em 2016. A doença hepática alcoólica (DHA) está entre os principais fatores causais de morbidade e mortalidade, responsável por 47,9% dos casos de falência hepática atribuída à cirrose. Estudos tem sugerido que durante a DHA pode ocorrer lesão hepática colestatia, na qual esta manifestação está associada a um prognóstico desfavorável desta doença. A indução alcoólica crônica pode ocasionar comprometimento nos níveis de ITPR3 e a diminuição da atividade dos canais de cálcio em colangiócitos. Objetivamos determinar as evidências na frequência da expressão do ITPR3 em colangiócitos em casos de cirrose causada pela DHA e a correlação entre polimorfismos de nucleotídeos simples (SNPs) à suscetibilidade da DHA. Foram realizadas análises de imunohistoquímica (IHC) e de biologia molecular, por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), em 49 amostras de biópsias hepáticas de casos diagnosticados com cirrose causada pela DHA, comparadas a 18 casos de infecção pelo vírus da hepatite C (HCV) e 21 biópsias hepáticas de doadores de transplante de fígado. Os resultados demonstraram que variações genotípicas na região promotora do gene fator nuclear 2 derivado do eritroide 2 (*NFE2L2*), para o alelo -214A ($p = 0,0136$), tanto em homozigose -214A/A quanto heterozigose -214A/G ($p = 0,0428$), foram associados significativamente como provável biomarcador genético à um maior risco na DHA, uma vez que foram significativos à um menor nível de expressão do fator de transcrição Nrf2 em colangiócitos e a uma maior atividade inflamatória durante a DHA. Concluindo que durante a indução alcoólica crônica na DHA, ocorre o comprometimento dos níveis da expressão do ITPR3 em colangiócitos e que fatores genéticos associados ao SNP rs35652124 (-214A), do gene *NFE2L2*, esteja associado a um maior risco e suscetibilidade à progressão na DHA.

Palavras-chave: DHA, NFE2L2, Nrf2, ITPR3, colangiócitos.

ABSTRACT

Alcohol is the most widely used addictive substance by man and its excessive consumption is the third leading preventable cause of death in the world, with more than 3 million deaths (5.3%) in 2016. Alcoholic liver disease (ALD) is among the main causatous factors of morbidity and mortality, responsible for 47.9% of cases of liver failure attributed to cirrhosis. Studies have suggested that during ALD cholestatic liver injury may occur, in which this manifestation is associated with an unfavorable prognosis of this disease. Chronic alcohol induction can cause impairment in the levels of ITPR3 and decreased activity of calcium channels in cholangiocytes. We aimed to determine the evidence in the frequency of ITPR3 expression in cholangiocytes in cases of cirrhosis caused by ALD and the correlation between simple nucleotide polymorphisms (SNPs) to the susceptibility of ALD. Immunohistochemistry (IHC) and molecular biology analyses were performed using the polymerase chain reaction (PCR) technique, in 49 liver biopsy samples from cases diagnosed with cirrhosis caused by ALD, compared to 18 cases of hepatitis C virus (HCV) infection and 21 liver biopsies from liver transplant donors. The results showed genotypic variations in the promoter region of the nuclear Factor, Erythroid 2 Like 2 gene (NFE2L2), for the -214A allele ($p = 0.0136$), both in homozygosis -214A/A and heterozygosis -214A/G ($p = 0.0428$), were significantly associated as a probable genetic biomarker at a higher risk in ALD, since they were significant at a lower level of expression of Nrf2 transcription factor in cholangiocytes and to a higher inflammatory activity during ALD. In conclusion that during chronic alcohol induction in ALD, there is a compromise of ITPR3 expression levels in cholangiocytes and that genetic factors associated with SNP rs35652124 (-214A), NFE2L2 gene, is associated with a higher risk and susceptibility to progression in ALD.

Keywords: ALD, NFE2L2, Nrf2, ITPR3, cholangiocytes.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	CPC total de litros de álcool em pessoas a partir dos 15 anos de idade	23
Figura 2 –	Modelo esquemático ilustrativo da provável via fisiopatológica do recrutamento de neutrófilos hepáticos durante a indução alcoólica.....	26
Figura 3 –	Sinalização da secreção de bicarbonato em colangiócitos.....	31
Figura 4 –	Protocolo de indução alcoólica 5% em camundongos machos <i>C57BL/6</i>	41
Figura 5 –	Fatores de transcrição reguladores da expressão do ITPR3.....	43
Figura 6 –	Expressão dos níveis do ITPR3 em colangiócitos entre os grupos de estudo.....	49
Figura 7 –	Análise dos parâmetros laboratoriais bioquímicos entre os grupos de estudo.....	51
Figura 8 –	Avaliação da indução alcoólica em camundongos tratados com álcool 5%.....	53
Figura 9 –	Análises bioquímicas em camundongos tratados com álcool 5%.....	54
Figura 10 –	Análise dos marcadores antioxidantes expressos durante o estresse oxidativo induzido pelo álcool.....	55
Figura 11 –	Determinação da expressão do ITPR3 em colangiócitos de camundongos machos <i>C57BL/6</i>	57
Figura 12 –	Avaliação da translocação nuclear de NF- κ B (RelA e NF- κ B 1) em colangiócitos na DHA.....	59
Figura 13 –	Investigação do microRNA-506 em colangiócitos na DHA.....	61
Figura 14 –	Identificação da translocação nuclear do fator de transcrição Nrf2 em colangiócitos na DHA.....	63
Figura 15 –	Posição esquemática dos polimorfismos selecionados do gene <i>NFE2L2</i>	65
Figura 16 –	Avaliação dos níveis de expressão do fator de transcrição Nrf2, nos diferentes SNPs de promotor do gene <i>NFE2L2</i> em pacientes com cirrose associada a DHA.....	81
Figura 17 –	Score de atividade inflamatória nos diferentes polimorfismos da região promotora do gene <i>NFE2L2</i> na cirrose durante a DHA.....	86

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Quadro 1 –	Protocolo para realização da técnica de Imunohistoquímica – IHC.....	40
Quadro 2 –	Protocolo para realização da técnica de <i>Western Blot</i> – WB.....	42
Quadro 3 –	Protocolo para realização da técnica de genotipagem em qPCR.....	46
Tabela 1 –	Frequência alélica e genotípica entre os grupos - SNP rs35652124.....	66
Tabela 2 –	Frequência alélica e genotípica entre a DHA e controle - SNP rs35652124.....	67
Tabela 3 –	Frequência alélica e genotípica entre a DHA e HCV - SNP rs35652124.....	68
Tabela 4 –	Frequência alélica e genotípica entre a o HCV e controle - SNP rs35652124.....	69
Tabela 5 –	Frequência alélica e genotípica entre os grupos - SNP rs6721961.....	72
Tabela 6 –	Frequência alélica e genotípica entre DHA e controle - SNP rs6721961.....	73
Tabela 7 –	Frequência alélica e genotípica entre DHA e HCV - SNP rs6721961	74
Tabela 8 –	Frequência alélica e genotípica entre HCV e controle - SNP rs6721961.....	74
Tabela 9 –	Frequência alélica e genotípica entre todos os grupos - SNP rs4893819.....	77
Tabela 10 –	Frequência alélica e genotípica entre DHA e controle - SNP rs4893819.....	78
Tabela 11 –	Frequência alélica e genotípica entre DHA e HCV - SNP rs4893819.....	78
Tabela 12 –	Frequência alélica e genotípica entre HCV e controle - SNP rs4893819.....	79
Tabela 13 –	SNPs comparados à atividade inflamatória na DHA.....	84
Tabela 14 –	Apresentação dos dados clínicos entre os grupos.....	88
Tabela 15 –	Genótipos dos SNPs comparados aos dados clínicos na DHA.....	91

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	graus Celsius
%	porcentagem
A	adenina
AC	anticorpo
a.C	antes de Cristo
ADH	álcool desidrogenase
ALDH	aceltadeído desidrogense
ALP	Fosfatase alcalina (<i>alkaline phosphatase</i>)
ALT	alamina aminotransferase
AMPc	adenosina monofosfato ciclase
ANOVA	análise de variância unidirecional
AST	aspartato aminotransferase
ATP	adenosina trifosfato
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
C57BL/6	<i>C57 black 6</i> (B6)
CAAE	Certificado de Apresentação de Apreciação Ética
Ca ²⁺	cálcio
CBP	cirrose biliar primária
CD62E	E-selectina (CD62 da família E)
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CFTR	Regulador da Condutância Transmembrana na Fibriose Cística
CHC	carcinoma hepatocelular
Cl ⁻	cloreto
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
CNS	Conselho Nacional de Saúde
CPC	consumo <i>per capita</i>
CYP2E1	citocromo P-450 da família 2E1
DHA	doença hepática alcoólica
DMT2	<i>Diabetes mellitus</i> tipo 2
EROs	espécies reativas de oxigênio
EtOH	álcool etílico

EUA	Estados Unidos da América
G	guanina
g	grama
GGT	Gama Glutamil Transpeptidase
GPx	glutathiona peroxidase
HA	hepatite alcoólica
HAV	hepatite A
HCV	vírus da hepatite C
HEV	hepatite E
HCO ₃ ⁻	bicarbonato
ICAM-1	moléculas de adesão intracelular-1
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
IEC	Instituto Evandro Chagas
IHC	imunohistoquímica
IL-1	interleucina-1
IL-1 β	interleucina-1 beta
IL-6	interleucina-6
IL-10	interleucina-10
IP ₃	inositol 1,4,5-trifosfato
ITPR	receptores de inositol 1,4,5-trifosfato
ITPR1	receptores de inositol 1,4,5-trifosfato tipo 1
ITPR2	receptores de inositol 1,4,5-trifosfato tipo 2
ITPR3	receptores de inositol 1,4,5-trifosfato tipo 3
L	litro
LDH	lactato desidrogenase
LPS	lipopolissacarídeos
M	molar
MEC	matriz extra celular
MELD	modelo para doença hepática terminal
MCP-1	proteína inflamatória de macrófago 1
mg	miligrama
mL	mililitro
μ L	microlitro
mirRNA-506	micro ácido ribonucleico-506

MIP-1 α	proteína inflamatória de macrófago 1 α
MIP-1 β	proteína inflamatória de macrófago 1 β
MIP-2	proteína inflamatória de macrófago 2
μ 3	muscarínicos tipo 3
N	número
NAD ⁺	Nicotinamida Adenosina Dinucleotídeo
NADH	Nicotinamida Adenosina Dinucleotídeo hidreto
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NCHS	<i>National Center for Health Statistics</i>
NFE2L2	<i>nuclear Factor, Erythroid 2 Like 2</i>
NF-kb	Fator nuclear-kappa beta
nm	nanômetro
Nrf2	fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2
OMS	Organização Mundial da Saúde
P50	proteína 50 (subunidade) → NF-kb1
P65	proteína 65 (subunidade) → RelA
<i>p</i>	probabilidade de significância
PCR	reação em cadeia da polimerase
qPCR	PCR – reação em cadeia da polimerase – em tempo real
pH	potencial de hidrogenicidade
RelA	<i>Transcription factor p65</i> ou <i>nuclear factor NF-kB p65 subunit</i> (NF-kb3)
RPM	rotações por minuto
rs	refSNP
SNPs	<i>single nucleotide polymorphism</i>
SOD	superóxido dismutase
TAP	tempo de atividade da protrombina
TBS	<i>tris-buffered saline</i>
Teste G	teste de probabilidade-razão/máxima de significância estatística
TNF- α	fator de necrose tumoral-alfa
Teste T	teste de <i>Student</i>
TGI	trato gastrointestinal
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UTR	região não traduzida (<i>untranslated region</i>)
WB	<i>Western Blot</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	HIPÓTESE.....	18
2	JUSTIFICATIVA	19
3	REVISÃO DA LITERATURA	20
3.1	CONTEXTO HISTÓRICO.....	20
3.2	ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS.....	21
3.3	PATOGÊNESE DA INFLAMAÇÃO HEPÁTICA INDUZIDA PELO ÁLCOOL.....	24
3.4	DHA E EVIDÊNCIAS DE COMPROMETIMENTO EM COLANGIÓCITOS.....	27
3.5	CANAIS DE CÁLCIO E RECEPTOR DE INOSITOL 3,4,5- TRIFOSFATO TIPO 3 EM COLANGIÓCITOS.....	29
3.6	FATORES DE TRANSCRIÇÃO RESPONSÁVEIS POR REGULAR A EXPRESSÃO DE ITPR3 EM COLANGIÓCITOS.....	32
4	OBJETIVOS	34
4.1	OBJETIVO GERAL.....	34
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	34
5	METODOLOGIA	35
5.1	CASUÍSTICA.....	35
5.1.1	Desenho do estudo	35
5.1.2	Caracterização das amostras	35
5.1.3	CrITÉrios de inclusão e exclusão	36
5.1.4	Local do estudo	37
5.2	ABORDAGEM METODOLOGICA.....	38
5.2.1	Determinao da frequência com a qual a DHA exibe evidências na associao com a expressão diminuída do ITPR3 em colangiócitos	39
5.2.2	Induo alcoólica em camundongos C57BL/6 para análises comparativas dos parâmetros bioquímicas e histopatológicas durante o espectro da DHA	40
5.2.3	Investigao dos possíveis fatores associados  regulao da expressão do ITPR3 em colangiócitos e determinao se e como a exposio ao	

álcool modula tais fatores em diminuir a expressão do ITPR3 durante a DHA.....	43
5.2.4 Avaliação das frequências alélicas e genóticas dos SNPs da região promotora do gene <i>NFE2L2</i> – rs35652124 (-214 A/G), rs4893819 (-1275 G/A) e rs6721961 (-178 A/G) – e sua relação na atividade de transcrição do Nrf2 durante a DHA.....	44
5.3 ASPÉCTOS ÉTICOS DA PESQUISA.....	47
5.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	47
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
6.1 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE EXPRESSÃO DO ITPR3 EM COLANGIÓCITOS NA DHA.....	48
6.1.1 Análise da imunomarcção do ITPR3 em colangiócitos de camundongos induzidos com dieta etanólica 5%.....	52
6.1.2 Determinação da imunomarcção do ITPR3 em colangiócitos de camundongos machos <i>C57BL/6</i>.....	51
6.2 INVESTIGAÇÃO DOS FATORES DE TRANSCRIÇÃO QUE REGULAM A EXPRESSÃO DO ITPR3 EM COLANGIÓCITOS NA DHA.....	57
6.2.1 Investigação do fator de transcrição NF-kB em colangiócitos na DHA...	58
6.2.2 Investigação do microRNA-506 em colangiócitos na DHA.....	60
6.2.3 Investigação do fator de transcrição Nrf2 em colangiócitos na DHA.....	62
6.3 AVALIAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS NO POLIMORFISMO DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE <i>NFE2L2</i>	65
6.3.1 Avaliação do SNP rs35652124 (-214 A/G) na DHA.....	66
6.3.2 Avaliação do SNP rs6721961 (-178 A/G) na DHA.....	71
6.3.3 Avaliação do SNPs rs4893819 (-1275 G/A) na DHA.....	77
6.4 ASSOCIAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DOS SNPs E DOS NÍVEIS DE EXPRESSÃO DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO NRF2 AOS DADOS CLÍNICOS NA DHA.....	79
7 CONCLUSÃO.....	92
REFERÊNCIAS.....	93
AGRADECIMENTO ÀS AGÊNCIAS DE FOMENTO.....	105
ANEXOS.....	106

1. INTRODUÇÃO

O álcool é a substância viciante mais utilizada pelo homem e a doença hepática alcoólica (DHA) está entre os principais fatores causais de morbidade e mortalidade, responsável por 0,9% de todas as mortes no mundo e por 47,9% dos casos de falência hepática atribuída à cirrose, sendo a maior causa global de agressão hepática aguda e crônica (Avila *et al.*, 2019; Sarin *et al.*, 2019; Lamaz-Paz *et al.*, 2018; Rosato *et al.*, 2016).

O abuso de álcool representa uma situação expressiva à DHA em condições graves, que apesar dos avanços da medicina moderna e do acesso por parte da população às terapias existentes, não apresenta opções terapêuticas eficazes, sendo muito limitadas devido à falta de condições experimentais adequadas que recapitulem o espectro total da DHA em modelos *in vivo*, estando assim associada a uma elevada mortalidade precoce nos dias de hoje (Lamaz-Paz *et al.*, 2018; Almeida *et al.*, 2015; Bargalló-García *et al.*, 2013). Em que mais de 90% dos alcoólatras desenvolvem esteatose hepática e cerca de 20% a 40% destes desenvolvem formas mais graves da DHA (Chen *et al.*, 2018).

A DHA pode desenvolver um espectro variado de doenças subsequentes que referem à esteatose, esteato-hepatite, fibrose, cirrose e carcinoma hepatocelular (CHC) (O'Shea; Dasarathy e McCullough, 2010), entre as quais se destaca a hepatite alcoólica (HA), uma síndrome com características de insuficiência hepática aguda e crônica, de complicações graves e potencialmente letais, que dependendo da gravidade apresenta uma taxa de mortalidade que varia entre 15% a 50% dos casos. De acordo com diversos estudos, a HA apresenta elevada taxa de mortalidade a curto prazo, em que 40% dos casos que não recebem tratamento precoce com corticosteroides morrem nos primeiros 30 dias. Porém, a maioria dos casos de DHA envolve pacientes com fibrose avançada ou cirrose hepática (Singal e Shah, 2019; Caballeria, 2013; Lucey *et al.*, 2009; Minagawa *et al.*, 2007; Hirata *et al.*, 2002; Maddrey *et al.*, 1978).

A DHA pode assumir tanto uma fase aguda, caracterizada pela HA, quanto crônica, onde se destaca a fibrose e a cirrose hepática. Em pacientes com esteatose, o quadro geralmente é assintomático, com função hepática ligeiramente elevada e fígado aumentado (Bruha *et al.*, 2012). Enquanto que na hepatite alcoólica aguda, uma das consequências mais graves e comuns da DHA, o espectro clínico é variado e está associado a lesões histológicas típicas, incluindo esteatose, infiltrado inflamatório, principalmente por polimorfonucleares, ativação e liberação de citocinas pelas células de Kupfer – fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), interleucina-1 (IL-1), prostaglandinas, leucotrienos,

aumento da expressão de quimiocinas e moléculas de adesão – na qual o paciente pode apresentar náuseas, perda de apetite, emagrecimento, icterícia e disfunção hepática; como aumento no tempo de atividade da protrombina (TAP), hipoalbuminemia, ascite e encefalopatia hepática (Caballeria, 2013; Matos *et al.*, 2013; Bruha *et al.*, 2012).

Estudos realizados por Guerra & Nathanson, (2015), têm sugerido que durante a HA (fase aguda da DHA), pode ocorrer lesão hepática colestática na qual esta manifestação está associada a um prognóstico desfavorável da DHA, que embora seja uma doença que reflita principalmente danos inflamatórios aos hepatócitos, existem evidências que a HA pode ser um importante componente da colestase e que esta, por sua vez, pode favorecer à maior gravidade durante a DHA (Franca *et al.*, 2019; Guerra e Nathanson, 2015). Isto porque, distúrbios do fígado relacionados ao dano ou disfunção dos colangiócitos, incluindo cirrose biliar primária, colangite esclerosante, atresia biliar e obstrução biliar, conhecidos coletivamente como colangiopatias – conjunto de desordens de diferentes etiologias, mas que culminam em danos nos ductos biliares e na diminuição da secreção biliar – expressam complicações mais graves das doenças hepáticas (Weerachayaphorn *et al.*, 2015; Altamirano *et al.*, 2014).

Apesar da ampla variedade e diferença entre as etiologias, a perda da expressão do canal intracelular de cálcio (Ca^{2+}) e dos receptores de inositol 1,4,5-trifosfato tipo 3 (ITPR3) nos colangiócitos, parece ser uma via final comum entre as colangiopatias (Kasztelan-Szczerbinska *et al.*, 2013). ITPR3 desempenha um papel fundamental que constitui na liberação de Ca^{2+} , sendo o principal canal de liberação do Ca^{2+} intracelular em colangiócitos e sua expressão é necessária para mediar a secreção de fluido biliar e de bicarbonato (HCO_3^-) (Lock *et al.*, 2019; Altamirano *et al.*, 2014; Hirschfield *et al.*, 2010).

Além disso, uma base crescente de evidências têm associado variações genéticas à DHA, entre as quais, um restrito número de polimorfismos de nucleotídeos simples (SNPs – *single nucleotide polymorphism*) que demonstraram associação a um risco aumentado de desenvolver a DHA (Kolla *et al.*, 2018; Anstee; Seth; Day, 2016; Salameh *et al.*, 2015). O fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2) é um regulador intracelular de adaptação antioxidante ao estresse oxidativo que devido seu papel citoprotetor tem sido extensivamente estudado como alvo terapêutico para a DHA (Sun *et al.*, 2018). Contudo, polimorfismos genéticos do Nrf2 têm demonstrado associação com diversas doenças humanas, implicando que fatores genéticos envolvendo Nrf2 estejam envolvidos ao início e à progressão destas doenças (Kunнас; Määttä; Nikkari, 2016).

1.1 HIPÓTESE

Acreditamos que a DHA seja um importante fator relacionado à diminuição da expressão intracelular do ITPR3, resultando no comprometimento da atividade dos canais de Ca^{2+} em colangiócitos. A indução alcoólica, através dos efeitos oxidativos também em colangiócitos, promove efeitos moduladores na expressão de fatores de transcrição responsáveis pela expressão de agentes antioxidantes, tais como a glutathione peroxidase (GPx), a superóxido dismutase (SOD) e a catalase, assim como, do fator de transcrição denominado “fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2” (Nrf2), que além de atuar como fator protetor durante o estresse oxidativo, também pode estar envolvido na diminuição da expressão de receptores ITP3R em colangiócitos durante a DHA.

Além disso, fatores genéticos associados às SNPs do gene *NFE2L2* (*Nuclear Factor, Erythroid 2 Like 2*), responsável por codificar o fator de transcrição Nrf2 – fator de proteção expresso durante o estresse oxidativo alcoólico – seja significativo em pacientes com histórico de DHA clinicamente comprovado. Tornando este estudo um desafio científico relevante na busca por uma compreensão mais ampla quanto a fisiopatologia desta doença e na expectativa futura em direcionar melhor as diretrizes terapêuticas no tratamento do amplo espectro de doenças ocasionadas pela ingestão prolongada de álcool.

2. JUSTIFICATIVA

O consumo excessivo de álcool é a terceira principal causa de morte evitável no mundo com mais de 3 milhões de mortes (5,3% das mortes em 2016) e a DHA o segundo fator etiológico mais comum responsável pela cirrose hepática, com 607 mil mortes em 2016 (Avila *et al.*, 2019; Kolla *et al.*, 2018; Yoon e Chen 2016; Almeida *et al.*, 2015). Estima-se que 5% a 7% dos adultos bebam em excesso (Basra e Anand, 2011), 10% a 12% da população mundial seja viciada em álcool (Wang *et al.*, 2012) e no Brasil 11,2% das 107 maiores cidades do país tenham esse problema (Bertola *et al.*, 2013).

A DHA apresenta diferentes complicações na qual a HA seja uma condição grave no abuso do álcool e a forma aguda mais grave da DHA, com mortalidade à curto prazo em até 50% dos casos (Chen *et al.*, 2018; Altamirano *et al.*, 2014; Bruha *et al.*, 2012; Lucey *et al.*, 2009; Maddrey *et al.*, 1978). Embora a incidência nas diferentes complicações da DHA seja desconhecida, a prevalência da HA pode ser de 1 para cada 5 pessoas, representando, segundo Beckett, em sua primeira descrição (1961), "*o espectro clínico de maior desafio na doença hepática alcoólica*", sendo um grave problema de saúde pública (Lazaro *et al.*, 2015; Naveau *et al.*, 1997; Beckett; Livingstone; Hill, 1961).

Apesar da patogênese da HA ser assunto de investigação ativa e estar associada a danos oxidativos resultantes da infiltração inflamatória nos hepatócitos (Lazaro *et al.*, 2015; Bertola *et al.*, 2013), há poucos tratamentos e baixa eficácia farmacológica. Há três décadas que a terapia farmacológica se baseia na utilização de anti-inflamatórios da classe dos corticosteróides e na pentoxifilina (ações anti-TNF- α), indicada em pacientes quando os corticosteróides são contra-indicados (Caballeria, 2013; Lucey *et al.*, 2009). Apesar da abstinência ser o tratamento preferencial, a psicoterapia tem sido crucial para evitar as recaídas e o transplante de fígado a única alternativa para casos mais graves (Sarin *et al.*, 2019; Rosato *et al.*, 2016). Entretanto, estudos anteriores já demonstravam que nenhuma destas terapias é totalmente eficaz (Lucey *et al.*, 2009). Talvez a melhor estratégia contra a DHA dependa do diagnóstico de biomarcadores, de preditores precisos da sua progressão e de novas terapias que inibam ou revertam a doença (Lamaz-Paz *et al.*, 2018).

Dado o fato o dano hepatocelular é tido como um dos componentes mais críticos na DHA, mas demonstrar que alterações hepática-colestáticas é também um componente presente nesta doença, poderá mudar nossa compreensão sobre a DHA e os paradigmas de sua fisiopatologia, abrindo a possibilidade para novas estratégias terapêuticas.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 CONTEXTO HISTÓRICO

French, em 1912, já descrevia os distúrbios do fígado como uma desordem ambiental relacionada com a falta de exercício, excesso de comida, e às doenças tropicais. Algumas décadas depois, ocorreu observações semelhantes que também mencionou a cirrose como tendo relação com o clima temperado em algumas regiões da Europa, o que propiciava ao alcoolismo (Hurst, 1941; French, 1912). Mas foi apenas a partir da década de 50 que os efeitos do álcool no fígado, em casos de alcoolismo crônico, foram aparentemente confirmados. Após a observação cuidadosa dos testes de função hepática e de biópsias, a investigação das transaminases no soro de pacientes alcoólatras crônicos demonstraram elevação após o consumo de álcool, concluindo que tais alterações foram indícios da lesão hepática, comparados ao grupo dos pacientes saudáveis, que não apresentaram quaisquer alterações nos parâmetros investigados (Bang, *et al.*, 1958; Summerskill; Wolfe; Davidson, 1957). Mais tarde, tais descobertas foram confirmadas após a observação do aumento da atividade das transaminases no soro de pacientes em recuperação que ingeriram álcool durante a recaída (Hed, 1959; Neame e Joubert, 1961).

Os efeitos precisos do álcool no alcoolismo crônico tem sido debatido há anos, mas foi Beckett e seus colaboradores, em 1961, que descreveram a HA, como uma grave consequência da DHA, caracterizada por icterícia e típicas alterações histológicas no fígado e, por vezes, fatal que se intensifica no alcoolismo crônico. Em 1965, um trabalho pioneiro realizado por Lieber e colaboradores, identificou a função hepatotóxica do álcool, além dos efeitos da desnutrição já anteriormente estabelecidos (Lieber; Jones; Decarli, 1965; Beckett; Livingstone; Hill, 1961). Contudo, a DHA é provavelmente a forma mais antiga de lesão hepática conhecida pela humanidade, uma vez que dados históricos sugerem evidências que as bebidas fermentadas já existiam desde o período Neolítico (cerca de 10.000 a.C.) e a DHA certamente desde então (Patrick, 1952).

Além da HA, a cirrose hepática também representa uma grave consequência da DHA, que há várias décadas tem demonstrado ser um grave problema de saúde pública mundial. Segundo relatórios de vigilância publicados anualmente pelo *National Center for Health Statistics (NCHS)*, nos Estados Unidos (EUA), até o fim da proibição do álcool no país, em 1933, os casos de mortes por cirrose hepática foram de 11,9 óbitos por

100.000 habitantes, no final da proibição houve um pico de 18,1 mortes por 100.000 habitantes até 1973 (Yoon e Chen 2016).

De acordo com histórico recente, nas últimas duas décadas tem se observado uma estabilidade, e em alguns casos, até uma diminuição da ingestão alcoólica nos países ocidentais. Em controvérsia, ao longo dos últimos trinta anos ocorreu um crescimento no consumo de álcool na Europa Oriental e nos países em desenvolvimento (Bruha; Dvorak; Petryl, 2012; Caballeria, 2007).

3.2 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS

O consumo excessivo de álcool representa um problema de saúde pública, que na última década vem sendo demonstrado, através de estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS), que cerca de 2 bilhões de pessoas no mundo ingeriam bebida alcoólica, e 76,3 milhões apresentaram alguma doença relacionada ao consumo de álcool, ocasionando 2,5 milhões de mortes ao ano (*World Health Organization*, 2011). Mais recentemente, em 2018, a OMS publicou novos dados que refletem poucas mudanças neste paradigma, onde cerca de 2,348 bilhões de pessoas (43% da população) ingerem bebida alcoólica, resultando em mais de 3 milhões de mortes (5,3% de todas as mortes no mundo) devido o consumo alcoólico prolongado (*World Health Organization*, 2018). Mesmo assim, a OMS (2018), informa que diversos estudos prevêem um aumento no consumo global de álcool nos próximos 10 anos.

Investigações epidemiológicas têm demonstrado que as doenças hepáticas ocasionadas pelo consumo excessivo de álcool representam uma causa significativa de morbidade e mortalidade nos países desenvolvidos da Europa (Peiyuan *et al.*, 2017). Nestes países, existe uma relação proporcional do consumo *per capita* (CPC) de álcool e a mortalidade por cirrose hepática, sendo maior na França e na Espanha, com mais de 30 óbitos ao ano por cada 100.000 habitantes, em contraste aos países do norte da Europa, onde a taxa de óbitos é de 5 para cada 100.000 habitantes, e na Europa Central (15 mortes para cada 100.000). A mortalidade é maior nos homens, com idade entre 35 e 64 anos, e menor nas mulheres (Bruha; Dvorak; Petryl, 2012). No Brasil, o álcool esteve associado com até 69,5% dos índices de cirrose hepática (*World Health Organization*, 2018).

De acordo com relatos de Chen e colaboradores (2018), mais de 90% dos bebedores crônicos desenvolvem esteatose hepática, um estágio inicial e reversível da DHA. Contudo, na cirrose alcoólica, uma condição irreversível associada à fibrose

progressiva e à distorção da arquitetura hepática, a sobrevivência média dos pacientes é de apenas 1-2 anos, justificando a cirrose alcoólica avançada como um fator associado a marcadores de morbidade, mortalidade e encurtamento da expectativa de vida, sendo o principal indicador para o transplante hepático nestes pacientes (Kolla *et al.*, 2018; Bruha, Dvorak; Petrtyl, 2012). Em 2013, a cirrose hepática foi a 12ª principal causa de morte nos Estados Unidos, com um total de 37.890 mortes, 1.585 casos a mais do que em 2012 (Yoon e Chen 2016).

Na HA, forma aguda e mais grave da DHA, a mortalidade a curto prazo permanece elevada (20-30%), provavelmente devido à má caracterização do paciente e a necessidade de terapias modernas direcionadas à doença (Altamiro *et al.*, 2014). Em um estudo realizado por Barrio e colaboradores, em 2004, de 256 alcoólatras regulares sob atendimento hospitalar, não por causa de queixas no fígado, 45% apresentaram esteatose, 34% esteato-hepatite, 10% esteato-hepatite com cirrose e 10% com cirrose isolada, em suas biópsias hepáticas.

Apesar das DHA estarem associadas ao etilismo crônico, a quantidade exata de consumo alcoólico que coloque um indivíduo em risco de desenvolver a DHA não é conhecida. Entretanto, a quantidade de álcool puro (não diluído) e a duração desse consumo estão intimamente relacionadas às complicações, como a cirrose e a HA (Bruha, Dvorak; Petrtyl, 2012; Basra e Anand, 2011). Barrio e colaboradores (2004) verificaram que alcoólatras crônicos com histórico de ingestão diária de 30 a 80 gramas (g) de álcool puro em média, por mais de 10 anos, desenvolverão uma DHA a uma taxa de quase 100%. Em estudo semelhante, Basra e Anand, em 2011, demonstrou que na prática a maioria dos pacientes com HA ingerem mais do que 100g de álcool por dia, o que representa de 6-7 doses diárias de uma bebida que contenha 13-15g de álcool.

Consumir bebida alcoólica de diferentes variedades, em padrões de consumo misto e fora das refeições foi significativo ao risco elevado no desenvolvimento da DHA (Bertola *et al.*, 2013). Embora existam casos de pacientes com histórico de abuso alcoólico inferior a 10 anos, geralmente o paciente com DHA apresenta elevado consumo de álcool por duas ou mais décadas, em que mais de 95% dos bebedores crônicos evoluam para esteatose hepática, e destes, 20-40% progridam para hepatite, cirrose e CHC (Bertola *et al.*, 2013; Basra e Anand, 2011; Naveau *et al.*, 1997).

O consumo de álcool em todo o mundo está em constante evolução tendo influência sobre a prevalência e incidência da DHA. Diversos estudos demonstram que o consumo de álcool é comum na maioria das regiões em todo o mundo. Dados recentes da

OMS, em 2018, revelam que o *CPC* entre as pessoas com 15 anos ou mais equivale a média de 6,4 litros (L) de álcool puro ao ano (Figura 1), equivalente a 13,9g de álcool puro por dia, sendo a Europa, especialmente na Rússia e países vizinhos, a região de maior consumo (acima de 10 L). Países do continente americano, região do Pacífico Ocidental e também alguns países da África, apresentam consumo relativamente alto (7,5 - 9,9 L de *CPC*), enquanto que nas regiões islâmicas do Mediterrâneo Oriental e no sudeste da Ásia, predominantemente na Índia e Indonésia, as regiões de menor consumo, com 2,5 L de *CPC* (*World Health Organization, 2018; Basra e Anand, 2011; Rehm et al., 2009*).

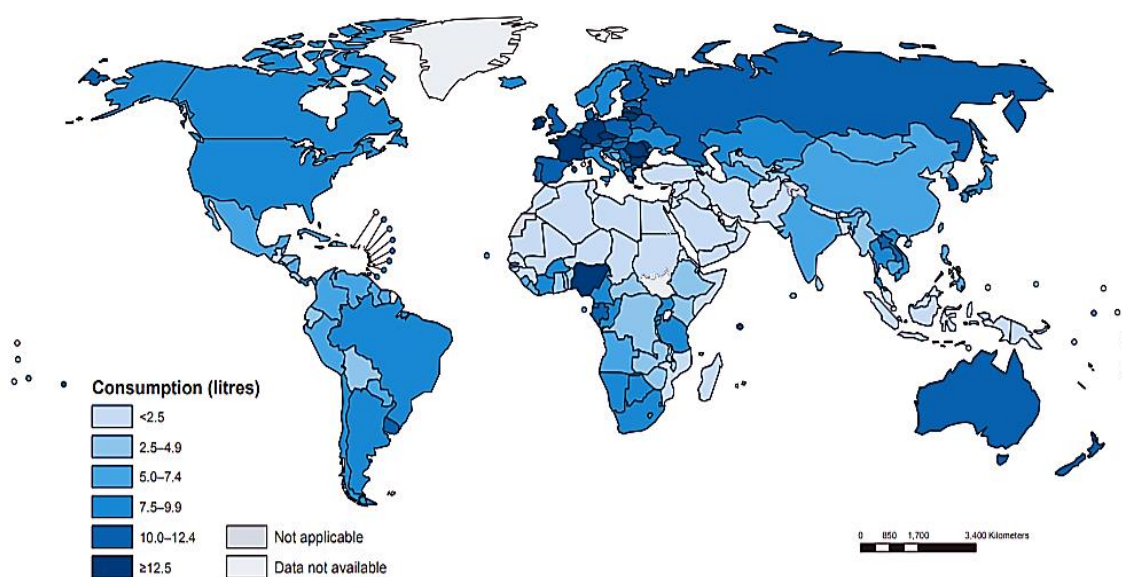


Figura 1: CPC total de litros de álcool em pessoas a partir dos 15 anos de idade. Relatório global da OMS sobre o consumo de álcool no mundo.

Fonte: *World Health Organization, 2018* (adaptado).

No mundo, cerca de 237 milhões de homens e 46 milhões de mulheres sofrem de transtornos provocados pelo consumo de álcool, e mais de um quarto da população na faixa etária entre 15-19 anos de idade são etilistas habituais (*World Health Organization, 2018*).

Segundo relatório da OMS publicados desde 2011, "*Os adultos europeus consomem três bebidas alcoólicas por dia*", o equivalente a 12,5 L de álcool puro por ano, ou seja, 27g por dia. Na Polônia, em 2005, o *CPC* de álcool entre os adultos foi de 13,3 L de álcool puro, representando o maior consumo de álcool em todo mundo (*Kasztelan-Szczerbinska et al., 2013; World Health Organization, 2011*). Nos Estados Unidos, 68% dos adultos consomem pelo menos uma bebida alcoólica por mês, e 18%

dos homens, mas apenas 3% das mulheres, são classificados como bebedores crônicos. O consumo crônico é mais comum em brancos que em afro-americanos ou hispânicos, geralmente em pessoas com baixo nível de escolaridade e renda, desempregados ou naqueles em que os empregos são caracterizados pela alienação, estresse e baixa satisfação no trabalho (Singh e Hoyert, 2010). No Brasil, existem poucos estudos epidemiológicos sobre o alcoolismo, dados sobre o assunto revelam que 40% da população acima dos 15 anos consumiu alguma bebida alcoólica nos últimos 12 meses (CPC de 7,8 L – maior que a média global de 6,4 L), sendo os homens a maioria (54%), com um consumo anual de 13,4 L, em comparação às mulheres (27,3%), que consumiram cerca de 2,4 L no ano (*World Health Organization*, 2018). Entre os poucos estudos na área realizados em território brasileiro, Bertola e colaboradores (2013) evidenciaram uma prevalência de 11,2% de etilistas nas principais cidades do país.

3.3 PATOGÊNESE DA INFLAMAÇÃO HEPÁTICA INDUZIDA PELO ÁLCOOL

O álcool, ingrediente presente nas bebidas alcoólicas, têm sido utilizado à séculos como uma substância recreativa (Prom-Wormley *et al.*, 2017). Contudo, os mecanismos que tornam, através da ingestão alcoólica, algumas pessoas mais suscetíveis às formas graves da DHA não são claros, e muitos fatores de risco podem estar envolvidos na patogênese desta doença, assim como, nos padrões de absorção e metabolismo do álcool, como gênero, idade, obesidade, fatores dietéticos, etnia, tabagismo e fatores genéticos. Além disso, diversos estudos sugerem que os padrões de ingestão de bebida alcoólica também influenciam significativamente na patogênese da DHA (Sun *et al.*, 2018; Altamiro *et al.*, 2014). A gravidade e o prognóstico da DHA dependem de uma série de fatores supracitados, entre os quais, devemos destacar também a presença de inflamação hepática (Bruha; Dvorak; Petryl, 2012).

Após ser absorvido pelo trato gastrointestinal (TGI), 2% até 10% apenas do álcool é eliminado na forma inalterada pelos pulmões, rins e através da pele (suor), sendo a maioria processada pelo fígado (Lamas-Paz *et al.*, 2018). Fatores envolvidos no metabolismo do álcool contribuem diretamente para a lesão hepática alcoólica. Tanto a álcool desidrogenase (ADH), responsável pela degradação de quantidades limitadas de álcool, quanto o citocromo P-450 da família 2E1 (CYP2E1), induzido pelo consumo excessivo de álcool, convertem o álcool em acetaldeído, que por sua vez é convertido em acetato (após a perda de hidrogênio) pela catálise de acetadeído desidrogenase (ALDH),

após oxidação nos hepatócitos, que assim como muitas citocinas (TNF α), o estresse oxidativo e fatores que contribuem para a síntese de ácidos graxos e o acúmulo de triglicerídeos no fígado (NAD⁺/NADH), favorecem para a lesão hepática induzida pelo álcool (Lamas-Paz *et al.*, 2018; Bruha; Dvorak; Petrtyl, 2012; Yin *et al.*, 1999).

No espectro da DHA, a esteatose é caracterizada como uma condição quase completamente benigna, com discretas alterações das transaminases, enquanto que na esteato-hepatite alcoólica, o quadro se baseia na esteatose predominantemente macrovesicular, acompanhado de infiltrado inflamatório presente geralmente em focos lobulares dispersos, podendo atingir os espaços-porta, constituído por neutrófilos, linfócitos, plasmócitos e macrófagos. E lesão hepatocitária, em que ocorre a balonização dos hepatócitos, podendo estar associada a fibrose perissinusoidal e a presença de corpos de *Mallory-Denk* (Matos *et al.*, 2013; Bruha; Dvorak; Petrtyl, 2012).

Na hepatite alcoólica aguda, a gravidade da doença está associada à mortalidade de até 50% dos casos, em que ocorre de forma muito característica o edema dos hepatócitos, a necrose, a fibrose e a infiltração de neutrófilos - um marcador da degeneração induzida pela HA (Bruha; Dvorak; Petrtyl, 2012; Basra e Anand, 2011).

Várias citocinas pró-inflamatórias foram detectadas em pacientes com HA, contribuindo para infiltração de neutrófilos, uma característica da doença e um marcador histológico da hepatite induzida pelo álcool que está relacionada à gravidade da hepatite, sugerindo sua provável contribuição para o dano hepatocelular (degeneração dos hepatócitos, fibrose e necrose), possivelmente pelo estresse oxidativo e ação de proteases que agridem e destroem os hepatócitos. Porém, os mecanismos pelos quais os neutrófilos são recrutados para o fígado durante a lesão hepática alcoólica ainda não estão completamente elucidados (Bertola *et al.*, 2013; Basra e Anand, 2011).

Segundo Lamas-Paz e colaboradores, (2018), cerca de 35% dos casos de DHA evoluem para fibrose hepática. O dano hepático induzido pelo álcool estabelece um ambiente pró-inflamatório através do aumento significativo da produção de citocinas, quimiocinas e diferentes mediadores do sistema imunológico inato. Este ambiente causa a ativação de células hepáticas estreladas e miofibroblastos, aumentando a produção de proteínas da matriz extracelular (MEC), que podem induzir, assim como fatores associados às endotoxinas, à fibrogênese hepática. Assim, a fibrose hepática alcoólica, que pode evoluir para a cirrose alcoólica em 8% a 20% dos etilistas crônicos (fator de risco para CHC) é resultado de uma resposta imunológica intensa que envolve diferentes tipos celulares e variadas vias de transdução de sinal.

Estudo realizado em modelos animais por Bertola e colaboradores, em 2013, foi possível sugerir uma provável fisiopatologia no recrutamento de neutrófilos no fígado após ingestão acentuada de álcool (Figura 2). Diversas moléculas associadas à inflamação estão presentes após ingestão elevada de álcool e provavelmente na HA, como as interleucinas (IL-10, IL-6 e IL-1 β), TNF- α , e as quimiocinas da família das proteínas inflamatórias de macrófagos (MIP-2, MIP-1 α , MIP-1 β e MCP-1). Contudo, a E-selectina, também chamada de CD62 da família E (CD62E), parece desempenhar um papel crítico na indução do recrutamento de neutrófilos, na inflamação e lesão hepática após a ingestão de álcool. Outro mecanismo, demonstra que em pacientes com DHA, ocorre aumento nos níveis de lipopolissacarídeos (LPS) que estimulam citocinas e a síntese de oxigênio reativo gerando a fibrogênese (Lamas-Paz *et al.*, 2018; Bertola *et al.*, 2013).

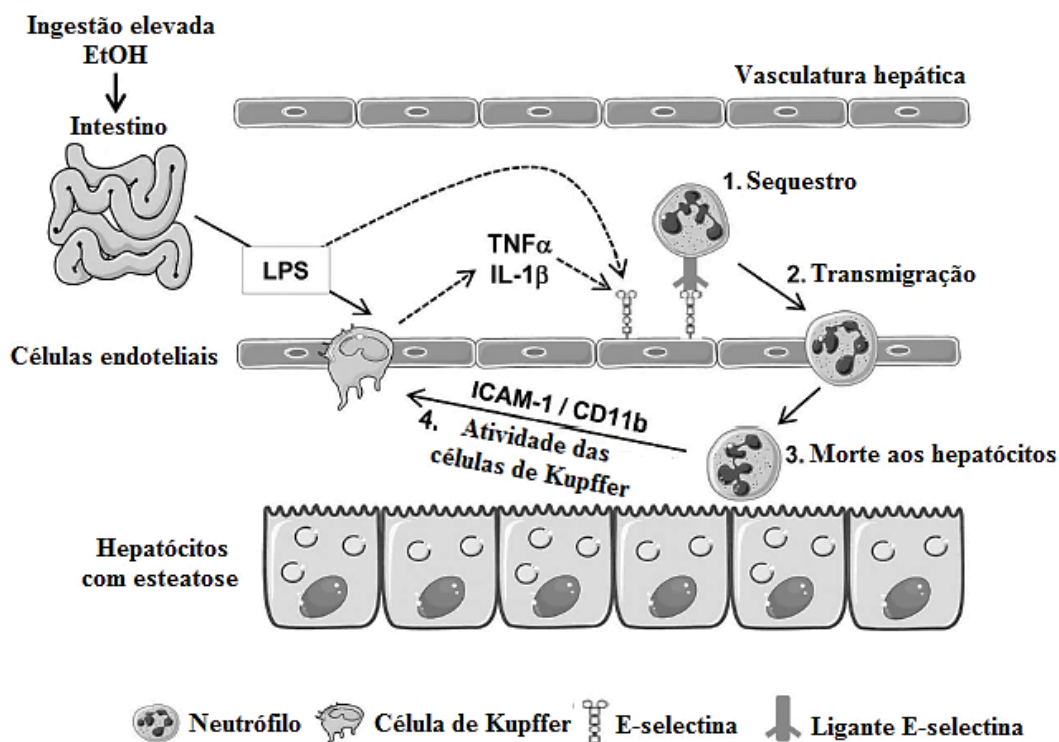


Figura 2: Modelo esquemático ilustrativo da provável via fisiopatológica do recrutamento de neutrófilos hepáticos durante a indução alcoólica. O consumo de EtOH eleva a permeabilidade intestinal em consequentes níveis de lipopolissacarídeos portal (LPS). LPS estimula as células de Kupffer à produzir TNF- α e interleucina-1 beta (IL-1 β) que com LPS regulam positivamente a E-selectina no endotélio celular, contribuindo para a regulação hepática positiva neste modelo crônico-compulsivo. A selectina se liga aos neutrófilos induzindo a ativação, o sequestro e a sua transmigração. Neutrófilos ativados destroem os hepatócitos esteatóticos e induzem as células de Kupffer à ativação através da interação de moléculas de adesão intracelular-1 (ICAM-1) e CD11b, promovendo a inflamação e a necrose hepatocelular.

Fonte: Bertola *et al.*, 2013 (adaptado).

De modo geral, em sua patogenia, a DHA envolve a agressão hepática através da metabolização do álcool em acetaldeído, o estresse oxidativo e a peroxidação lipídica, associada a alteração da permeabilidade intestinal à passagem de endotoxinas para a circulação portal. Tais processos condicionam a ativação das células de Kupffer e liberação de citocinas (TNF- α , IL-1, prostaglandinas, leucotrienos), aumento da expressão de moléculas de adesão e quimiocinas, desencadeando uma resposta imune local (Matos *et al.*, 2013).

3.4 DHA E EVIDÊNCIAS DE COMPROMETIMENTO EM COLANGIÓCITOS

A DHA abrange um amplo espectro de doenças hepáticas crônicas, que surgem após anos de consumo excessivo de álcool e representa um espectro de doenças e alterações morfológicas que variam desde a esteatose hepática, à inflamação, necrose hepática na HA, à fibrose progressiva, cirrose hepática e, finalmente, CHC, sendo mais comum nos países desenvolvidos da Europa e da América, onde as DHA representam uma causa significativa de morbidade e mortalidade (Chen H. *et al.*, 2018; Peiyuan *et al.*, 2017; Lieber, 2000).

Baseado em aspectos clínicos, pacientes com DHA normalmente apresentam desnutrição proteico-calórica, combinada ou isolada, e lesão hepática (Peiyuan *et al.*, 2017). Na HA, por exemplo, que pode se desenvolver em qualquer momento durante a DHA, a maioria dos casos envolvem pacientes com fibrose avançada ou cirrose, com aumento significativo nos níveis de bilirrubina, sendo este um dos achados mais ameaçadores em pacientes com HA, onde a presença de bilirrubina e de fibrose estão associados a mortalidade a curto prazo nesta doença, sendo uma complicação grave e potencialmente letal com uma taxa de mortalidade imediata que, de acordo com a gravidade, varia entre 15% a 50% dos casos (Altamiro *et al.*, 2014; Caballeria, 2013; Basra e Anand, 2011; Lucey *et al.*, 2009; Minagawa *et al.*, 2007; Hirata *et al.*, 2002; Maddrey *et al.*, 1978).

Durante a DHA e, especialmente na HA, a presença anormal de bilirrubina pode refletir tanto o transporte hepatocelular deficiente da bile quanto dificuldade no fluxo biliar hepático (Altamiro *et al.*, 2014; Collares *et al.*, 2014). Lesões ocorridas em regiões de transporte hepatocelular e no fluxo da bile podem indicar colangiopatia, uma vez que clinicamente qualquer alteração que interfira na síntese biliar nos hepatócitos em modificações na condução dos ductos biliares e em sua excreção a nível do tubo digestivo,

caracteriza colangiopatia e pode estar relacionada a condições patológicas severas e variáveis de amplo espectro e síndrome bioquímica (Collares *et al.*, 2014; Panqueva, 2014; Pooper e Szanto, 1956).

As consequências da colangiopatia e dos mecanismos de lesão hepática, bem como, a progressão da fibrose e da cirrose hepática, estão relacionados com o acúmulo dos ácidos biliares no fígado (Costa *et al.*, 2014): o fígado, por meio de transporte ativo, secreta sais biliares através dos canaliculos e das fendas hepatocelulares, e após secretada, componentes da bÍlis, especialmente sÓdio e Água, são atraÍdos por osmose por um fluxo que passa através de um sistema biliar de ductos de coleta (canais biliares) que drenam a bÍlis em um circuito em torno dos hepatÓcitos e formam vias biliares atÉ os ductos hepáticos, onde a bile solubiliza gorduras e vitaminas, auxiliando na digestão e absorção de nutrientes (Panqueva, 2014).

Notavelmente, nos últimos 35 anos, não há estudos definitivos na investigao da incidência entre a DHA e seus efeitos em colangiÓcitos. Em grande parte tem se tentado correlacionar a DHA  efeitos colestáticos, mas não  influência que a ingestão alcoÓlica crônica pode induzir sobre a modulao da sinalizao de canais de Ca^{2+} em colangiÓcitos e quais mecanismos moleculares estariam envolvidos.

Para Amini e Runyon (2010), a HA pode ser uma evidência na colestase intra-hepática para o clÍnico, desde que descartada obstruo mecânica biliar. Em casos de colestase discreta ou leve, frequentemente observados nas hepatites pelo vÍrus A (HAV) e na hepatite pelo vÍrus E (HEV), podem ser observados também alguns casos de HA (Collares *et al.*, 2014).

Estudo realizado em 2011, por Spahr e colaboradores, identificou a presença de colestase intraparenquimatosa marcante (>50% do parenquima) como um fator independente de pior desfecho a curto prazo em pacientes com HA histologicamente comprovada. Em 2013, um estudo semelhante realizado por Matos e colaboradores, revelou a presença de colestase canalicular, proliferao ductular, lesões veno-oclusivas e necrose hialina esclerosante  muito sugestiva da etiologia alcoÓlica na esteato-hepatite. Em 2014, Panqueava citou que *“a esteatose hepática alcoÓlica e não alcoÓlica, estão entre as causas intra-hepáticas colestáticas”*. No mesmo ano, Altamirano e colaboradores (2014), evidenciou que efeitos colestáticos na HA foi um forte indÍcio de diminuio da sobrevivência a curto prazo. Mais recentemente, Guerra e Nathanson (2015), concluíram que *“evidências recentes tem sugerido que a colestase pode ocorrer na HA, estando associada a um pior resultado nesta doença”*, após dados preliminares

que demonstraram evidências histológicas em biópsias de pacientes com HA para os efeitos colestáticos e que a HA parece reduzir os níveis de ITPR3 em ductos biliares, assim como, sua localização na maioria dos pacientes investigados.

De fato, a HA é analiticamente caracterizada por efeitos colestáticos e os níveis séricos de bilirrubina são um dos mais perigosos indicadores no prognóstico desses pacientes, onde a secreção de sais biliares é prejudicada, levando ao aumento da sua concentração sérica em pacientes com DHA grave. Porém, novos estudos devem identificar os principais fatores moleculares da colangiopatia na HA afim de identificar alvos terapêuticos mais eficazes (Altamiro *et al.*, 2014).

3.5 CANAIS DE CÁLCIO E RECEPTOR DE INOSITOL 3,4,5-TRIFOSFATO TIPO 3 EM COLANGIÓCITOS

Sinais citosólicos de Ca^{2+} são utilizados para regular diferentes eventos celulares, como expressão gênica, secreção, contração, energia mitocondrial, excitabilidade, plasticidade sináptica e muitas vezes mais de um dos eventos na mesma célula. Tais eventos ocorrem através da ativação de segundo mensageiro (proteína G) mediado por inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3) (Lock *et al.*, 2019).

O IP_3 através de múltiplos subtipos de receptores (ITPR1, ITPR2 e ITPR3) expressos em diferentes tecidos, desempenha papel fundamental no controle de importantes funções celulares através da sinalização de Ca^{2+} . No fígado, o Ca^{2+} do citosol regula uma grande variedade de funções hepáticas (Hirata *et al.*, 2002). Além disso, estudos realizados por Hagar e colaboradores (1998), e Ramos-Franco; Fill; Mignery, no mesmo ano (1998), já demonstravam diferenças funcionais no padrão de expressão entre os subtipos do ITPR, sugerindo que os subtipos desses receptores poderiam gerar sinalizações específicas de Ca^{2+} (Miyakawa *et al.*, 1999; Hagar *et al.*, 1998; Ramos-Franco; Fill; Mignery, 1998; Berridge, 1993).

Os colangiócitos expressam as três isoformas do ITPR, mas em diferentes quantidades e distribuições subcelulares; os tipos I e II (ITPR1 e ITPR2) são encontrados distribuídos mais uniformemente em todo citosol, enquanto a isoforma tipo III (ITPR3) está mais concentrada na região apical, sendo a isoforma mais fortemente expressa em relação aos outros tipos (Weerachayaphorn *et al.*, 2016; Minagawa *et al.*, 2007; Hirata *et al.*, 2002).

A secreção biliar não depende apenas da formação da bile canalicular primária pelos hepatócitos, mas também pelos colangiócitos, os quais são capazes de elevar a taxa de fluxo biliar em até 50%. Entretanto, em condições normais, o principal papel dos colangiócitos não é o de aumentar o fluxo biliar e sim o de modificar sua composição, sendo responsável pela regulação da concentração de bicarbonato biliar (Franca *et al.*, 2019; Minagawa *et al.*, 2007).

A árvore biliar desempenha um importante papel no condicionamento da secreção canalicular hepática da bÍlis através das atividades combinadas entre os hepatócitos e os colangiócitos, onde produtos de excreção conjugados com colesterol e outros lipÍdeos são secretados pelos hepatócitos, através de transportadores específicos na membrana apical (canalicular), e pela secreção ativa, principalmente, de bicarbonato (HCO_3^-) e água, para o lÚmem dos ductos biliares, através dos colangiócitos (Guerra e Nathanson, 2015; Minagawa *et al.*, 2007).

Os processos de ativação e estímulo em colangiócitos ocorrem através de duas vias distintas, a via parÁcrina e a endÓcrina, que ocasionam a secreção de água e a alcalinização biliar com o fluxo luminal de cloreto e bicarbonato (Hirschfield *et al.*, 2010). A secreção de HCO_3^- biliar nos colangiócitos ocorre através de duas vias independentes (Figura 3). A primeira é estimulada por hormÔnios (endÓcrina), como a secretina, e mediada pela adenosina monofosfato ciclase (AMPC), onde o AMPC ativa o Regulador da Condutância Transmembrana na Fibriose CÍstica (CFTR) e o cloreto (Cl^-) é liberado no lÚmen do ducto, sendo substituído por HCO_3^- através de um permutador de cloreto-bicarbonato. Acredita-se também que em alguns sistemas o HCO_3^- seja liberado diretamente através do CFTR e evidências limitadas sugerem que isto talvez ocorra inclusive nos colangiócitos (Minagawa *et al.*, 2007). A segunda via secretora em colangiócitos é estimulada por neurotransmissores, já que os colangiócitos expressam receptores, como adrenérgicos 1 e 2, muscarÍnicos tipo 3 (μ_3) e serotoninérgicos, por agentes da via autÓcrina, como a adenosina trifosfato (ATP), sendo mediada pela concentração de Ca^{2+} no citosol. O Ca^{2+} ativa os canais de Cl^- dependentes de Ca^{2+} na membrana plasmática, que por sua vez libera Cl^- que também é substituído por HCO_3^- através de um permutador de cloreto-bicarbonato (Hirschfield *et al.*, 2010; Minagawa *et al.*, 2007).

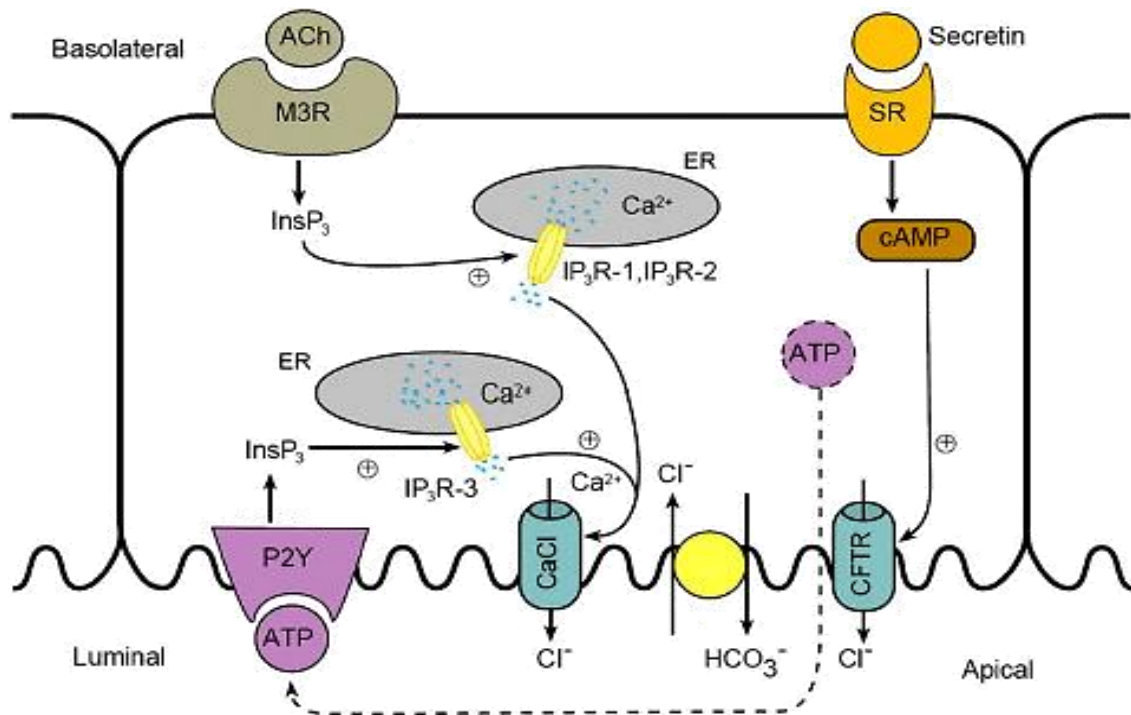


Figura 3: Sinalização da secreção de bicarbonato em colangiócitos. Os eventos de sinalização celular que configuram a secreção de bicarbonato em colangiócitos ocorrem mediante a ativação de duas vias principais, a via hormonal e a via parácrina, onde o ITPR3 são ativados por diferentes ligantes, como por exemplo, a secretina, a acetilcolina, o ATP e o CFTR, através da ativação de receptores acoplados à proteínas G e estimulados à conduzirem a secreção de Ca^{2+} , promovendo a atividade de diferentes mecanismos celular.

Fonte: Minagawa, 2007.

Embora a HA seja considerada uma condição que reflete principalmente dano inflamatório aos hepatócitos, evidências sugerem que a colestase também seja um componente importante da DHA durante a HA, na qual a presença de colestase representa um perfil de maior gravidade na HA (Kasztelan-Szczerbinska *et. al.*, 2013; Minagawa *et al.*, 2007).

Dessa forma, apesar das etiologias amplamente diferentes, a perda de expressão do canal intracelular de Ca^{2+} e dos receptores de ITPR nos colangiócitos parece ser uma via final comum entre as colangiopatias, onde os colangiócitos secretores localizados no epitélio da árvore biliar, sejam os principais alvos nos distúrbios provocados pelas colangiopatias (Franca *et al.*, 2019; Kasztelan-Szczerbinska *et. al.*, 2013; Minagawa *et al.*, 2007).

3.6 FATORES DE TRANSCRIÇÃO RESPONSÁVEIS POR REGULAR A EXPRESSÃO DE ITPR3 EM COLANGIÓCITOS

O ITPR3 é o principal canal de liberação de Ca^{2+} intracelular na maioria das células, incluindo os colangiócitos, que possui as três isoformas do ITPR, embora em diferentes níveis de expressão, onde ITPR3 é a principal isoforma expressa constituindo cerca de 90% do total comparado às demais isoformas 1 e 2 do ITPR, que somadas representam apenas 10% da totalidade (Weerachayaphorn *et al.*, 2016; Guerra e Nathanson, 2015; Hirschfield *et al.*, 2010).

A expressão do ITPR3 é necessária para mediar a secreção de fluido biliar e de bicarbonato (Altamirano *et al.*, 2014). Porém, pouco é conhecido sobre a regulação transcricional dos ITPRs, especialmente quanto as especificidades para cada uma das três isoformas deste receptor (Guerra e Nathanson, 2015). Existem evidências de que nas colangiopatias o fator de transcrição Nrf2, considerado um sensor de estresse oxidativo, regule negativamente a expressão do ITPR3 em colangiócitos (Weerachayaphorn *et al.*, 2016). Achados recentes demonstrados por Franca e colaboradores, (2019), descrevem que o fator de transcrição Nrf2, seja responsável pela diminuição da expressão do ITPR3 em colangiócitos em alguns tipos de colangiopatias, sugerindo que múltiplas vias de sinalização distintas podem convergir para a diminuição da expressão do ITPR3 em colangiócitos.

Vias mediadas por NF- κ B demonstrou efeito inibitório indireto na atividade do promotor do ITPR3, diminuindo sua expressão em colangiócitos. Além disso, componente de uma classe de pequenas moléculas de RNA não codificantes denominadas micro ácido ribonucleico (microRNA), constituído por pequenas sequências complementares de aproximadamente 21 a 25 nucleotídeos de um ou mais mRNAs, regulam a expressão gênica induzindo degradação ou supressão da tradução de mRNA, onde também ocorre a regulação específica de microRNA-506 na expressão do ITPR3 em colangiócitos. Sugerindo que cada um dos componentes já descritos como reguladores da inibição da expressão de ITPR3 em diferentes tipos de colangiopatias – Nrf2, NF- κ B e miR-506 – podem ser relevantes na patogênese de formas específicas de doenças que comprometem os colangiócitos (Franca *et al.*, 2019; Jing *et al.*, 2018; Krawczyk *et al.*, 2017; Guerra e Nathanson, 2015).

Além disso, inúmeras evidências têm associado variações genéticas à DHA (Avila *et al.*, 2019). A expressão do Nrf2 pode ser afetada por polimorfismos identificados na

região promotora do gene *NFE2L2*, que codifica o fator de transcrição Nrf2. Os SNPs rs35652124 (-214 A/G), rs4893819 (-1275 G/A) e rs6721961 (-178 A/G) figuram entre alguns dos mais encontrados na população mundial e podem alterar a atividade de transcrição do Nrf2, diminuindo a transcrição do gene *NFE2L2* e conseqüentemente alterando a expressão de quem depende do Nrf2, demonstrando um significado funcional que afeta a expressão e as funções basais do Nrf2 (M-AL-Azhary *et al.*, 2016).

A inibição da expressão do ITPR3 pelo Nrf2, parece ser uma característica comum em algumas colangiopatias e pode ajudar a explicar a base molecular da lesão ductular e sugerir novos alvos moleculares de valor clínico no tratamento de pacientes comprometidos (Weerachayaphorn *et al.*, 2016; Minagawa *et al.*, 2007).

4. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Determinar as evidências na frequência da expressão do ITPR3 em colangiócitos, nas biópsias hepáticas de pacientes com diagnóstico de cirrose causada pela doença hepática alcoólica.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar o nível da expressão do ITPR3 em colangiócitos, assim como sua localização, em biópsias hepáticas de pacientes com cirrose causada pela DHA.

Identificar o fator de transcrição gênico responsável pela regulação negativa da expressão do ITPR3 em colangiócitos, nas biópsias hepáticas de pacientes com cirrose causada pela DHA.

Identificar a frequência alélica e genotípicas nos SNPs rs35652124 (-214 A/G), rs4893819 (-1275 G/A) e rs6721961 (-178 A/G), da região promotora do gene *NFE2L2*, responsável por codificar o fator de transcrição Nfr2, nas biópsias hepáticas dos pacientes com cirrose causada pela DHA e grupos controle.

Comparar as frequências alélicas e genotípicas dos SNPs na região promotora do gene *NFE2L2*, entre os pacientes com cirrose causada pela DHA e grupos controle.

Associar as frequências alélicas e genotípicas dos SNPs do fator de transcrição Nfr2 e comparar os níveis de expressão aos dados clínicos entre os pacientes com cirrose causada pela DHA e grupos controle.

5. METODOLOGIA

5.1 CASUÍSTICA

5.1.1 Desenho do estudo

O referido estudo realizou uma análise do tipo transversal analítica, qualitativa e quantitativa, em 49 amostras de biópsias hepáticas arquivadas no Departamento de Anatomia Patológica e Medicina Forense do Hospital Universitário da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, coletadas entre o período de 1998 a 2015, provenientes de pacientes de ambos os sexos e de faixa etária variadas, com diagnóstico de cirrose causada pela DHA há pelo menos cinco anos. Em comparação, foram selecionadas 18 amostras de biópsias hepáticas de casos envolvendo pacientes diagnosticados com infecção pelo vírus da hepatite C (HCV), e 21 biópsias hepáticas de doadores de transplante de fígado.

Para análises complementares, foi realizado procedimento de intervenção através da indução alcoólica em modelos experimentais de camundongos *C57BL/6* – linhagem isogênica – sendo 21 camundongos tratados com solução contendo EtOH (5%) e 21 não tratados com EtOH 5% (grupo controle), utilizados como modelos analíticos complementares para achados bioquímicos, imunohistoquímicos (IHC) e histopatológicos, na associação com a DHA e evidências na avaliação da regulação molecular na expressão de ITPR3 durante a ingestão alcoólica, determinando se e como a expressão destes fatores podem ser alterados pelo álcool na evolução da DHA em modelos experimentais em comparação aos resultados obtidos nas biópsias humanas.

O referido estudo foi submetido aos comitês de ética em pesquisa responsáveis por avaliar os procedimentos experimentais envolvendo seres humanos e o uso de animais para fins científicos e aprovados conforme os pareceres anexos (CAAE 67814117.6.0000.5149; N.2.093.116 e CEUA, protocolo 280/2018).

5.1.2 Caracterização das amostras

As amostras utilizadas neste estudo consistiam de 49 biópsias hepáticas humanas provenientes do arquivo do Departamento de Anatomia Patológica e Medicina Forense – UFMG, coletadas no período de 1998 a 2015 e mantidas sob a responsabilidade de um

especialista em hepatologia. Todas as amostras são de pacientes diagnosticados com DHA na fase cirrótica (cirrose hepática), entre as quais, 14 estavam com cirrose hepática em atividade discreta, 5 com cirrose hepática em atividade moderada, 1 com cirrose e esteatose hepática e 1 com cirrose e fibrose hepática moderada, o restante sem atividade diagnosticada. Todos acompanhados por hepatologista do Hospital Universitário da Faculdade de Medicina – UFMG.

De acordo com resultados apresentados por Shibao e colaboradores, (2003), demonstrando que, apesar da presença de inflamação portal, pacientes infectados pelo HCV não apresentam diminuição nos níveis de expressão do ITPR3 em canais biliares, foram selecionadas 18 biópsias hepáticas de pacientes dignostiados com HCV, para garantir que a expressão deste canal está reduzida/abolida em ductos biliares nas biópsias hepáticas dos pacientes com DHA, sendo esta uma condição causada através da exposição etílica, em comparação ao grupo HCV positivo.

Por fim, selecionamos 21 amostras de doadores para transplante de fígado, realizadas entre os anos de 2012 a 2017, para integrar o nosso grupo controle.

Além das análises realizadas em amostras biológicas provenientes das biópsias hepáticas humanas, também foram utilizados modelos animais experimentais de camundongos machos *C57BL/6*, de 12 semanas de idade, compondo o grupo tratado (N 21), os quais foram induzidos com ingestão alcoólica 5% durante 10 dias de tratamento, e o controle não-tratados (N 21), para análises comparativas e complementares dos resultados obtidos em humanos, referindo o espectro da DHA.

5.1.3 Critérios de inclusão e exclusão

Foram incluídas no estudo amostras de biópsia hepática de pacientes de ambos os sexos, sem restrição de idade, com histórico de diagnóstico para cirrose causada pela DHA há pelo menos cinco anos, realizado por médico hepatologista da Faculdade de Medicina – UFMG.

As biópsias hepáticas humanas arquivadas datavam entre o período de 1998 a 2015, incluídas em blocos de parafina, provenientes de pacientes com DHA isolada, isto é, sem quaisquer tipos de doenças hepáticas simultâneas, incluindo as hepatites virais B e C, CHC, cirrose biliar primária, colangite esclerosante, atresia biliar e obstrução biliar maligna ou benigna.

Para análises comparativas, foram utilizados dois grupos de biópsia hepática parafinizado, um proveniente de pacientes infectados pelo HCV e outro de doadores para o transplante de fígado, denominados como grupos controle (não-alcoólico).

Além do tecido hepático humano, também foram incluídas no estudo amostras de 42 camundongos machos (*C57BL/6*), de 12 semanas de idade – linhagem isogênica – para análises complementares comparativas aos achados humanos.

5.1.4 Local do estudo

O presente estudo está vinculado ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Biofísica/ICB-UFMG, realizado em coparticipação com o Departamento de Anatomia Patológica e Medicina Forense – UFMG e com o Laboratório de Vírus *Epstein-Barr*, da Seção Científica de Virologia do Instituto Evandro Chagas/IEC-PA, conforme descrição abaixo:

- Laboratório de Sinalização de Cálcio do Departamento de Fisiologia e Biofísica/ICB-UFMG: no Laboratório de Sinalização de Cálcio, sob supervisão e orientação da professora Dra Maria de Fátima Leite, foram realizados procedimentos experimentais de indução alcoólica em modelos animais, utilizando 42 camundongos *C57BL/6*, dos quais 21 receberam ingestão com solução hidroalcoólica (5%), durante 10 dias, e 21 não-tratados com indução alcoólica. Esta etapa do estudo teve como objetivo cooperar com os achados investigados em amostras biológicas de biópsias humanas, para melhor entender sobre o espectro fisiopatológico e clínico-laboratorial da DHA, sendo realizado posterior análises bioquímicas de determinação dos níveis sanguíneos de bilirrubina (total e frações), fosfatase alcalina, alamina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST). Os animais foram pesados diariamente e amostras de tecido hepático foram utilizadas para a correlação entre o peso corporal e o tamanho do fígado destes animais, caracterização de lipídeos totais, e para a identificação dos marcadores SOD, GPx e catalase, presentes durante o estresse oxidativo induzido pelo álcool, realizada por técnica de *Western Blot (WB)* e comparado entre os grupos (etanólico e não-etanólico).
- Departamento de Anatomia Patológica e Medicina Forense – UFMG: as amostras biológicas de tecido humano arquivadas em biópsias hepáticas utilizadas neste estudo, foram gentilmente cedidas pela coorientadora do projeto, professora Dra Paula Vieira

Teixeira Vidigal, do Departamento de Anatomia Patológica e Medicina Forense, do Hospital da Faculdade de Medicina – ICB/UFMG, onde foram realizadas as análises dos prontuários médicos dos pacientes correspondentes às amostras biológicas cedidas ao estudo, assim como, a investigação dos dados contendo histórico clínico e laboratorial destes pacientes. Através dos tecidos hepáticos incluídos nas biópsias humanas, foram realizadas análises de IHC para a identificação da expressão molecular do ITPR3 e dos fatores de transcrição, entre os quais, Nrf2, fator nuclear kappa beta (NF-kb)/RelA (p65) e NF-kb1 (p50), e por hibritização *in situ* para miRNA-506, nas amostras de biópsia hepática humana e dos camundongos.

- Instituto Evandro Chagas/IEC-PA: no Laboratório de Vírus *Epstein-Barr* da Seção Científica de Virologia do Instituto Evandro Chagas/IEC-PA, sob a supervisão e co-orientação do Dr. Igor Brasil Costa, foram realizados os procedimentos de biologia molecular para as análises de genotipagem das amostras de tecido hepático provenientes das biópsias humanas dos grupos DHA, HCV e doadores de transplante hepático. As análises foram realizadas por técnica de discriminação alélica baseada em Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa (qPCR), para a identificação e comparação polimórfica dos SNPs rs35652124 (-214 A/G), rs4893819 (-1275 G/A) e rs6721961 (-178 A/G), na região promotora do gene *NFE2L2*, para avaliação do perfil de suscetibilidade genética aos efeitos do álcool, e comparado entre os grupos de estudo.

5.2 ABORDAGEM METODOLÓGICA

O referido estudo propôs avaliar os níveis de expressão do ITPR3 em colangiócitos durante a DHA, e correlacionar os achados quanto aos fatores de transcrição possivelmente envolvidos na regulação da expressão do ITPR3 durante a doença, além de investigar quanto a ideia inovadora de que fatores genéticos de polimorfismo na região promotora do gene *NFE2L2* podem estar associados à suscetibilidade na DHA.

Foram analisadas 49 biópsias hepáticas humanas e 42 amostras biológicas de modelos experimentais de camundongos *C57BL/6*, induzidos com solução hidroalcoólica 5%, para achados complementares na investigação da regulação molecular da expressão do ITPR3 em colangiócitos e determinar se, como e quais fatores estariam envolvidos na inibição da sua expressão pelo álcool.

5.2.1 Determinação da frequência com a qual a DHA exibe evidências na associação com a expressão diminuída do ITPR3 em colangiócitos

Para avaliar se a DHA altera os níveis de expressão do ITPR3 em colangiócitos, foram realizadas análises de IHC envolvendo as 49 amostras de tecido hepático em biópsias humanas e comparadas entre os grupos. Como modelo experimental complementar, amostras de tecido hepático extraídas dos animais induzidos com solução hidroalcoólica 5%, também foram analisadas e comparadas entre os grupos tratado e não-tratado, também denominados de etanólico e controle, respectivamente.

Para a realização dos procedimentos técnico-analítico de IHC, foram utilizadas as amostras de tecido hepático incluídas em parafina e montadas em lâminas para a desparafinização e reidratação, após acondicionamento durante uma noite (*overnight*) em estufa a 65°C. O protocolo utilizado para esta etapa do estudo (Quadro 1) determina a lavagem em xilol (30 vezes), seguida da lavagem em álcool etílico 100% e 80% (4 vezes), e por fim em água corrente (1 vez) por cerca de 3 minutos, com leve agitação. Para a recuperação antigênica, as lâminas foram aquecidas em solução de citrato de sódio 0.01M (pH 6,0) a 90°C, por 20 minutos, sendo resfriadas e em seguida lavadas em solução Tris por 5 minutos (3 vezes). Após, foram adicionados 400µL de solução de bloqueio da peroxidase por 20 minutos e em seguida lavadas no Tris por 5 minutos (3 vezes). Em seguida, foi adicionado 400µL da solução de bloqueio de proteínas (20 minutos) e lavadas no Tris por 5 minutos (3 vezes). Foi adicionado em cada um dos cortes 100µl da solução diluída (1:100) do anticorpo primário e incubadas durante a noite (*overnight*) em câmara úmida a temperatura ambiente. No dia seguinte, as lâminas foram lavadas no Tris por 5 minutos (3 vezes) e adicionado 400µL da solução de bloqueio pós-primário durante 30 minutos, sendo em seguida lavadas no Tris por 5 minutos (3 vezes). Foi adicionado 400µL da solução do polímero e incubadas em câmara úmida por 30 minutos em temperatura ambiente, em seguida lavadas no Tris por 5 minutos (3 vezes) para aplicação de 100µL da solução contendo cromógeno/substrato (25µL do cromógeno em 500mL de substrato), por aproximadamente 1 minuto para coloração, e lavadas no Tris por 5 minutos (3 vezes). Ao fim, cada uma das lâminas receberam 2 gotas de hematoxilina por 2 minutos, sendo e em seguida lavadas no Tris, no álcool etílico e no xilol, por 1 minuto cada.

Após conclusão as lâminas foram analisadas em microscópio de captura de imagens: marca Zeiss (*software*®).

Quadro 1: Protocolo para realização da técnica de Imunohistoquímica - IHC

ETAPA 1	ETAPA 2	ETAPA 3
Desparafinização e Reidratação	Recuperação Antigênica	Bloqueio da Peroxidase e Proteína
<ul style="list-style-type: none"> • <i>Overnight</i> a 65°C • Lavar no xilol 1 (3x) • Lavar no xilol 2 (3x) • Lavar no xilol 3 (3x) • Lavar EtOH - 100% (4x) • Lavar EtOH - 80% (4x) • Lavar na água (1x, 3') 	<ul style="list-style-type: none"> • 90°C (20') citrato de sódio (0.01M, pH 6,0) • Resfriar (20') • Lavar no Tris (3x) 	<ul style="list-style-type: none"> • Adicionar 400µL de solução de bloqueio da peroxidase • Aguardar 20' e lavar no Tris (3x) • Adicionar 400µL de solução de bloqueio de proteínas • Aguardar 20' e lavar no Tris (3x)
ETAPA 4	ETAPA 5	ETAPA 6
AC Primário: Reação e Bloqueio	Reação do AC Secundário	Sistema de Detecção
<ul style="list-style-type: none"> • Diluir o AC (1:100) • Adicionar 100µl da solução sobre o corte • Incubar em câmara úmida (<i>overnight</i>) • Lavar no Tris (3x) • Adicionar 400µL de solução de bloqueio pós-primário • Aguardar 30 minutos • Lavar no Tris (3x) 	<ul style="list-style-type: none"> • Adicionar 400µL da solução do polímero • Incubar (40') em câmara úmida • Lavar no Tris (3x) 	<ul style="list-style-type: none"> • Diluir o cromógeno/substrato (25µL/500mL) • Aplicar 100µL da solução no corte em lâmina • Incubar 1 minuto • Lavar no Tris (3x) • Hematoxilina (2') • Lavar no Tris (1') • Lavar EtOH (1') • Lavar no xilol (1') • Montar as lâminas

Legenda: x = vezes, ' = minutos, AC = anticorpo, 1:100 = diluição um para cem

5.2.2 Indução alcoólica em camundongos *C57BL/6* para análises comparativas dos parâmetros bioquímicas e histopatológicas durante o espectro da DHA

Como estratégia complementar, foram utilizados 42 animais experimentais de camundongos machos isogênicos *C57BL/6*, com 12 semanas de vida, os quais foram divididos em dois grupos: (1) o grupo etanólico, tratado com solução hidroalcoólica a 5% durante 10 dias, (2) e o grupo controle, não-tratado com dieta etanólica, conforme ilustrado na Figura 4. O protocolo de indução alcoólica utilizado no estudo foi adaptado de um compilado de revisão da literatura intitulado *Alcoholic liver disease: Utility of animal models* (Lamaz-Paz *et al.*, 2018), que aborda estudos sobre a investigação dos efeitos etanólicos através da utilização de modelos animais, e dos modelos experimentais descritos por Sueblinvong e colaboradores (2014; 2016).

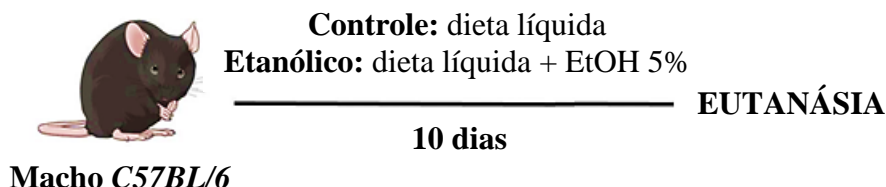


Figura 4: Protocolo de indução alcoólica 5% em camundongos machos C57BL/6. 21 (de 42) animais de 12 semanas de vida foram submetidos a dieta contendo solução hidroalcoólica 5% durante 10 dias, e eutanasiados após este período para extração de material biológico sanguíneo e do tecido hepático para análises laboratoriais.

Fonte: Santos *et al.*, 2020.

Foram realizados testes bioquímicos no soro coletado dos camundongos tratados (etanólico) e não-tratados (controle), para análises comparativas entre os achados em humanos. Foram realizados testes de ALT, AST, bilirrubina total e frações, conforme especificações do fabricante (Bioclon Lab®), e avaliações diárias para determinação das variações do peso corporal dos animais. O peso do fígado foi determinado e comparado ao peso corporal e a determinação dos lipídeos totais, em cada um dos animais.

Para determinar o estresse oxidativo induzido durante a ingestão alcoólica nos modelos animais, foi realizada técnica de *WB* para identificação dos principais marcadores de estresse oxidativo (GPx, SOD e catalase) descritos na literatura e relacionados à expressão do fator de transcrição Nrf2 durante o estresse oxidativo alcoólico, conforme descrição abaixo:

- Extração da proteína: em *ependorff* com aproximadamente 25mg do tecido hepático macerado, foram adicionados 100µL de tampão de lise e 20µL de inibidor da protease, e centrifugados a 13.000 rotações por minuto (rpm) por 10 minutos a 4°C. Foi transferido 1µL do sobrenadante da amostra centrifugada para uma placa de leitura de 96 poços cada, contendo uma solução de BSA (*bovine serum albumin*) em água miliQ (1:1000) e 180µL de reagente de *Breadford*. A leitura foi realizada em 595nm.
- *Western Blot*: 15µL de um mix de amostra, solução tampão e água, previamente aquecidas a 95°C por 5 minutos, foram adicionadas em canaletas independentes de um gel de poliacrinamida 10% para corrida em 80 e 100 volts durante 1,5 horas. Em seguida o gel foi submetido a etapa de transferência em sistema fechado durante 45 minutos em 20 volts. Após transferência foi adicionado 25mL de solução de bloqueio e homogeneizado, permanecendo acondicionado durante a noite (*overnight*). Ao fim,

a solução de bloqueio foi desprezada e o material lavado 3 vezes com solução *tris-buffered saline* (TBS) 1x, por 5 minutos em agitador automático, em seguida foi incluído uma solução diluída do anticorpo primário (1:1000) permanecendo *overnight*. O material foi submetido a nova lavagem (3 vezes) com TBS 1x por 5 minutos e adicionamos o anticorpo secundário específico para cada marcador investigado; SOD-1 (Santa Cruz - C-17, SC8637; *Goat*), GPX $\frac{1}{2}$ (Santa Cruz - H-151, SC30157; *rabbit*), Catalase (Santa Cruz - F-17, SC34285; *Goat*), e dos comparadores Histona (*rabbit*) e β -actina (*mouse*). Homogeneizados e acondicionados em câmara fria (2°C a 8°C) por 1:30 horas. Ao fim, o material foi lavado durante 30 minutos em TBS 1x sob leve agitação e submetido à revelação com preparação de solução de revelação (1:1). O protocolo descrito está disponível no Quadro 2.

Quadro 2: Protocolo para realização da técnica de *Western Blot* - WB

ETAPA 1 - Extração da Proteína	ETAPA 2 - Sistema de Corrida
<ul style="list-style-type: none"> • Mix 100μL/20μL de tampão de lise + inibidor da protease, macerar 25mg de tecido em Mix • Transferir em 100μL de Mix • Centrifugar a 13000 RPM por 10' a 4°C • Retirar sobrenadante • Transferir para BSA + água miliQ em placa • Adicionar reagente de <i>Breadford</i>; 180μL • Realizar a leitura em 595nm 	<ul style="list-style-type: none"> • Preparar o Gel de poliacrilamida 10% • Ferver as amostras a 95°C por 5 minutos • Adicionar solução de corrida • Adicionar 15μL do peso molecular • Adicionar 15μL da amostra • Correr em 80-100 volts (1,5h)
ETAPA 3 - Sistema de Transferência	ETAPA 4 - Reação de Bloqueio
<ul style="list-style-type: none"> • Transferir o gel à membrana • Adicionar a solução de transferência • Fechar o sistema • Iniciar transferência (20 volts, por 1h) 	<ul style="list-style-type: none"> • Solução de bloqueio (50mL de TBS 1x) • Adicionar 25mL da solução de bloqueio • Homogeneizar à membrana (30') • Incubar entre 2 a 8°C <i>overnight</i>
ETAPA 5 - Reação do AC Primário	ETAPA 6 - Reação do AC Secundário
<ul style="list-style-type: none"> • Desprezar solução de bloqueio • Lavar no TBS (5') • Desprezar TBS • Inserir anticorpo primário (1:1000) • Homogeneizar por 1h • Incubar <i>overnight</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • Retirar AC primário • Lavar no TBS (5') • Inserir o anticorpo secundário (1:1000) • Homogeneizar por 5 minutos • Incubar entre 2 a 8°C (1:30h) • Retirar o AC e lavar no TBS (30') • Preparar a solução de revelação (1:1). Revelar em 1mL de solução

5.2.3 Investigação dos possíveis fatores associados à regulação da expressão do ITPR3 em colangiócitos e determinação se e como a exposição ao álcool modula tais fatores em diminuir a expressão do ITPR3 durante a DHA

Concentrado na região apical o ITPR3 é o canal predominante da liberação de Ca^{2+} intracelular em colangiócitos. Acredita-se que a localização subcelular do ITPR3 seja importante para permitir a ocorrência de secreção mediada por Ca^{2+} (Weerachayaphorn *et al.*, 2016; Hirata *et al.*, 2002). A expressão deste canal é reduzida/abolida em ductos biliares de pacientes com diferentes distúrbios em colangiócitos, incluindo as colangiopatias: cirrose biliar primária, colangite esclerosante, atresia biliar e obstrução biliar maligna ou benigna. Em controvérsia, em pacientes infectados pelo vírus da hepatite C, a perda da expressão do ITPR3 não é vista em canais biliares destes pacientes, apesar da presença de inflamação portal (Shibao *et al.*, 2003). Este achado reforça a ideia de que a perda do ITPR3 é mais especificamente relacionada com efeitos moduladores em colangiócitos.

Para entender se e como a expressão do ITPR3 em colangiócitos pode ser alterada durante a DHA, foi investigada a regulação da transcrição do ITPR3 pelos fatores de transcrição mais relacionados à este receptor (Figura 5).

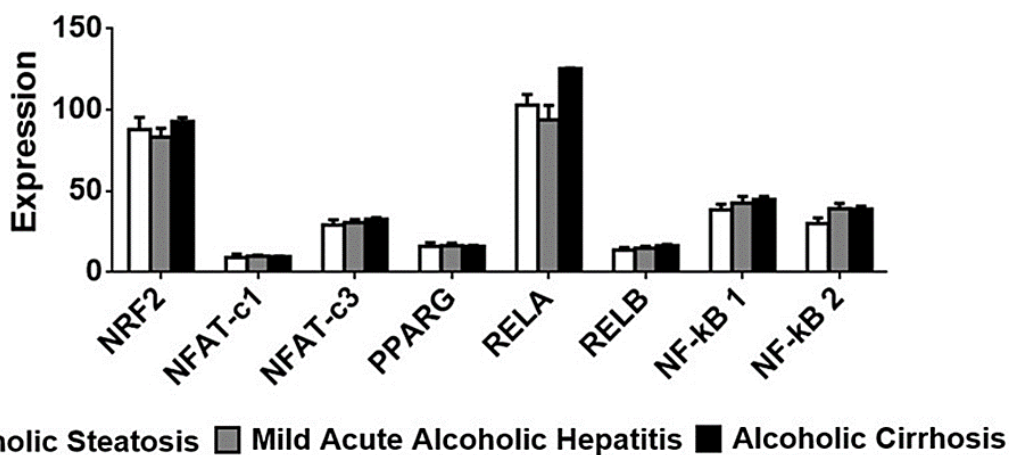


Figura 5: Fatores de transcrição reguladores da expressão do ITPR3. Demonstração comparativa entre os principais fatores de transcrição que regulam a expressão de ITPR3 e sua atividade. Tendo em destaques os fatores RelA, Nrf2 e NF- κ B1.

Fonte: Santos *et al.*, 2020. Adquirido através dos dados fornecidos no *National Center for Biotechnology Information (NCBI) – All databases*: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>> Acessado no período de janeiro de 2019 a maio de 2020.

Entre os fatores de transcrição selecionados nesta etapa do estudo, foi escolhido o Nrf2, já que este atua como fator de transcrição ativado durante o estresse oxidativo, que regula negativamente a expressão do ITPR3 de forma concentração-dependente em colangiócitos, como demonstrado em estudos preliminares, onde a expressão do Nrf2 está aumentada em canais biliares das amostras hepáticas de pacientes com vários distúrbios colangiopáticos, resultando na expressão reduzida do ITPR3. O NF- κ B \rightarrow p65 (RelA), o NF- κ B1 \rightarrow p50 (Franca *et al.*, 2019) e o miR-506, demonstrados em alguns estudos como fatores reguladores da expressão diminuída do ITPR3 em colangiócitos (Ananthanarayanan *et al.*, 2015; Marin; Bujanda e Banales 2014; Szabo e Bala, 2013).

Como estratégia experimental, foi realizada análise IHC (conforme protocolo descrito no item 5.2.1) para a identificação dos possíveis fatores de transcrição (Nrf2, NF- κ B e miR-506) que poderiam estar relacionados à regulação negativa da expressão do ITPR3 em colangiócitos, durante a modulação induzida pelo álcool no espectro da DHA.

5.2.4 Avaliação das frequências alélicas e genotípicas dos SNPs da região promotora do gene *NFE2L2* – rs35652124 (-214 A/G), rs4893819 (-1275 G/A) e rs6721961 (-178 A/G) – e sua relação na atividade de transcrição do Nrf2 durante a DHA

Estudos genéticos têm contribuído para a compreensão quanto aos fatores de variação individual na progressão e resultados das doenças hepáticas, incluindo a DHA. Entretanto, os motivos exatos ainda são pouco elucidados. O risco de desenvolvimento e da progressão na DHA são determinados por questões multifatoriais, tais como, dieta, nível de consumo de álcool, microbiota intestinal e múltiplos fatores genéticos. Segundo Anstee e colaboradores (2016), achados indicam que variantes genéticas podem contribuir à susceptibilidade para o alcoolismo, fornecendo evidências de uma predisposição genética para complicações específicas no alcoolismo.

Os SNPs rs35652124 (-214 A/G), rs4893819 (-1275 G/A) e rs6721961 (-178 A/G), parecem interferir na atividade de transcrição de Nrf-2, diminuindo a transcrição do gene *NFE2L2* e consequentemente alterando a expressão dos genes onde o fator de transcrição Nrf2 age. Polimorfismo no promotor rs6721961 (-178 A/G) demonstrou um significado funcional que afeta a expressão e as funções basais do Nrf2. A atividade de transcrição do gene *NFE2L2* foi significativamente elevada em -178G em comparação à variante -178A (M-Al-Azhary *et al.*, 2016).

Fomentado por inúmeras evidências do tipo, foi realizada uma análise molecular das variantes alélicas dos SNPs *NFE2L2*, para relacionar à expressão do NFR2 na DHA.

Os procedimentos nessa etapa foram realizados utilizando técnica de biologia molecular, por análise de discriminação alélica em qPCR, conforme descrição a seguir:

- Purificação e extração de DNA: biópsias humanas incluídas em parafina foram purificadas de acordo com protocolo descrito no kit *DNeasy Blood & Tissue* (Qiagen®). Foi adicionada uma pequena secção de aproximadamente 25mg de tecido parafinado em microtubo de 2mL contendo 1200µl de xilol, agitado em vortex vigorosamente, centrifugado em microcentrifuga na velocidade máxima (14.000 rpm) por 5 minutos a temperatura de 15–25°C e o sobrenadante desprezado. Foi adicionado 1200µl de etanol (100%), homogeneizado em vortex e centrifugado em velocidade máxima por 5 minutos. O sobrenadante contendo etanol foi desprezado e o resíduo incubado a 37°C por 15 minutos. Foi adicionado 180µl de tampão ATL (*Buffer ATL*) e 20µL de Proteinase K nos tubos, homogeneizados em vortex e incubados a 56°C *overnight* (lise do tecido). Na etapa seguinte o mix foi homogeneizado em vortex durante 15 segundos e adicionado 200µL de tampão AL (*Buffer AL + etanol*), homogeneizado e adicionado 200µL de etanol (100%) e misturado em vortex novamente. O material foi transferido ao *collection tube* de 2mL (*DNeasy Mini Spin Column; Qiagen®*), centrifugado a 8.000 rpm por um minuto. O tubo foi descartado e na coluna adicionado 500µL de tampão de lavagem (*Wash Buffer AW1*) e centrifugado a 8.000 rpm por um minuto novamente. O tudo foi descartado e adicionado 500µL de tampão de lavagem AW2 (*Wash Buffer AW2*) no purificado, centrifugado por 3 minutos a 14.000 rpm. Foi adicionado 100µL de tampão AE (*Buffer AE*) e incubado durante 5 minutos em temperatura ambiente (25°C), centrifugado por 1 minuto a 8.000 rpm para eluição e armazenada a -20°C para uso a longo prazo.
- Genotipagem: as etapas envolvendo a genotipagem do material genético foram realizadas seguindo as orientações do fabricante (Integrated DNA Technologies – IDT®), conforme especificações do protocolo de procedimentos. O modelo de ensaio utilizado foi o *rhAmp™ SNP Genotyping System*, para qPCR-SNP (IDT®). Conforme protocolo, foi preparado um mix contendo 500µL de *rhAmp™ Genotyping Master Mix* e 25µL de *rhAmp™ Reporter Mix*, para uma solução final de 525µL. Em seguida foi adicionado 2,65µL desta solução mix, 0,25µL dos *primers* (*rhAmp™ SNP Assay*) para cada SNP (rs35652124, rs4893819 e rs6721961), 1,0µL da amostra de DNA com

concentração de 5ng/ul, 1,1µL de *Nuclease-Free Water*, obtendo um volume final de 5ul. A placa contendo as amostras foram submetidos ao termo-ciclador através do Sistema 7500 *real-time PCR system (Thermo Fisher Scientific)* por 95°C durante 10 minutos (1 ciclo), para ativação, 40 ciclos a 95°C por 10 segundos, para desnaturação, 40 ciclos a 60°C durante 30 segundos, para anelamento, e 40 ciclos a 68°C durante 20 segundos, para amplificação. Os procedimentos descritos utilizados como protocolos de extração e genotipagem, estão disponíveis no Quadro 3, demonstrado a seguir:

Quadro 3: Protocolo para realização da técnica de genotipagem em qPCR

ETAPA 1 - Extração de DNA (Fase 1)	ETAPA 2 - Extração de DNA (Fase 2)
<ul style="list-style-type: none"> • 25mg de tecido parafinado • Adicionar 1200µl de xilol • Agitar em vortex • Centrifugar (5') em 14000 RPM (25°C) • Retirar o sobrenadante • Adicionar 1200µl de etanol (100%) • Agitar em vortex • Centrifugar (5') em 14000 RPM (25°C) • Retirar o sobrenadante • Repetir as etapas duas vezes • Incubar a 37°C (15') o tubo aberto • Adicionar tampão ATL (<i>Buffer ATL</i>) • Adicionar 20µL de Proteinase K • Agitar em vortex e incubar <i>overnight</i> a 56°C 	<ul style="list-style-type: none"> • Agitar em vortex e adicionar tampão AL; 200µL • Agitar em vortex • Adicionar 200µl de etanol 100% • Agitar em vortex • Centrifugar (1') em 8000 RPM (25°C) • Retirar o sobrenadante e manter o purificado • Adicionar 500µL de tampão de lavagem 1 (<i>Wash Buffer AW1</i>) • Centrifugar (1') em 8000 RPM (25°C) • Retirar o sobrenadante e manter o purificado • Adicionar 500µL de tampão de lavagem 2 (<i>Wash Buffer AW2</i>) • Centrifugar (3') em 14000 RPM (25°C) • Retirar o sobrenadante e manter o purificado
ETAPA 3 - Extração de DNA II (Fase 3)	ETAPA 4 - Preparo do Mix
<ul style="list-style-type: none"> • Adicionar 100µL de tampão AE (eluição) • Incubar a 25°C (5') • Centrifugar (1') em 8000 RPM (25°C) • Adicionar 100µL de tampão AE (eluição) • Incubar a 25°C (5') • Centrifugar (1') em 8000 RPM (25°C) • Preparar alíquotas e armazenar a -20°C 	<ul style="list-style-type: none"> • Adicionar 0,5mL de rhAmp™ <i>Genotyping Master Mix</i> em 25µL de rhAmp™ <i>Reporter Mix</i> • Obter o Mix final de 525µL
ETAPA 5 - Mix da Reação	ETAPA 6 - Thermo-Cycling
<ul style="list-style-type: none"> • Preparar a placa e adicionar 2,65µL do Mix • Adicionar 0,25µL do primer (<i>SNP Assay</i>) • Adicionar 1,0µL do DNA • Adicionar 1,1µL de <i>Nuclease-Free Water</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • Ativação enzimática: 95°C, 10', 1 ciclo • Desnaturação: 95°C, 00:10', 40 ciclos • Anelamento: 60°C, 00:30', 40 ciclos • Amplificação: 68°C, 00:20', 40 ciclos

5.3 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA

Este estudo apresenta como finalidade desvendar os mecanismos moleculares envolvidos com os aspectos fisiopatológicos da DHA e avaliar os fatores genéticos associados à esta doença, proporcionando uma inovação científica quanto ao entendimento destes fatores na história natural da doença, já que até o momento, poucos relatos têm demonstrado tais espectros da DHA. Para alcançar este propósito, foram utilizadas amostras biológicas de tecido hepático humano constituídas de biópsias hepáticas arquivadas no Departamento de Anatomia Patológica e Medicina Forense do Hospital Universitário da Faculdade de Medicina - ICB/UFMG, seguindo todas as exigências da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), envolvendo pesquisa com seres humanos, descritos na Resolução 466/12, do Conselho Nacional de Saúde (CNS). O estudo foi submetido para análise ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UFMG no dia 02/05/2017, às 16:14 horas, número 042650/2017, juntamente com anexo de todos os documentos exigidos para a pesquisa, e aprovado no dia 31/05/2017 – CAAE 67814117.6.0000.5149; Parecer N 2.093.116. E na Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), protocolo 280/2018.

5.1 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Todos os dados obtidos durante o desenvolvimento da pesquisa foram compilados em planilhas utilizando o *software* Excel (*Microsoft Office*, 2010), para armazenamento e organização dos resultados encontrados. Análises estatísticas foram relevantes para determinar a correlação de significância entre as variáveis estudadas, utilizando-se programas estatísticos, tais quais, os *softwares* Biostat versão 5.0 (Ayres, 2005) e *Graphpad Prism* (versão 7; Software GraphPad, La Jolla, CA), considerando um $p \leq 0,05$ para todos os testes realizados – Teste G, Teste T, Qui-quadrado e Teste Exato de Fisher ou análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida do teste de Bonferroni.

Todos os resultados obtidos após análises estatísticas foram representados às variáveis de correlação do estudo e expressos nas tabelas e gráficos elaboradas durante a obtenção dos resultados do estudo.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE EXPRESSÃO DO ITPR3 EM COLANGIÓCITOS NA DHA

Notavelmente, ao longo dos últimos 35 anos, não se tem visto estudos definitivos na investigação da incidência entre a DHA e seus efeitos em colangiócitos. Na maioria, os trabalhos publicados na área tem apenas tentado correlacionar a DHA à efeitos colestáticos.

Apesar da ausência de dados científicos definitivos que revelem claramente os efeitos do uso prolongado do álcool em colangiócitos, nos últimos anos, tem se observado cada vez mais estudos que demonstram associação entre a colangiopatia como consequência também da DHA, como por exemplo, estudo realizado por Matos e colaboradores, em 2013, citando as colangiopatias como sugestivas à etiologia da DHA na esteato-hepatite, mas não à influência que a ingestão alcoólica crônica pode induzir na modulação da sinalização de canais de Ca^{2+} em colangiócitos e quais mecanismos moleculares estariam envolvidos neste evento. Collares e seus colaboradores, em 2014, relataram que em casos de HA foi observado colangiopatia discreta ou leve. Mais recentemente (2015), Guerra e Nathanson demonstraram evidências histológicas em biópsias de pacientes com DHA durante a HA com efeitos colestáticos e que a HA parece reduzir os níveis do ITPR3 em ductos biliares, assim como, sua localização na maioria dos pacientes investigados.

Motivados por encontrar resultados mais esclarecedores e definitivos sobre a incidência entre a DHA e seus efeitos em colangiócitos, iniciamos por determinar os níveis da expressão do ITPR3 em colangiócitos, realizando análise IHC em amostras de biópsias hepáticas humanas envolvendo casos de pacientes com cirrose causada pela DHA, comparadas entre os grupos controle de doadores de fígado e dos infectados pelo HCV.

Após análise, foi possível observar que houve comprometimento na expressão do ITPR3 em colangiócitos em níveis significativos ($p < 0,05$) nas amostras dos pacientes com DHA em comparação aos grupos de doadores de fígado e dos infectados pelo HCV, que não demonstraram comprometimento nos níveis de expressão do ITPR3 em colangiócitos (Figura 6).

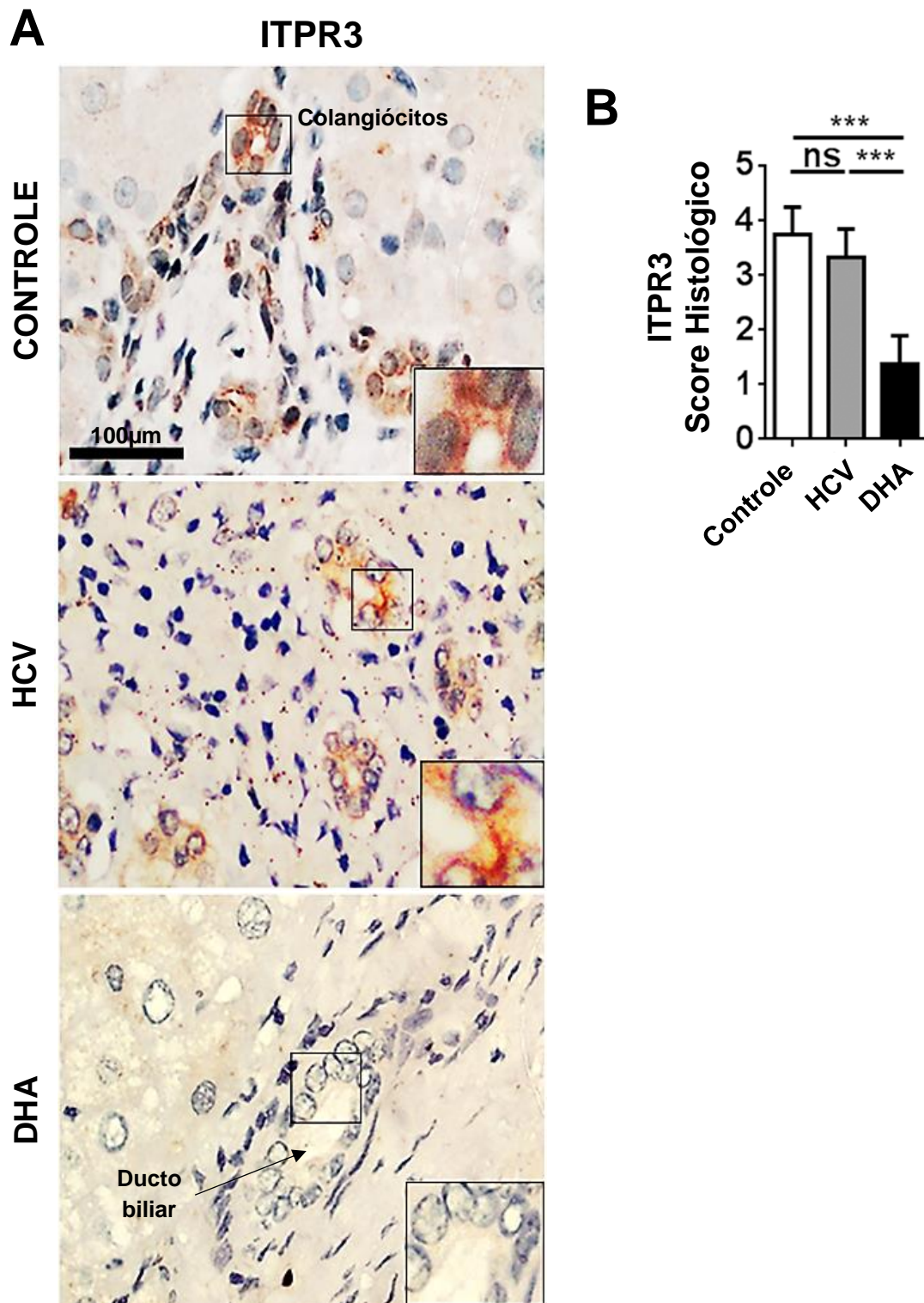


Figura 6: Imunomarcção dos níveis do ITPR3 em colangiócitos entre os grupos de estudo. Análise de IHC revelou diminuição da expressão dos níveis do ITPR3 em colangiócitos de pacientes com cirrose causada pela DHA em comparação ao grupo de pacientes doadores de fígado e dos infectados pelo HCV (A) em níveis significativamente diminuído ($p < 0,05$) na DHA em comparação aos demais grupos (B).

Fonte: Santos *et al.*, 2020.

Os resultados corroboram com estudos preliminares, demonstrando que a indução alcoólica prolongada na DHA compromete diretamente os níveis de expressão do ITPR3 em colangiócitos, sugerindo que esta condição seja seletiva para a DHA, uma vez que durante a infecção pelo HCV – evento inflamatório de agressão hepática – não ocorre comprometimento nos níveis da expressão do ITPR3 em colangiócitos, conforme demonstrou Shibao e colaboradores, (2003), em que pacientes infectados pelo HCV não apresentaram comprometimento nos níveis de expressão do ITPR3 em canais biliares, resultado semelhante aos achados nas amostras histológicas dos doadores, onde também não observamos o comprometimento de expressão dos níveis do ITPR3 em colangiócitos. Isso sugere que a indução alcoólica prolongada pode exercer fundamental papel na regulação dos fatores responsáveis pela expressão do ITPR3 em colangiócitos.

Com base em colaborar com os achados na análise da expressão do ITPR3 em colangiócitos na DHA, foram analisados os parâmetros bioquímicos entre os grupos. Foi identificada relevância estatística significativa ($p < 0,05$) em alguns dos parâmetros laboratoriais investigados, sendo estes: ALT, AST e bilirrubina (total e indireta), mas não para fosfatase alcalina (ALP - *alkaline phosphatase*), Gama Glutamil Transpeptidase (GGT) e bilirrubina direta ($p > 0,05$), conforme demonstra a Figura 7.

Os resultados encontrados então de acordo com estudos que evidenciam alterações bioquímicas como preditores relevantes durante a DHA, os quais a investigação dos níveis das transaminases em pacientes alcoólatras crônicos, pode demonstrar elevação durante a DHA (Matos *et al.*, 2013; Bruha *et al.*, 2012; Bang *et al.*, 1958; Summerskill *et al.*, 1957).

Em 1957, Summerskill e colaboradores já haviam relatado sobre as alterações das transaminases em amostras sorológicas de pacientes alcoólatras semelhante ao que foi relatado por Bang e colaboradores um ano depois (1958). Tais evidências foram consolidadas após avaliação da atividade das transaminases que se mostraram elevadas no soro de pacientes em recuperação que ingeriram grande quantidade de álcool durante as recaídas (Hed, 1959; Neame; Joubert, 1961).

Além da elevação das transaminases durante a ingestão alcoólica, a presença anormal de bilirrubina representa um dos mais perigosos indicadores durante a DHA, podendo refletir tanto o transporte hepatocelular deficiente da bile quanto dificuldade no fluxo biliar hepático, levando ao aumento da concentração sérica em pacientes com DHA grave (Altamiro *et al.*, 2014; Collares *et al.*, 2014). Sugerindo que a ingestão alcoólica crônica seja um fator associado ao comprometimento do fluxo biliar nestes pacientes.

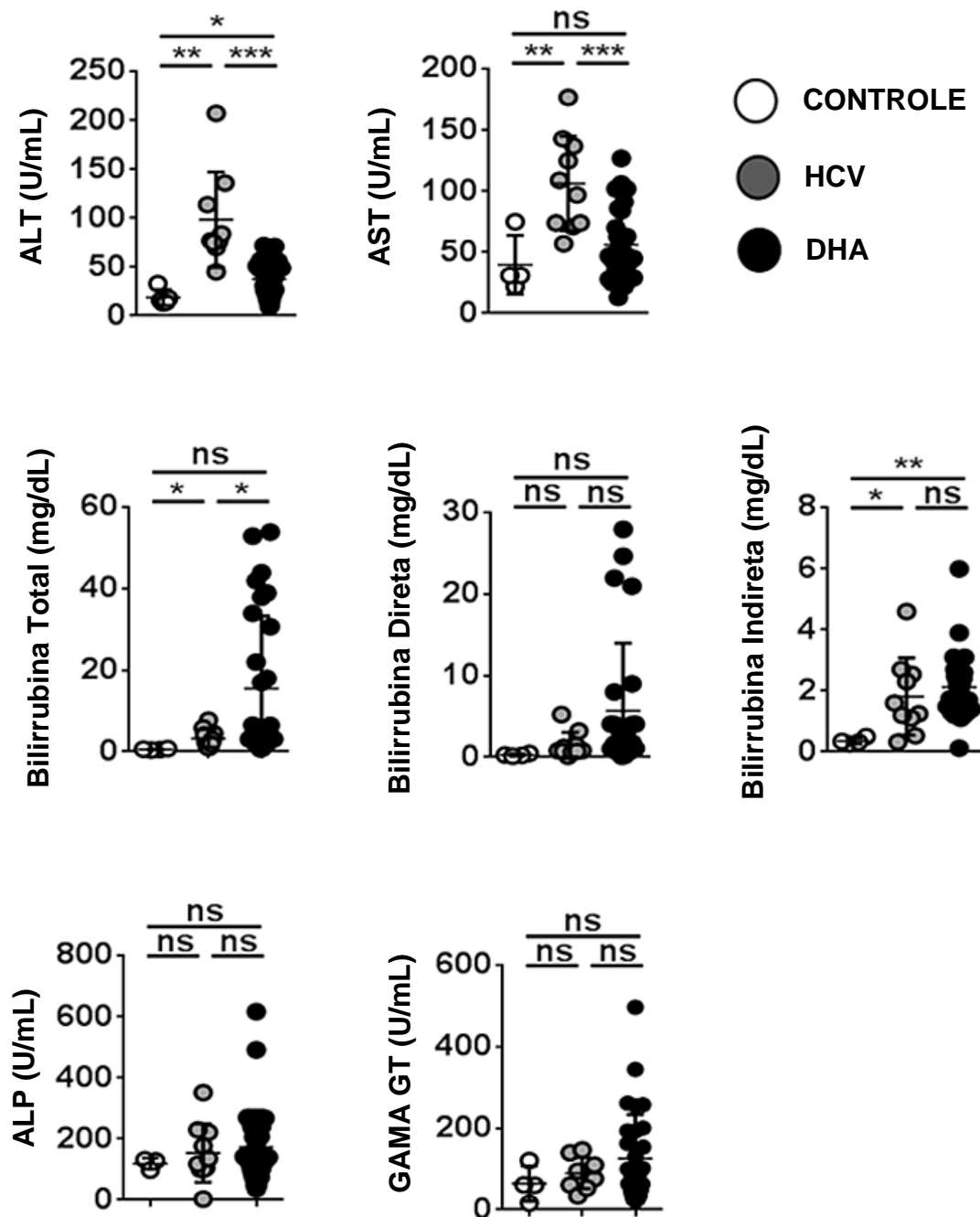


Figura 7: Análise dos parâmetros laboratoriais bioquímicos entre os grupos de estudo. Em análise dos marcadores bioquímicos de relevância clínica para avaliação durante a DHA na fase cirrótica, foi observada diferença significativa nas análises de ALT ($p < 0,05$), para o HCV, que demonstrou níveis elevados em comparação com a DHA e o grupo de doadores (controle), mas também para a DHA em comparação com o grupo controle quanto a transaminase AST, com níveis significativamente elevados na DHA em comparação ao grupo controle, e para bilirrubinas total e indireta, na qual a bilirrubina total se mostrou significativamente elevada no grupo DHA em comparação ao grupo controle. Não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) para os parâmetros bioquímicos de ALP, GGT e bilirrubina direta, entre os grupos.

Fonte: Santos *et al.*, 2020.

6.1.1 Análise da imunomarcção do ITPR3 em colangiócitos de camundongos induzidos com dieta etanólica 5%

Foram realizadas análises bioquímicas, histopatológicas e em parâmetros de relevância comuns na indução alcoólica prolongada, em camundongos machos *C57BL/6* induzidos durante 10 dias com dieta etanólica 5% (Lamaz-Paz *et al.*, 2018; Sueblinvong *et al.*, 2016; Sueblinvong *et al.*, 2014), para colaborar com os resultados observados na avaliação da expressão do ITPR3 em colangiócitos, em amostras de tecido humano.

Houve uma redução no peso dos animais do grupo etanólico ao longo dos dez dias de dieta alcoólica 5%, em comparação ao grupo não-etanólico (Figura 8 A). É importante ressaltar que distúrbios do peso, como a anorexia e a desnutrição, são características comuns entre os bebedores crônicos. Desde a década de 60, já se conheciam os efeitos do alcoolismo crônico em relação às desordens no peso, entre as quais, a anorexia e a desnutrição (Lieber; Jones; Decarli, 1965; Beckett; Livingstone; Hill, 1962). Características essas que até os dias atuais é avaliada como um dos marcadores clínicos de comprometimento comum na ingestão crônica de álcool etílico, que pode inclusive acarretar suscetibilidade à outros agravos de saúde. Em 2017, Rehm e seus colaboradores descobriram que o alcoolismo apresenta estreita relação com a incidência e a progressão do HIV. Sharma e colaboradores, em 2010, demonstraram que a incidência de infecção por HIV em vários setores da Índia esteve associado a fortes evidências de suscetibilidade pelo aumento do consumo de álcool pela população. Assim como, infecções bacterianas oportunistas têm sido observadas em pacientes hospitalizados, como sendo uma das principais causas de morte durante a DHA, especialmente na HA (Shi *et al.*, 2019; Singal *et al.*, 2018; Altamirano *et al.*, 2014; Sharma; Tripathi; Pelto, 2010).

Apesar da diminuição gradativa no peso dos animais etanólicos, foi observado um aumento significativo ($p < 0,05$) no peso do fígado destes animais em relação ao seu peso corporal (Figura 8 B), contribuindo com as análises realizadas em lâminas contendo cortes histológicos de tecido hepático dos modelos animais, onde foram identificadas alterações típicas do espectro inicial induzido na DHA, como esteatose hepática, balonizações pelo acúmulo significativo de lipídeos no fígado, mas sem infiltração neutrofílica, nas amostras de tecido hepático do grupo etanólico, comparados ao grupo não-etanólico (Figura 8 C). Além destes achados, típicos do espectro inicial da DHA, foi observada diferença significativa ($p < 0,05$) na avaliação dos lipídios totais entre os grupos etanólico e não-etanólico (Figura 8 D).

Inúmeros estudos têm relatado os efeitos do etilismo crônico sobre o organismo, em sua maioria, avaliando os efeitos no fígado, entre os quais, a indução de mudanças no metabolismo lipídico que podem causar lesões hepáticas durante a DHA, onde a maioria dos pacientes com DHA apresentam espectros de gordura no fígado com consequências histopatológicas características, principalmente a esteatose hepática e a esteato-hepatite (Sun *et al.*, 2018; Bruha; Dvorak; Petryl, 2012; Donohue, 2007; Reed *et al.*, 1996).

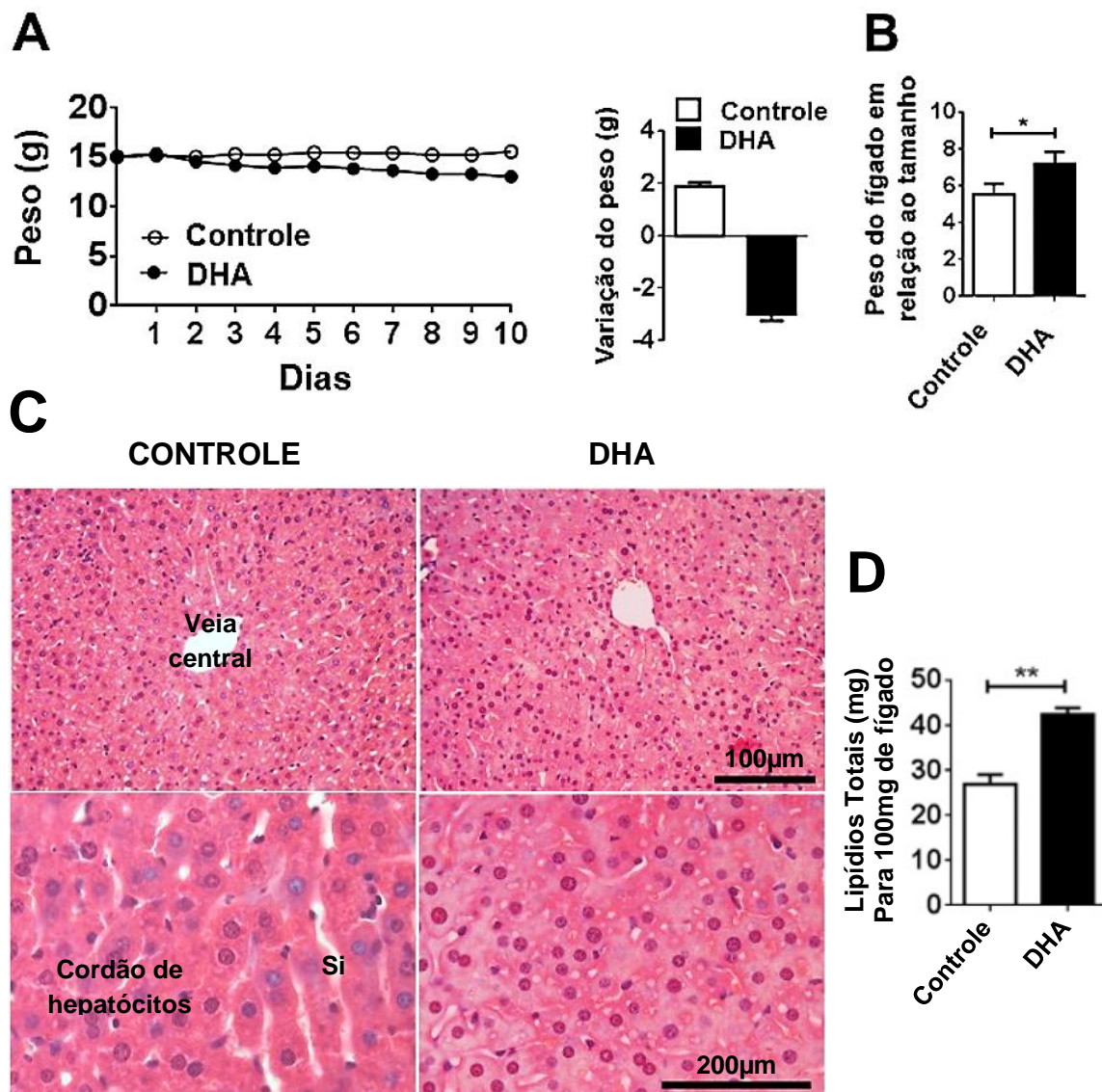


Figura 8: Avaliação da indução alcoólica em camundongos tratados com álcool 5%. Ocorreu diminuição gradativa no peso dos animais etanólicos em comparação ao grupo não-etanólico (A), e um aumento significativo ($p < 0,05$) no tamanho/peso do fígado destes animais comparados aos não-etanólicos (B). Em corte histológico de tecido hepático dos camundongos *C57BL/6* corados com hematoxilina e eosina (HE) foi demonstrada alterações histopatológicas típicas de esteatose hepática, sem infiltrado inflamatório (C), e acúmulo significativo de lipídeos no fígado (D).

Fonte: Santos *et al.*, 2020.

Amostras de soro foram coletadas durante a eutanásia dos modelos experimentais para análises bioquímicas dos níveis séricos de AST, ALT e bilirrubina (bilirrubina total e frações; bilirrubina direta e indireta). Os resultados encontrados demonstraram diferença significativa ($p < 0,05$) para as dosagens bioquímicas de AST e ALT entre os grupos etanólico e não-etanólico, conforme demonstra a Figura 9. Entretanto, não foi observada diferença significativa ($p > 0,05$) entre os grupos quando analisado os níveis de bilirrubina total e frações (bilirrubina direta e indireta). Isto pode ser justificado devido as diferenças nos graus e estágios da lesão hepática alcoólica, entre a DHA em humanos e nos modelos animais induzidos com dieta etanólica, os quais dificilmente reproduzem todas as etapas da DHA, principalmente os estágios crônicos da ingestão alcoólica, o que não permite observar algumas das alterações histopatológicas na história translacional na evolução da DHA (Lamas-Paz *et al.*, 2018), ou seja, embora os roedores (principalmente os camundongos e os ratos), representem os modelos animais preferidos para mimetizar a DHA em humanos, eles não apresentam o espectro total da doença (Bertola *et al.*, 2013; Brandon-Warner *et al.*, 2012). Entre os modelos animais mais promissores utilizados nesta linha de pesquisa que expressaram íntima semelhança a todos os estágios da DHA em seres humanos, os primatas (principalmente os babuínos) foram considerados ideais para os estudos envolvendo a DHA (Lieber *et al.*, 1985). Contudo, questões éticas mais rigorosas, o alto custo e o tempo prolongado para a realização da pesquisa (em média 4 anos ou mais), impedem o uso de primatas para os estudos laboratoriais envolvendo a DHA atualmente (Lamas-Paz *et al.*, 2018).

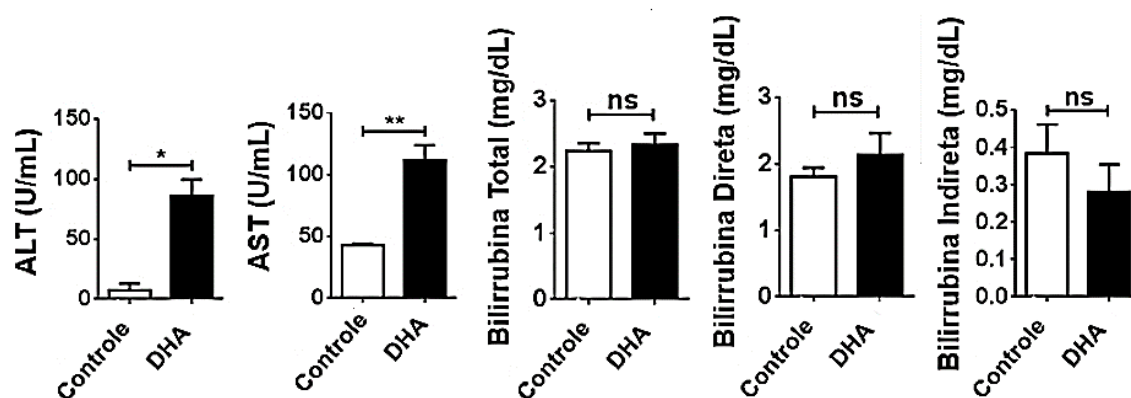


Figura 9: Análises bioquímicas em camundongos tratados com álcool 5%. Análises bioquímicas demonstraram diferença significativa ($p < 0,05$) entre as transaminases (ALT e AST) dos animais etanólicos em relação ao grupo não-etanólico, mas não ($p > 0,05$) para bilirrubina e suas frações.

Fonte: Santos *et al.*, 2020.

Para determinação dos efeitos oxidativos causados durante a ingestão alcoólica nos modelos animais etanólicos, foi empregada a técnica de *WB* para investigar a expressão dos principais marcadores antioxidantes induzidos pelo fator de transcrição Nrf2: SOD-1, GPx e Catalase. Os resultados obtidos demonstraram redução significativa ($p < 0,05$) na expressão de todos os agentes antioxidantes investigados nos animais etanólicos em comparação ao grupo não-etanólico (Figura 10).

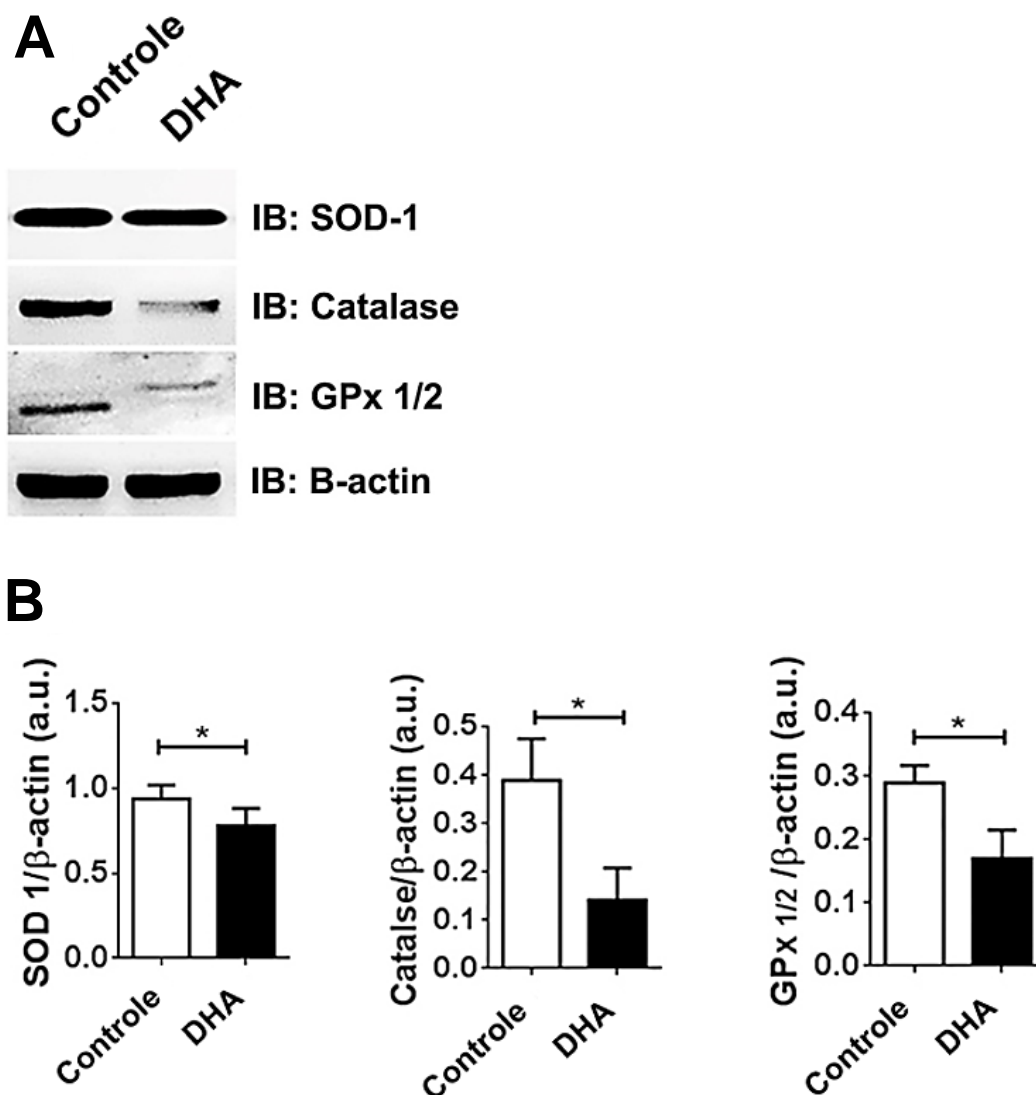


Figura 10: Análise dos marcadores antioxidantes expressos durante o estresse oxidativo induzido pelo álcool. Em análise por técnica de *Western blot* para os principais marcadores regulados pelo fator de transcrição Nrf2 durante o estresse oxidativo (A), foi possível observar uma diminuição estatística significativa ($p < 0,05$) para os três marcadores de estresse oxidativo investigados; SOD 1, GPx e catalase, nos animais etanólicos em comparação aos não-etanólico (B).

Fonte: Santos *et al.*, 2020.

Nrf2 é um regulador chave na expressão de genes antioxidantes e de desintoxicação. Evidências recentes sugerem que Nrf2 promova a sobrevivência celular evitando o aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs) em diversas condições de estresse oxidativo, sendo Nrf2 considerado o mais importante agente da via de sinalização antioxidante endógena, expresso em maior quantidade no fígado e nos rins (Kang *et al.*, 2016; Hybertson *et al.*, 2011; Niture; Khatri; Jaiswal, 2014). Contudo, a diminuição dos níveis dos agentes antioxidantes em camundongos etanólicos observados neste estudo condiz com achados anteriores, que desde a década de 90, já haviam observado que a exposição alcoólica duradoura reduz os agentes antioxidantes e eleva a produção de EROs em células humanas (Toyokuni, 1999; de Groot, 1994). Entre os quais, superóxido, radicais hidroxila, radicais peroxila e peróxido de hidrogênio (Li *et al.*, 2015).

Liu e colaboradores, em 2013, demonstrou que a ativação máxima do Nrf2 conduziu a uma diminuição nos níveis séricos de ALT em camundongos, da mesma forma que camundongos Nrf2-*knockout* apresentaram atividade aumentada de EROs e de ALT (Liu *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2012; Lamle *et al.*, 2008). De qualquer forma, apesar do papel regulador no equilíbrio redox, o que poderia aliviar a inflamação hepática durante a progressão da DHA, o fator de transcrição Nrf2 ainda requer mais estudos em modelos animais, bem como em humanos, para esclarecer seu papel específico na regulação dos fatores antioxidantes durante a DHA (Sun *et al.*, 2018).

Após validação observada nas análises preliminares no espectro inicial da DHA induzida em camundongos C57BL/6, foi avaliado o nível de expressão do ITPR3 em colangiócitos e comparado entre os grupos (etanólico e não-etanólico).

Foi observado que após 10 dias de ingestão alcoólica a 5%, ocorreu um comprometimento da expressão do ITPR3 em colangiócitos, comparado ao grupo de animais não-etanólicos, onde não foi observada redução nos níveis de expressão do ITPR3 em colangiócitos destes animais (Figura 11).

A diminuição da expressão do ITPR3 em colangiócitos de camundongos etanólicos observado neste estudo foi importante para consolidar os achados determinados em amostras de biópsias hepáticas humanas na DHA, uma vez que tanto nos modelos experimentais induzidos com ingestão alcoólica 5% durante 10 dias, quanto na DHA crônica de pacientes com cirrose hepática, ocorreu comprometimento e diminuição na expressão dos níveis do ITPR3 em colangiócitos. Semelhante com relatos publicados na área, os quais relacionam a utilização de drogas hepatotóxicas, como o álcool, ao comprometimento mecânico dos ductos biliares (Kasztelan *et al.*, 2013; Amini

e Runyon, 2010) e à evidências de colestase intra-hepática com o álcoolismo (Panqueava, 2014). Além disso, o comprometimento da expressão do ITPR3 em colangiócitos se mostrou significativamente associada com casos de HA, durante a DHA, onde evidências histológicas de colestase também foram observadas em biópsias hepáticas provenientes de casos de HA (Guerra e Nathanson, 2015).

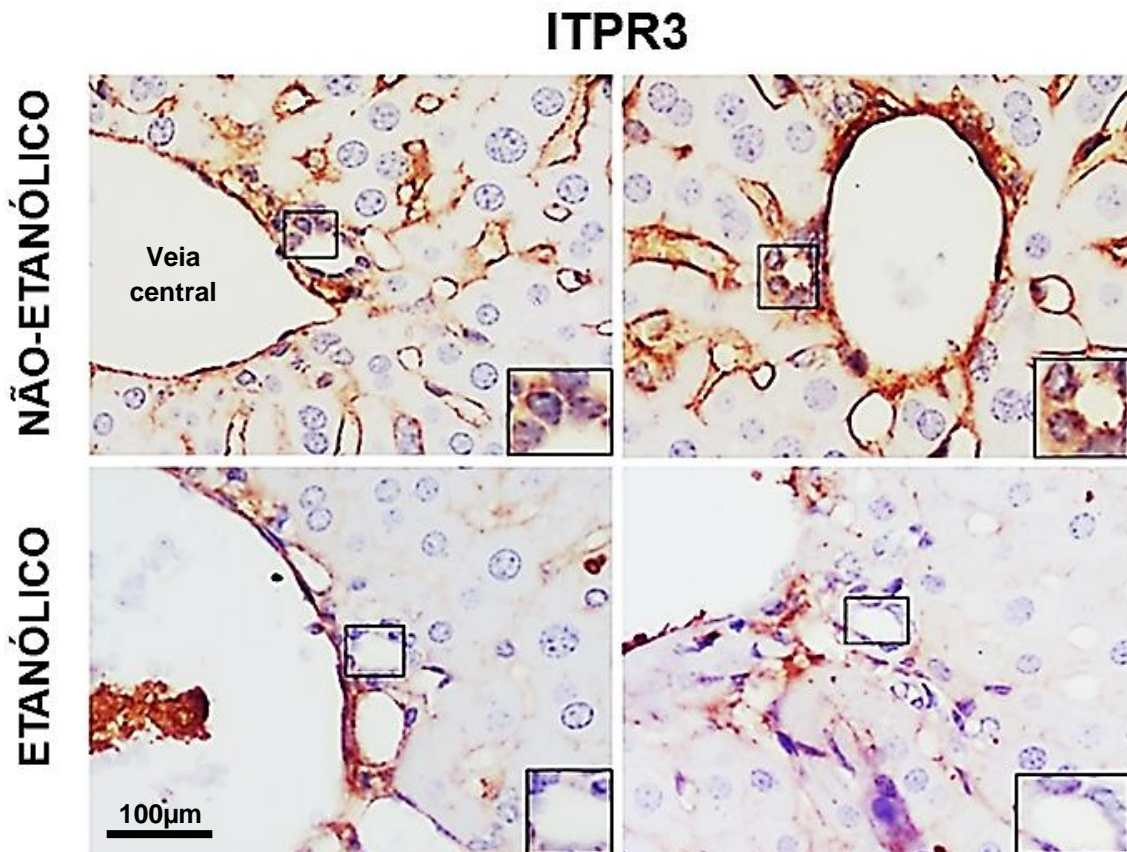


Figura 11: Determinação da expressão do ITPR3 em colangiócitos de camundongos machos *C57BL/6*. Corte histológico de tecido hepático de camundongos *C57BL/6* para análise IHC demonstrando diminuição da imunomarcação do ITPR3 em colangiócitos nos animais do grupo etanólico após 10 dias de ingestão alcoólica 5%, em comparação ao grupo não-etanólico, que não apresentou comprometimento nos níveis de imunomarcação do ITPR3 em colangiócitos.

Fonte: Santos *et al.*, 2020.

6.2 INVESTIGAÇÃO DOS FATORES DE TRANSCRIÇÃO QUE REGULAM A EXPRESSÃO DO ITPR3 EM COLANGIÓCITOS NA DHA

Estudos recentes têm sugerido a participação de mediadores transcricionais na regulação da inibição da expressão do ITPR3 em diferentes tipos de doenças que comprometem os colangiócitos, entre os quais Nrf2, NF- κ B e miR-506, relevantes na

patogênese de formas específicas destas diferentes doenças (Franca *et al.*, 2019; Jing *et al.*, 2018; Krawczyk *et al.*, 2017; Guerra e Nathanson, 2015). Baseado nestes estudos foi investigado o possível fator de transcrição associado à regulação negativa na diminuição da expressão do ITPR3 em colangiócitos na DHA.

6.2.1 Investigação do fator de transcrição NF- κ B em colangiócitos na DHA

NF- κ B é um fator de transcrição citoplasmático latente com papel fundamental na regulação imunológica, envolvido também nas respostas inflamatórias. Sua ativação é estimulada por diferentes eventos, como citocinas inflamatórias, estresse oxidativo ou endotoxinas bacterianas, onde NF- κ B ativado transloca para o núcleo regulando genes alvo (Ahmad *et al.*, 2015; Hinz *et al.*, 2012; Li e Verma, 2002; Wang *et al.*, 2002).

O NF- κ B desempenha papel significativo nos distúrbios inflamatórios fenotípicos em várias condições fisiopatológicas (Csiszar *et al.*, 2008). A translocação do NF- κ B do citoplasma para o núcleo está frequentemente associada à indicação de sua atividade à resposta celular contra agentes oxidantes ou respostas imunológicas e inflamatórias agudas (Dallot *et al.*, 2005). Franca e colaboradores (2019), demonstraram que em casos de HA grave e também por sépsis, a expressão do ITPR3 estava diminuída ou ausente em colangiócitos de pacientes com alguma dessas condições, onde a atividade do NF- κ B diminuiu a expressão do ITPR3 em colangiócitos humanos. Sugerindo que tal alteração observada nas condições de sépsis e na HA pode contribuir para a colestase.

Entretanto, os resultados obtidos neste estudo através das análises por IHC em tecido hepático humano não demonstrou a translocação nuclear do NF- κ B (RelA e NF- κ B 1, também denominados p65 e p50, respectivamente) em colangiócitos na DHA em fase cirrótica (Figura 12). Sugerindo que NF- κ B não seja o fator de transcrição de regulação negativa da expressão do ITPR3 em colangiócitos durante a cirrose na DHA.

A diferença entre os resultados apresentados por Franca e colaboradores (2019) e este trabalho, uma vez que não foi observada translocação nuclear do fator de transcrição NF- κ B e consequente atividade na regulação inibitória da expressão do ITPR3 em colangiócitos na fase cirrótica durante a DHA, nos faz pensar que diferenças na fisiopatologia entre o espectro da DHA na fase cirrótica e na HA possa justificar a atividade diferenciada do NF- κ B entre os dois resultados comparados e que o espectro variado da DHA expresse condições ainda não completamente elucidadas sobre a participação do fator de transcrição NF- κ B no espectro desta doença.

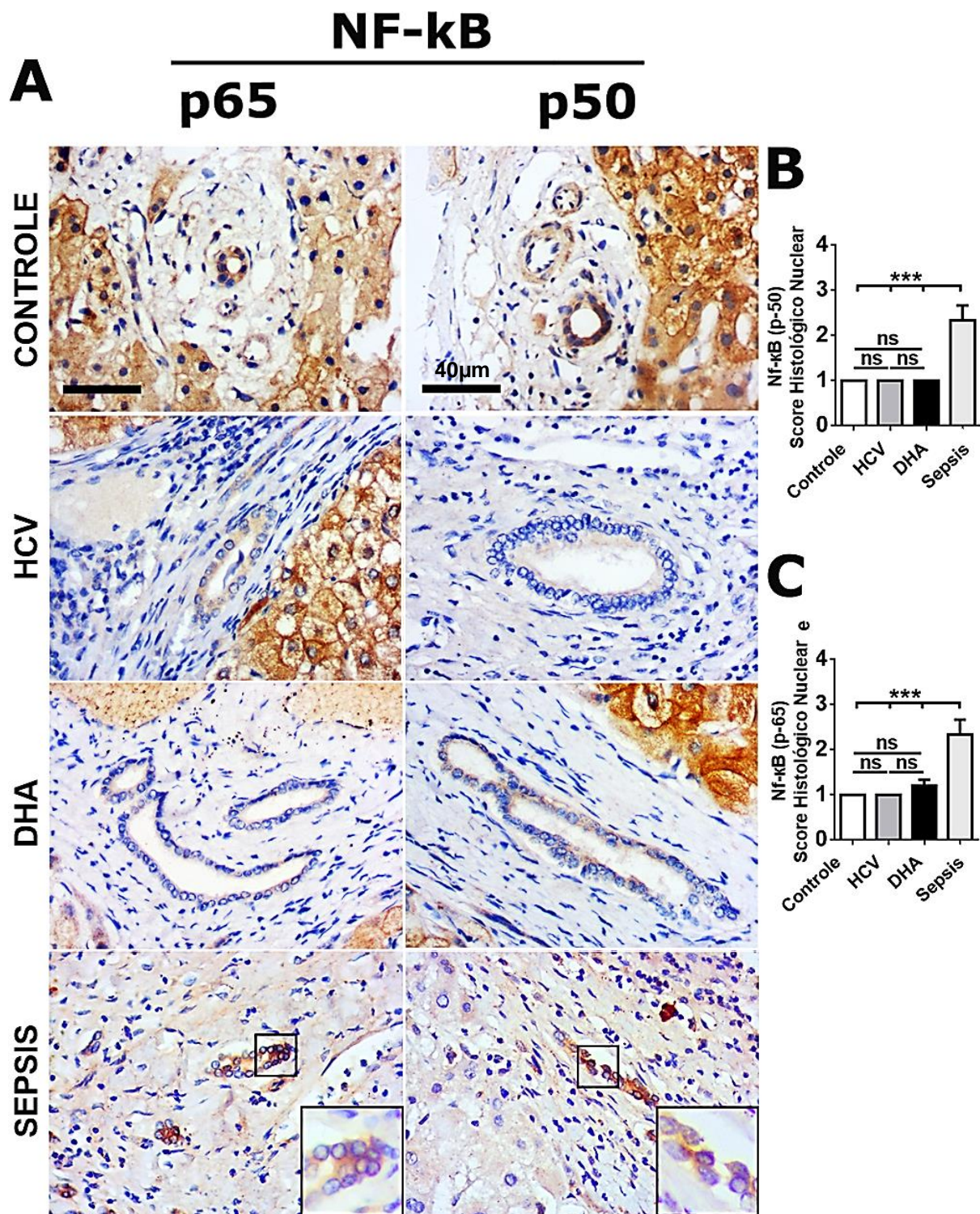


Figura 12: Avaliação da translocação nuclear de NF-κB (RelA e NF-κβ 1) em colangiócitos na DHA. Análise IHC em tecido hepático humano demonstrou não ocorrer a translocação nuclear do fator de transcrição NF-κB 1 (p50) nem do NF-κB p65 (RelA) entre os grupos (A). Não havendo diferença estatística ($p > 0,05$) no nível de translocação nuclear entre os grupos (B e C). Sugerindo que NF-κB não seja o fator de transcrição envolvido na regulação negativa do ITPR3 em colangiócitos na DHA. Casos e sepsis foi usado como controle positivo de translocação nuclear NF-κB em ambos os casos (p50 e p65).

Fonte: Santos *et al.*, 2020

6.2.2 Investigação do microRNA-506 em colangiócitos na DHA

Em 1993 foram descobertos os microRNAs, componente de uma classe de pequenas moléculas de RNA não codificantes denominadas micro ácido ribonucleico, com cerca de 18 a 24 nucleotídeos, que regulam a expressão gênica através da ligação com microRNAs, interferindo no processo de tradução. Em que, na maioria das vezes, atue como regulador reprimindo seus alvos através da interação com a região não traduzida 3' (*untranslated region* - UTR) (Szabo e Bala, 2013; Ambros, 2004; Lee; Feinbaum; Ambros, 1993).

Já foram identificados mais de 1400 microRNAs em mamíferos, responsáveis por influenciar centenas de transcrições de genes e processos biológicos fundamentais, incluindo no fígado, e em diferentes doenças associadas à agressão hepática, entre elas a esteatohepatite e a HA na DHA (Szabo e Bala, 2013).

O microRNA-506 já foi descrito como um dos reguladores da inibição da expressão do ITPR3 em diferentes tipos de colangiopatias (Jing *et al.*, 2018; Krawczyk *et al.*, 2017), e por isso, foi investigada sua participação, ou não, como componente da regulação negativa na expressão do ITPR3 em colangiócitos durante a DHA. Entretanto, após análises foi demonstrado que o miR-506 não interferiu na transcrição gênica durante a expressão do ITPR3 em colangiócitos, sugerindo que este também não seja o regulador negativo responsável pela diminuição dos níveis do ITPR3 em colangiócitos na DHA (Figura 13).

Como citado anteriorente, diversos relatórios demonstraram que alterações intracelulares nos microRNAs estão correlacionadas à várias doenças hepáticas, entre as quais a esteatohepatite alcoólica e lesões hepáticas induzidas por drogas (Szabo e Bala, 2013). Meng e colaboradores, em 2012, demonstraram uma indução do miRNA-34a tanto em humanos quanto em camundongos, na DHA, onde o miRNA-34a contribui para a esteatose hepática durante a DHA. Bala e colaboradores, também em 2012, demonstraram que em camundongos tratados com dieta alcoólica, a expressão hepática do miRNA-122 está diminuída, sugerindo um papel direto ou indireto para o miRNA-122 na fibrose induzida pelo álcool. Tais evidências sugerem que os perfis na expressão do miRNA são distintos entre as doenças hepáticas com diferentes etiologias, na qual a indução alcoólica modula miRNAs em diferentes tipos celulares no fígado, amplificando os efeitos da ingestão alcoólica.

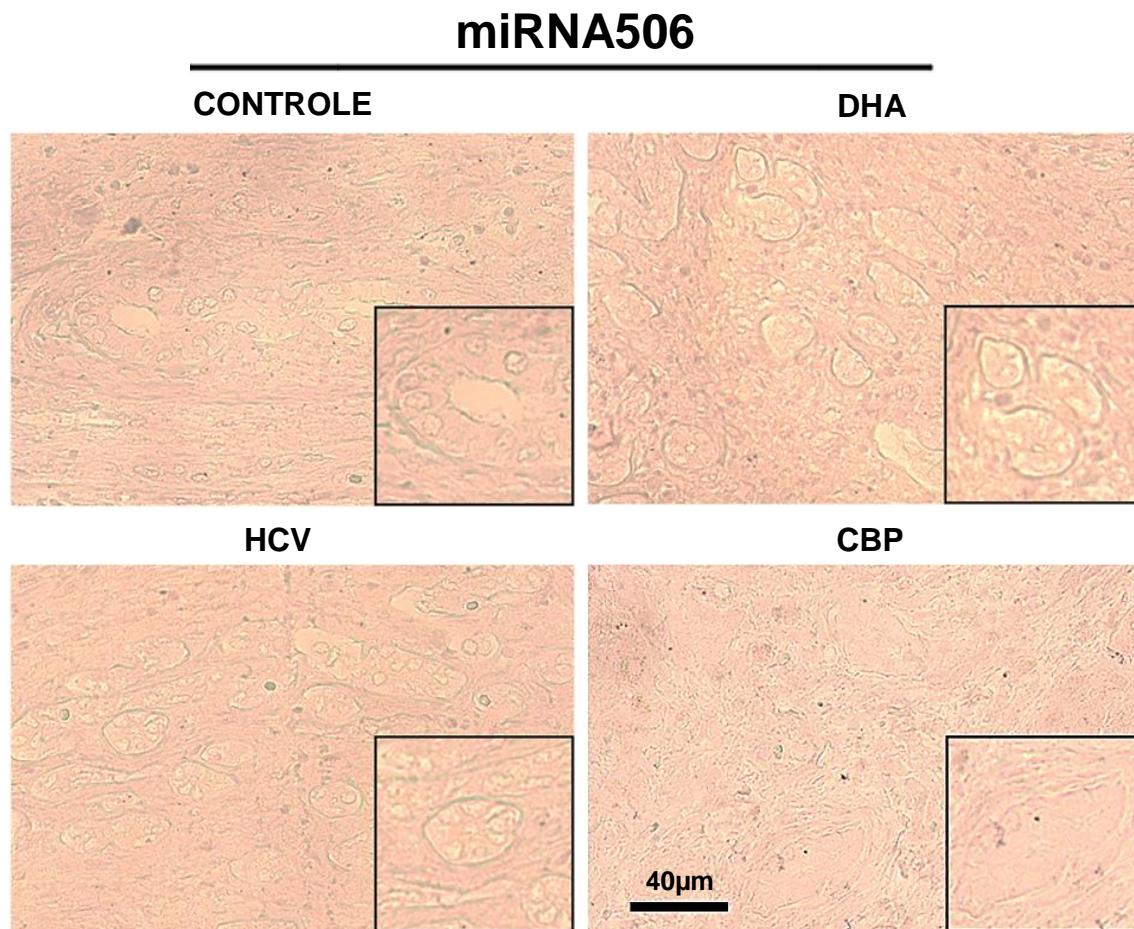


Figura 13: Investigação do microRNA-506 em colangiócitos na DHA. Reação de hibridização *in situ* em amostras contendo cortes histológicos de tecido hepático na DHA, comparado entre os grupos controle (doadores), infectados pelo HCV e pelo controle positivo na cirrose biliar primária (CBP). Não foi observada diferença na marcação para o microRNA-506 entre os casos avaliados, sugerindo que o microRNA-506 não seja o fator relacionado à regulação negativa na expressão do ITPR3 em colangiócitos durante a DHA.

Fonte: Santos *et al.*, 2020.

O miRNA-506 está entre os microRNAs expressos no fígado, principalmente em células do ducto biliar, tendo papel relevante na etiopatogênese da cirrose biliar primária (CBP). Estudo realizado por Banales e colaboradores em 2012, revelou que a regulação negativa do miRNA-506 resultou em aumento da atividade na troca do sistema de $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ em cultura de colangiócitos com CBP.

Especificamente, Ananthanarayanan e colaboradores (2015), revelaram que o miRNA-506 regula a expressão do ITPR3 em colangiócitos no epitélio do ducto biliar primário, onde a transfecção de miRNA-506 em linhagens celulares que expressam ITPR3 (importante na sinalização e secreção de Ca^{2+}), levou a perda do ITPR3 em

colangiócitos, ocasionando comprometimento na secreção biliar, evento característico das colangiopatias. Assim como, a inibição do miRNA-506 ocasionou aumento do ITPR3 em colangiócitos, confirmando sua ação reguladora na sinalização e secreção de Ca^{2+} mediada por ITPR3. Entretanto, pouco se sabe ainda a respeito da regulação epigenética do ITPR3, inclusive na DHA.

Apesar das amplas evidências sobre a importância no potencial regulatório dos microRNAs nas condições de agressão hepática, entre as quais, durante a ingestão alcoólica (Marin; Bujanda; Banales, 2014), em colangiócitos ainda não foi possível revelar se os microRNAs apresentam participação como fator regulador na expressão do ITPR3 na cirrose causada pela DHA, o que contribuiria na identificação da via responsável pelas alterações na sinalização de Ca^{2+} e os distúrbios na secreção biliar nesta doença.

6.2.3 Investigação do fator de transcrição Nrf2 em colangiócitos na DHA

O fator de transcrição Nrf2 é um elemento transcricional indispensável na regulação de genes citoprotetores que durante o estresse oxidativo transloca para o núcleo celular se ligando a promotores para a regulação da transcrição gênica dos elementos da resposta antioxidante, considerado um sensor de estresse oxidativo com evidências de regular negativamente a expressão do ITPR3 em colangiócitos (Cho e Kleeberger, 2015; Weerachayaphorn *et al.*, 2015).

Conforme evidências científicas, entre as quais as anteriormente citadas, que demonstraram relação entre a regulação negativa através do Nrf2 na expressão do ITPR3 em colangiócitos, foi realizada análise IHC para investigar se o fator de transcrição Nrf2 apresentava translocação nuclear nas amostras de biópsia hepática de pacientes com cirrose causada pela DHA, comparando entre o grupo controle de doadores de fígado e dos infectados com HCV.

Embora a presença do fator de transcrição Nrf2 não seja nuclear na maioria dos casos de DHA analisados (46/49), Nrf2 esteve localizado em todo o citoplasma e preferencialmente na região perinuclear na DHA (Figura 14 A). Entretanto, vale destacar que em 3 das 49 amostras de biópsias hepáticas humanas envolvendo casos de DHA, apresentaram translocação nuclear do fator de transcrição Nrf2 em colangiócitos (Figura 14 B).

Nrf2

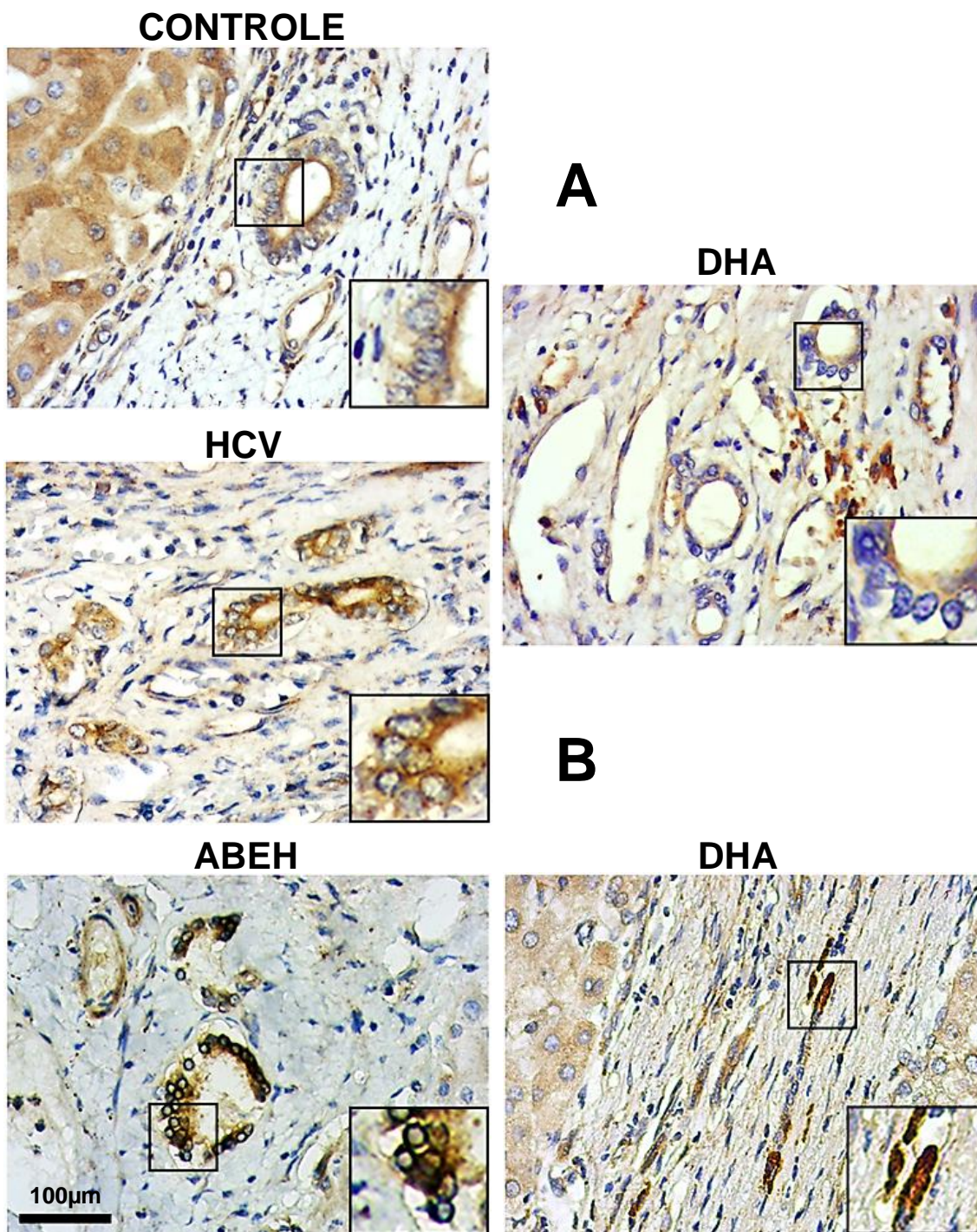


Figura 14: Identificação da translocação nuclear do fator de transcrição Nrf2 em colangiócitos na DHA. Corte histológico para análise IHC em biópsias hepáticas humanas demonstrando não ocorrer translocação nuclear do fator de transcrição Nrf2 em colangiócitos, na maioria dos casos envolvendo a DHA na fase de cirrose (46/49), comparado entre os grupos (A). Em 3 das 49 amostras de tecido hepático na DHA, foi observada translocação nuclear do fator de transcrição Nrf2 em colangiócitos (B), assim como, nos casos envolvendo artéria biliar extra-hepática (controle positivo).

Fonte: Santos *et al.*, 2020.

As doenças colestáticas apresentam um amplo espectro de diferentes etiologias hepatobiliares, como o comprometimento na produção intra-hepática de bile, no transporte transmembrana ou obstrução mecânica do fluxo biliar, caracterizando o acúmulo dos componentes da bile – bilirrubina, ácidos biliares, colesterol (Blokker *et al.*, 2019; Ananth, 2018). Entre as causas de obstrução biliar intra-hepática (colestase intra-hepática), Panqueva (2014) destacou que a ingestão alcoólica, em alguns casos de HA, foi observada em pacientes com colestase. Guerra e Nathanson em 2015, informaram que pacientes diagnosticados com HA apresentaram redução da expressão do ITPR3 em colangiócitos, sugerindo a possibilidade de HA está associada à disfunção na atividade secretória em colangiócitos, o que estaria contribuindo para a colestase nestes casos.

Achados recentes demonstrados por Franca e colaboradores (2019), descrevem que o fator de transcrição Nrf2 seja responsável pela diminuição da expressão do ITPR3 em colangiócitos, porém apenas em alguns tipos de colangiopatias, sugerindo que múltiplas vias de sinalização distintas podem convergir para a diminuição da expressão do ITPR3 em colangiócitos. É provável que tais condições variadas estejam presentes entre os casos de DHA investigados, uma vez que identificamos tanto a translocação nuclear do fator de transcrição Nrf2 em colangiócitos na cirrose causada pela DHA, quanto não. Essa distribuição alterada pode ter ocorrido devido aos casos de DHA serem de pacientes com pelo menos seis meses de abstinência alcoólica para submissão ao transplante de fígado, onde a ausência de estímulos agudos pelo álcool poderia contribuir para a menor translocação nuclear de Nrf2 observada nas amostras de DHA.

Esta dualidade nos achados IHC na DHA associado à investigação do Nrf2 sugere que apesar da ingestão alcoólica já ter sido associada à diminuição da expressão do ITPR3 em colangiócitos, assim como, a regulação negativa do Nrf2 na expressão do ITPR3 nestas células, existam diferenças pelo espectro variado da DHA que influenciam diretamente nos mecanismos de sinalização celular e modulação gênica na expressão do ITPR3 e sua provável regulação negativa mediada pelo fator de transcrição Nrf2 em colangiócitos.

Identificar possíveis fatores que pudessem colaborar com os achados de que a translocação nuclear do fator de transcrição Nrf2 ocorreu em apenas alguns dos casos de DHA analisados, fomentou a necessidade em investigar se diferenças no histórico clínico e nos fatores genéticos associados à polimorfismos do gene *NFE2L2* – responsável por codificar o fator de transcrição Nrf2 – sejam representativos em pacientes com DHA.

Evidências cada vez maiores tem associado variações genéticas em um restrito número de SNPs ao risco aumentado da DHA (Kolla *et al.*, 2018). Estudos de abordagem

entre as variações genéticas individuais e a progressão na DHA já foram discutidos em trabalhos anteriores nos quais tais evidências parecem contribuir para a patogênese da DHA (Anstee; Seth; Day, 2016). Além dos fatores associados às variações genéticas do indivíduo na DHA, parâmetros relacionados à atividade inflamatória e histórico clínico do paciente, também devem ser investigados na necessidade de avaliação dos distúrbios coleostáticos, considerada por diversos autores como requisito para o diagnóstico segundo alterações estruturais associadas à doença e sua progressão (Panqueva, 2014; Kasztelan-Szczerbinska *et al.*, 2013; Amini e Rounion, 2010).

6.3 AVALIAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS NO POLIMORFISMO DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE *NFE2L2*

A expressão do fator de transcrição Nrf2 pode ser afetada por polimorfismos identificados na região promotora do gene *NFE2L2*. Os SNPs rs35652124 (-214 A/G), rs4893819 (-1275 G/A) e rs6721961 (-178 A/G) representados na Figura 15 estão entre os de maior frequência na população global e podem alterar a atividade de transcrição do Nrf2 diminuindo a expressão de quem depende da sua regulação, demonstrando um significado funcional que afeta a expressão e as funções basais do Nrf2 (M-AL-Azhary *et al.*, 2016). Baseado em dados semelhantes, foram analisadas as diferenças alélicas nos SNPs do gene *NFE2L2* nas biópsias hepáticas na DHA e comparados entre os grupos, com o objetivo de identificar se há diferenças que contribuam na avaliação da importância do fator de transcrição Nrf2 na regulação negativa do ITPR3 em colangiócitos na DHA.

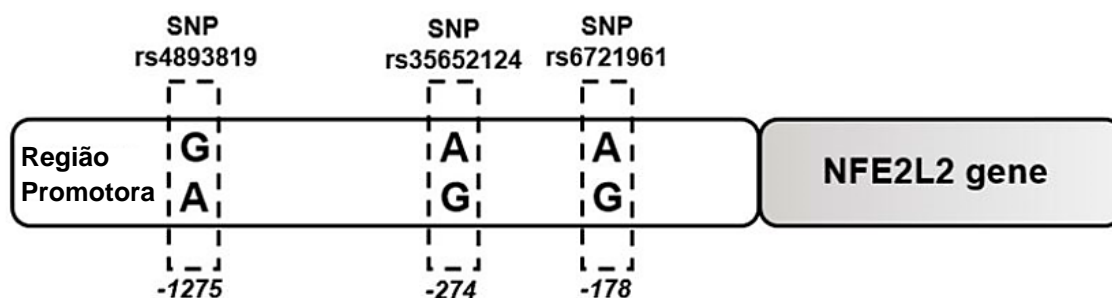


Figura 15: Posição esquemática dos polimorfismos selecionados do gene *NFE2L2*. Os três polimorfismos avaliados neste estudo estão localizados na região promotora do gene *NFE2L2*. O SNP rs6721961 está localizado na posição -178, onde pode estar presente uma adenina (A) ou guanina (G). O SNP rs35652124 está na posição -274 e apresenta a mesma variação. Por fim, o SNP rs4893819 está localizado na posição -1275 e a variação ocorre entre G e A. Todos considerando a posição 3'→ 5'.

Fonte: Santos *et al.*, 2020.

Foi possível observar que nas análises moleculares realizadas, dois SNPs da região promotora do gene *NFE2L2*, os SNPs rs4893819 (-1275 G/A) e rs6721961 (-178 A/G), não demonstraram relação específica com a DHA. Entretanto variações genotípicas do SNP rs35652124 (-214 A/G) demonstrou relação significativa com a DHA associada ao alelo A.

6.3.1 Avaliação do SNP rs35652124 (-214 A/G) na DHA

O SNP rs35652124 (-214 A/G) apresentou maior frequência homocigoto A/A e heterocigoto A/G na DHA (80,4%) demonstrando diferença significativa ($p = 0,0428$) em comparação aos doadores de transplante hepático (57,14%) e dos infectados pelo HCV (50%) (Tabela 1). Sugerindo que o genótipo homocigoto A/A e heterocigoto A/G representam um fator de risco à DHA, enquanto que ser homocigoto G/G (19,6%), configura como um fator de proteção por apresentar menor frequência alélica em comparação aos doadores de fígado (42,86%) e dos infectados pelo HCV (50%).

Tabela 1: Frequência alélica e genotípica entre os grupos - SNP rs35652124

Alelo	DHA n (%)		HCV n (%)		Controle n (%)		p valor
A/A	18	39,1	2	14,3	5	23,81	0,1218
G/G	9	19,6	7	50,0	9	42,86	
A/G	19	41,3	5	35,7	7	33,33	
Total	46	100,0	14	100,0	21	100	
A/A	18	39,1	2	14,3	5	23,81	0,1458
G/G_A/G	28	60,9	12	85,7	16	76,19	
Total	46	100,0	14	100,0	21	100	
A/A_A/G	37	80,4	7	50,0	12	57,14	0,0428
G/G	9	19,6	7	50,0	9	42,86	
Total	46	100,0	14	100,0	21	100	
A	55	59,8	9	32,1	17	40,48	0,0135
G	37	40,2	19	67,9	25	59,52	
Total	92	100,0	28	100,0	42	100	

Ao observar as diferenças alélicas entre os grupos para o alelo A em comparação ao alelo G, foi possível identificar que -214A apresentou diferença significativa ($p = 0,0135$) em sua frequência entre os pacientes com cirrose causada pela DHA (59,8%) em comparação ao alelo -214G entre todos os grupos analisados. Tais achados corroboram com a presença do alelo A no perfil tanto homozigótico quanto heterozigótico representar um fator de risco à DHA, enquanto que ser homozigoto G/G, esteja relacionado como um provável fator de proteção à DHA, uma vez que apresentou menor frequência alélica na DHA em comparação ao grupo controle e dos infectados pelo HCV.

Para contribuir com os resultados observados na Tabela 1, foram comparadas as diferenças nas frequências alélicas entre cada um dos grupos: DHA e os doadores de tecido hepático (Tabela 2), DHA e os infectados pelo HCV (Tabela 3), e entre os infectados pelo HCV e os doadores (Tabela 4).

Após análise das frequências alélicas entre a DHA e os casos controle (Tabela 2), foi observada diferença significativa na variação genotípica A/A e A/G entre os pacientes diagnosticados com cirrose causada pela DHA em comparação ao grupo controle ($p = 0,0460$). Assim como, para o alelo A, representado com maior presença estatisticamente significativa na DHA em comparação ao grupo controle ($p = 0,0376$).

Tabela 2: Frequência alélica e genotípica entre a DHA e controle - SNP rs35652124

Alelo	DHA n (%)		Controle n (%)		p valor
A/A	18	39,1	5	23,81	0,1457
G/G	9	19,6	9	42,86	
A/G	19	41,3	7	33,33	
Total	46	100,0	21	100	
A/A	18	39,1	5	23,81	0,3369
G/G_A/G	28	60,9	16	76,19	
Total	46	100,0	21	100	
A/A_A/G	37	80,4	12	57,14	0,0460
G/G	9	19,6	9	42,86	
Total	46	100,0	21	100	
A	55	59,8	17	40,48	0,0376
G	37	40,2	25	59,52	
Total	92	100,0	42	100	

Os resultados expressos na Tabela 2 apontam de fato que a presença do alelo -214A, nas variações genotípicas -214A/A e -214A/G, configura um perfil de risco à DHA, enquanto que a presença do alelo -214G na condição homozigoto G/G, represente um provável perfil genotípico de proteção contra a cirrose causada durante a DHA, uma vez que sua presença alélica esteve menor na DHA e maior entre os doadores de tecido hepático.

Ao avaliar a frequência alélica entre a DHA e os infectados pelo HCV (Tabela 3), foi identificado que a maior frequência genotípica homozigoto e heterozigoto do alelo A (A/A e A/G) também foi estatisticamente significativa na DHA em comparação aos infectados pelo HCV e menor para o genótipo homozigótico G/G ($p = 0,0345$). Da mesma forma que a maior presença do alelo -214A na DHA (59,8%), foi estatisticamente relevante ($p = 0,0103$) em comparação aos infectados pelo HCV (32,1%), sendo inversamente proporcional ao alelo -214G, o qual também apresentou menor presença (40,2%) em relação ao alelo -214A (59,8%) na DHA, e maior entre os infectados pelo HCV (67,9%) em relação ao alelo -214A (32,1%).

Tabela 3: Frequência alélica e genotípica entre a DHA e HCV - SNP rs35652124

Alelo	DHA n (%)		HCV n (%)		p valor
A/A	18	39,1	2	14,3	0,0668
G/G	9	19,6	7	50,0	
A/G	19	41,3	5	35,7	
Total	46	100,0	14	100,0	
A/A	18	39,1	2	14,3	0,0746
G/G_A/G	28	60,9	12	85,7	
Total	46	100,0	14	100,0	
A/A_A/G	37	80,4	7	50,0	0,0345
G/G	9	19,6	7	50,0	
Total	46	100,0	14	100,0	
A	55	59,8	9	32,1	0,0103
G	37	40,2	19	67,9	
Total	92	100,0	28	100,0	

Estes achados confirmam que a presença do alelo A (A/A e A/G) seja específico à cirrose causada pela DHA ao diferir estatisticamente de outra condição crônica de lesão hepática, a causada pelo HCV, corroborando ainda mais que o alelo A, na apresentação homocigoto e heterocigoto, seja um promissor marcador genético específico de maior risco para a cirrose causada pela DHA, enquanto que a presença do alelo G (G/G) seja um marcador genético de proteção contra a cirrose provocada durante a DHA. Principalmente após comparação das frequências alélicas entre o HCV e controle (Tabela 4), em que não houve diferença significativa entre os dois grupos.

Tabela 4: Frequência alélica e genotípica entre HCV e Controle - SNP rs35652124

Alelo	HCV n (%)		Controle n (%)		p valor
A/A	2	14,3	5	23,81	0,7898
G/G	7	50,0	9	42,86	
A/G	5	35,7	7	33,33	
Total	14	100,0	21	100	
A/A	2	14,3	5	23,81	0,4995
G/G_A/G	12	85,7	16	76,19	
Total	14	100,0	21	100	
A/A_A/G	7	50,0	12	57,14	0,6846
G/G	7	50,0	9	42,86	
Total	14	100,0	21	100	
A	9	32,1	17	40,48	0,4796
G	19	67,9	25	59,52	
Total	28	100,0	42	100	

O fator de transcrição *NFE2L2* é essencial na proteção celular e de tecidos contra o estresse oxidativo. Inúmeros estudos já identificaram papéis fenotípicos importantes para este fator de transcrição dos quais SNPs em *NRF2* foram identificados e avaliados aos efeitos na expressão e função do gene, e correlacionados à progressão de diferentes doenças (Cho; Marzec; Kleeberger, 2019).

Apesar de até o momento não terem havido estudos correlacionando as variantes genotípicas do SNP rs35652124 ao alcoolismo no homem, a frequência alélica observada para o SNP rs35652124 associada à variação do alelo A (A/A e A/G) como fator de risco

para a cirrose causada durante a DHA, está relacionada também a um maior risco em diferentes doenças descritas em diversos estudos do tipo. Em 2020, Teena e colaboradores demonstraram que o genótipo -214A/A mostrou-se prejudicial e associado à diminuição dos níveis transcricionais de Nrf2, predispondo à resistência insulínica em indivíduos com *Diabetes mellitus* tipo 2 (DMT2), sendo associado a um risco significativo para DMT2 ($p = 0,01$). Assim, propondo servir como um marcador genético para o diagnóstico da DMT2 e em combinação com diferentes marcadores inflamatórios. Ainda sobre o diabetes, Shimoyama e colaboradores, em 2014, já haviam observado que diabéticos com maior presença do alelo -214A, apresentaram um risco significativamente aumentado para doenças cardiovasculares ($p = 0,006$) – já considerando os fatores de risco sabidamente conhecidos – durante um estudo de coorte na população japonesa (Teena *et al.*, 2020; Shimoyama *et al.*, 2014). Neste mesmo estudo, Shimoyama e colaboradores (2014), demonstraram também que a frequência do alelo -214A esteve significativamente associada à pressão arterial entre os japoneses (Cho; Marzec; Kleeberger, 2019; Shimoyama *et al.*, 2014). Cordova e colaboradores (2010), avaliaram a frequência alélica do SNP rs35652124 em uma população mestiça de 212 mulheres mexicanas com quadro diagnosticado de nefrite, e observaram que o genótipo A/G esteve associado significativamente nesta população (Cho; Marzec; Kleeberger, 2019; Cordova *et al.*, 2010). Tais resultados demonstram que a presença do alelo A em homozigose (A/A) ou heterozigose (A/G), não apenas está relacionado ao risco aumentado na cirrose causada durante a DHA, mas também em diferentes patogenias que acometem o homem e associadas à modulações do estresse oxidativo.

Estudos populacionais realizados no Japão demonstraram uma associação de variações genotípicas do Nrf2 à distúrbios gastrointestinais, em que a presença do alelo -214A esteve associado à um maior score na inflamação e no aumento significativo da gravidade associada à atrofia da mucosa gástrica. Porém, também foi possível observar que o alelo -214G esteve associado como fator protetor para as doenças gastrointestinais (Arisawa, *et al.*, 2008).

Durante a aterogênese ocorre uma diminuição da resposta vasodilatadora devido à disfunções endoteliais, na qual o estresse oxidativo pode mediar danos e lesões endoteliais, auxiliando na progressão da aterosclerose. Em 2012, Marczak e colaboradores demonstraram uma associação do alelo -214G à redução do fluxo sanguíneo e modulação da pressão arterial com resposta vasodilatadora aumentada em afro-americanos saudáveis tratados com bradicinina ou nitroprussiato de sódio. Estes

últimos estudos contribuem para um sugestivo efeito protetor do alelo -214G em diferentes doenças, e não apenas à cirrose causada durante a DHA.

Entretanto, é importante ressaltar que nem todos os estudos tem demonstrado as mesmas associações de risco e suscetibilidades quanto às variantes genóticas no SNP rs35652124 (A/G) nas diferentes doenças investigadas. Pois, apesar do alelo -214A ter sido associado por von Otter e colaboradores, em 2010, a um risco mais precoce (antecipando por 2 anos) da doença de Alzheimer, em 2014, o mesmo grupo demonstrou que na etiologia da doença de Parkinson, que está correlacionada ao aumento do estresse oxidativo, a presença do alelo -214A desempenha um papel protetor à esta doença. Uma associação já descrita em diferentes trabalhos, como por exemplo o realizado por Gui e colaboradores dois anos depois (2016), que também associou a presença do alelo -214A na doença de Parkinson, como um fator protetor à esta doença (Gui *et al.*, 2016; von Otter *et al.*, 2014; von Otter *et al.*, 2010).

Isto ocorre, pois provavelmente, além das diversas etiologias nas diferentes doenças e do perfil étnico e fenotípico nas mais variadas populações do mundo, existem as variantes genóticas que podem modular diferentes mecanismos de sinalização e respostas celulares, além de outros moduladores que não foram investigados neste estudo, mas que devem exercer influencia durante a etiologia no espectro da DHA, assim como, na de outras doenças. Entre os quais, aqueles relacionados à resposta no estresse oxidativo presente nestas doenças. Por exemplo, polimorfismos que influenciam na expressão dos agentes antioxidantes SOD (Ala16Val) e GPx (Pro198Leu), estão associados à suscetibilidade e/ou gravidade na doença coronariana (Souiden *et al.*, 2016; Hiragi *et al.*, 2011). Podendo também estar relacionados às diferenças na etiologia de outras doenças, entre as quais a DHA e diversas outras que configuram entre si o aspecto etiopatológico do estresse oxidativo e a participação dos agentes antioxidantes.

6.3.2 Avaliação do SNP rs6721961 (-178 A/G) na DHA

O segundo polimorfismo com importância clínica avaliado quanto à associação com a DHA foi o SNP rs6721961, localizado na posição -178 na região promotora do gene *NFE2L2*. A frequência do alelo -178A e do alelo -178G nas amostras referentes à DHA não demonstraram diferenças significativas quando comparadas às amostras de HCV e dos doadores de tecido hepático (controle).

Contudo, foi observado que as variações genotípicas A/A e A/G demonstraram maior presença ($p = 0,0290$) entre os grupos (DHA = 58,7%, HCV = 88,9% e Controle = 80%) em comparação ao genótipo G/G (DHA = 41,3%, HCV = 11,1% e Controle = 20%) conforme mostra a Tabela 5.

Tabela 5: Frequência alélica e genotípica entre os grupos - SNP rs6721961

Alelo	DHA n (%)		HCV n (%)		Controle n (%)		p valor
A/G	16	34,8	10	55,6	12	60,0	0,0858
A/A	11	23,9	6	33,3	4	20,0	
G/G	19	41,3	2	11,1	4	20,0	
Total	46	100,0	18	100,0	20	100,0	
A/A	11	23,9	6	33,3	4	20,0	0,6385
A/G_G/G	35	76,1	12	66,7	16	80,0	
Total	46	100,0	18	100,0	20	100,0	
A/A_A/G	27	58,7	16	88,9	16	80,0	0,0290
G/G	19	41,3	2	11,1	4	20,0	
Total	46	100,0	18	100,0	20	100,0	
A	38	41,3	22	61,1	20	50,0	0.1231
G	54	58,7	14	38,9	20	50,0	
Total	92	100,0	36	100,0	40	100,0	

Para melhor definir os resultados estatísticos observados na Tabela 5 em relação às variações genotípicas -178A/A e -178A/G comparadas ao genótipo -178G/G, foi realizada uma análise relacionando cada grupo entre si (DHA e controle, DHA e HCV, HCV e controle), semelhante ao que foi realizado para as análises estatísticas do SNP rs35652124.

Quando analisadas as variações do alelo -178A e do alelo -178G comparando os grupos DHA e controle, não ocorreu qualquer correlação significativa na presença alélica entre os grupos (Tabela 6). Isto demonstra que a correlação estatisticamente relevante observada na Tabela 5 em relação às variações genotípicas -178A/A e -178A/G comparadas ao genótipo -178G/G, não está associada à DHA.

Tabela 6: Frequência alélica e genotípica entre DHA e Controle - SNP rs6721961

Alelo	DHA n (%)		Controle n (%)		p valor
A/G	16	34,8	12	60,0	0,1411
A/A	11	23,9	4	20,0	
G/G	19	41,3	4	20,0	
Total	46	100,0	20	100,0	
A/A	11	23,9	4	80,0	0,7308
A/G_G/G	35	76,1	16	20,0	
Total	46	100,0	20		
A/A_A/G	27	58,7	16	80,0	0,0908
G/G	19	41,3	4	20,0	
Total	46	100,0	20	100,0	
A	38	41,3	20	50,0	0,3549
G	54	58,7	20	50,0	
Total	92	100,0	40	100,0	

Dessa forma, foram comparadas as frequências alélicas entre os grupos DHA e HCV (Tabela 7), sendo observado que as variações genotípicas -178A/A e -178A/G foram estatisticamente relevantes em comparação ao genótipo G/G ($p = 0,0155$). Esses resultados sugerem que a presença do nucleotídeo A na posição -178 da região promotora do gene *NFE2L2*, está associado tanto à doença hepática cirrótica quanto nos casos envolvendo pacientes infectados cronicamente pelo HCV, apresentando um fator de risco preferencialmente à este polimorfismo.

Os resultados observados na Tabela 7 quanto a associação da presença do alelo -178A ($p = 0,0435$) na infecção crônica pelo HCV (58,3%), comparado à cirrose causada pela DHA (41,3%), foram reforçados após análise das variações genotípicas envolvendo os grupos HCV e controle (Tabela 8), em que não houve correlação estatisticamente significativa entre eles em nenhuma das frequências alélicas analisadas, sugerindo de fato que a variação genotípica -178A (A/A e A/G) esteja associada como um potencial fator de risco para a infecção pelo HCV comparado à DHA, assim como, a presença do genótipo G/G para o SNP -178, atue como um fator de proteção contra essas condições de cirrose hepática pelo HCV.

Tabela 7: Frequência alélica e genotípica entre DHA e HCV - SNP rs6721961

Alelo	DHA n (%)		HCV n (%)		p valor
A/G	16	34,8	10	55,6	0,0531
A/A	11	23,9	6	33,3	
G/G	19	41,3	2	11,1	
Total	46	100,0	18	100,0	
A/A	11	23,9	6	33,3	0,4587
A/G_G/G	35	76,1	12	66,7	
Total	46	100,0	18	100,0	
A/A_A/G	27	58,7	16	88,9	0,0155
G/G	19	41,3	2	11,1	
Total	46	100,0	18	100,0	
A	38	41,3	22	58,3	0,0435
G	54	58,7	14	41,7	
Total	92	100,0	36	100,0	

Tabela 8: Frequência alélica e genotípica entre HCV e Controle - SNP rs6721961

Alelo	HCV n (%)		Controle n (%)		p valor
A/G	10	55,6	16	60,0	0,4700
A/A	6	33,3	4	20,0	
G/G	2	11,1	4	20,0	
Total	18	100,0	20	100,0	
A/A	6	33,3	4	20,0	0,3636
A/G_G/G	12	66,7	16	80,0	
Total	18	100,0	20	100,0	
A/A_A/G	16	88,9	16	80,0	0,4671
G/G	2	11,1	4	20,0	
Total	18	100,0	20	100,0	
A	22	61,1	20	50,0	0,3307
G	14	38,9	20	50,0	
Total	36	100,0	40	100,0	

O fator de transcrição Nrf2 é um fator de transcrição fundamental nas doenças relacionadas ao estresse oxidativo e o SNP rs6721961 (-178 A/G) figura entre alguns dos SNPs clinicamente associado a diversas dessas doenças.

Durante análise da variação genotípica para o SNP rs6721961 foi demonstrado que a presença do alelo -178A esteve significativamente associada à cirrose causada pela infecção do HCV, em comparação à DHA, duas condições crônicas relacionadas ao estresse oxidativo que podem ser comparadas à outras doenças de caráter semelhantes.

No DMT2 o estresse oxidativo atua como um importante fator de risco para o aparecimento e na progressão desta doença. Estudos de polimorfismo associando o SNP rs6721961 ao DMT2, e as vezes à obesidade, tem demonstrado relação entre as variações genotípicas -178 nestas condições (Jimenez-Osório *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2015). Durante estudo realizado em 2015, por Wang e colaboradores, em 2174 indivíduos, sendo 879 diagnosticados com DMT2, foi demonstrado que a maior frequência do genótipo A/A esteve relacionada a uma menor capacidade antioxidante total (SOD, GPx e catalase) e avaliação inferior no índice de função das células β com maior perfil de resistência à insulina. Tal resultado converge com a variação alélica -178A demonstrada como provável fator de risco à cirrose provocada durante a infecção pelo HCV, uma vez que Wang e colaboradores (2015), também demonstraram que a frequência do alelo A foi significativamente maior ($p = 0,019$) em indivíduos com DMT2 (29,4%), em comparação com indivíduos saudáveis (26,1%), identificando que indivíduos com o genótipo A/A tiveram um risco significativamente maior de desenvolver DMT2 (OR 1,56; IC 95% 1,11, 2,20; $p = 0,011$), em comparação àqueles com o genótipo G/G, mesmo considerando os fatores de risco conhecidos para DM2.

Após estudo que avaliou o papel do Nrf2 durante o estresse oxidativo no cancer de mama em 85 mulheres egípcias (41 malignos e 44 benígnos), foi demonstrado que o genótipo A/A para o SNP rs6721961 pode estar relacionado ao aparecimento precoce do câncer de mama (Al Azhary *et al.*, 2016). Alguns anos antes, Okano e colaboradores (2013) já haviam correlacionado a frequência da variante genotípica -178A como estatisticamente relevante ($p = 0,014$) à suscetibilidade ao adenocarcinoma pulmonar em mulheres, com frequência quatro vezes maior em comparação aos homens, sendo sugerido como um biomarcador genético para avaliar a sobrevida geral nestes casos.

Alam e colaboradores (2015), já haviam relatado que o SNP rs6721961, do promotor gênico *NFE2L2*, também havia apresentado associação significativa com efeitos tardios induzidos por radiação em mais de 90% dos afro-americanos participantes

do estudo, em comparação aos brancos. Vale ressaltar que tais variações descritas em diversos estudos sobre o genótipo -178, do promotor gênico *NFE2L2*, apresentam resultados expressos tanto como potencial fator de risco, quanto de proteção à algumas doenças. Entre os quais, em estudo levantado por Ungvari e colaboradores, em 2012, no qual a presença do alelo -178G foi considerado como uma tendência à proteção contra asma induzida por infecções em uma população de crianças asmáticas na Hungria. O que corrobora com os resultados encontrados neste estudo, onde a presença do alelo -178G (G/G) foi estatisticamente menor ($p = 0,0360$) entre os pacientes com DHA (41,3%) e no HCV (11,1%), comparado ao alelo -178A, figurando como um provável fator de proteção contra essas condições de cirrose crônicas.

Além disso, assim como demonstrado em estudos que avaliaram os genótipos do SNP rs35652124 (-214 A/G), também foi observado que o alelo -178A não esteve associada apenas à potencial de risco e de suscetibilidade em diferentes doenças, assim como, o alelo -178G somente como fator de proteção, como por exemplo, em estudo relatado por Marzec e colaboradores, em 2015, onde a presença do alelo -178G foi associado ao aumento no risco de lesão pulmonar aguda em europeus e afro-americanos. E por Sampath e colaboradores, no mesmo ano (2015), que demonstraram a correlação da variação genotípica G/G como estatisticamente significativa ($p < 0,01$) à displasia broncopulmonar grave em recém nascidos com baixo peso.

Apesar de não terem havido quaisquer estudos correlacionando os SNPs rs35652124 (-214 A/G) e rs6721961 (-178 A/G) aos efeitos crônicos na DHA, foi possível observar que quando avaliados, os mesmos demonstram íntima relação com diversas doenças e condições clínicas relevantes, e que na sua maioria a variação genotípica envolvendo a frequência alélica A para ambos SNPs, têm se mostrado um potencial fator de risco e de suscetibilidade à inúmeros casos envolvendo as mais variadas doenças, assim como, a variação genotípica envolvendo o alelo G (também para ambos os SNPs) que esteve associado, em maior parte, à um fator de proteção contra essas doenças. Dados estes que colaboram com os achados inéditos revelados neste estudo, em que a frequência alélica -214A também esteve associado como um proposto biomarcador genético à cirrose causada durante a DHA, enquanto que -214G, como um possível fator de proteção. Vale ressaltar que além disso, a presença da frequência alélica -178A esteve presente em condições cirróticas na infecção crônica pelo HCV em comparação à DHA, o que se assemelha à diversas variações genotípicas neste SNP que apresentaram o mesmo perfil de risco em outras doenças crônicas relatadas nos estudos citados e em diversos outros.

6.3.3 Avaliação do SNPs rs4893819 (-1275 G/A) na DHA

O terceiro e último polimorfismo avaliado neste estudo foi o SNP rs4893819 (-1275 G/A), na posição -1275 da região promotora do gene *NFE2L2*. Contudo, em nenhuma das variações genóticas investigadas para todas as combinações de correlação entre os grupos, demonstrou resultados significativos entre a condição de cirrose causada durante a DHA e os demais grupos relacionados, conforme está sendo representado nas Tabelas 9 a 12.

O SNP rs4893819 está localizado na posição chr2: 177266406 (GRCh38.p12) da região promotora do gene *NFE2L2*, com variação genotípica G/A e uma elevada frequência populacional. Contudo, apesar da elevada frequência na população, este polimorfismo nunca foi descrito em nenhum ensaio como tendo relevância clínica à nenhuma doença correlacionada (*National Center for Biotechnology Information (NCBI)* – SNP: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>> Acessado em janeiro de 2021).

Devido a sua elevada frequência populacional e uma possível correlação inédita com condição clínica estatisticamente relevante, o SNP rs4893819 foi eleito entre os três polimorfismos avaliados neste estudo. Entretanto, não foi observada qualquer correlação estatisticamente relevante entre as variações genóticas -1275 à DHA, mantendo este SNP como ainda não relacionado às condições clínicas ou doenças conhecidas.

Tabela 9: Frequência alélica e genotípica entre todos os grupos – SNP rs4893819

Alelo	DHA <i>n (%)</i>		HCV <i>n (%)</i>		Controle <i>n (%)</i>		p valor
A/A	10	22,7	4	28,6	4	22,2	0,9786
G/G	22	50,0	7	50,0	10	55,6	
G/A	12	27,3	3	21,4	4	22,2	
Total	44	100,0	14	100,0	18	100,0	
A/A	10	22,7	4	28,6	4	22,2	0,9001
G/G_G/A	34	77,3	10	71,4	14	77,8	
Total	44	100,0	14	100,0	18	100,0	
A/A_G/A	22	50,0	7	50,0	8	44,4	0,9211
G/G	22	50,0	7	50,0	10	55,6	
Total	44	100,0	14	100,0	18	100,0	
A	32	36,4	11	39,3	12	33,3	0,8868
G	56	63,6	17	60,7	24	66,7	
Total	88	100,0	28	100,0	36	100,0	

Tabela 10: Frequência alélica e genotípica entre DHA e controle - SNP rs4893819

Alelo	DHA <i>n</i> (%)		Controle <i>n</i> (%)		p valor
A/A	10	22,7	4	22,2	0,9060
G/G	22	50,0	10	55,6	
G/A	12	27,3	4	22,2	
Total	44	100,0	18	100,0	
A/A	10	22,7	4	22,2	0,9663
G/G_G/A	34	77,3	14	77,8	
Total	44	100,0	18	100,0	
A/A_G/A	22	50,0	8	44,4	0,6953
G/G	22	50,0	10	55,6	
Total	44	100,0	18	100,0	
A	32	36,4	12	33,3	0,7489
G	56	63,6	24	66,7	
Total	88	100,0	36	100,0	

Tabela 11: Frequência alélica e genotípica entre DHA e HCV - SNP rs4893819

Alelo	DHA <i>n</i> (%)		HCV <i>n</i> (%)		p valor
A/A	10	22,7	4	28,6	0,8715
G/G	22	50,0	7	50,0	
G/A	12	27,3	3	21,4	
Total	44	100,0	14	100,0	
A/A	10	22,7	4	28,6	0,6691
G/G_G/A	34	77,3	10	71,4	
Total	44	100,0	14	100,0	
A/A_G/A	22	50,0	7	50,0	1,000
G/G	22	50,0	7	50,0	
Total	44	100,0	14	100,0	
A	32	36,4	11	39,3	0,7804
G	56	63,6	17	60,7	
Total	88	100,0	28	100,0	

Tabela 12: Frequência alélica e genotípica entre HCV e controle - SNP rs4893819

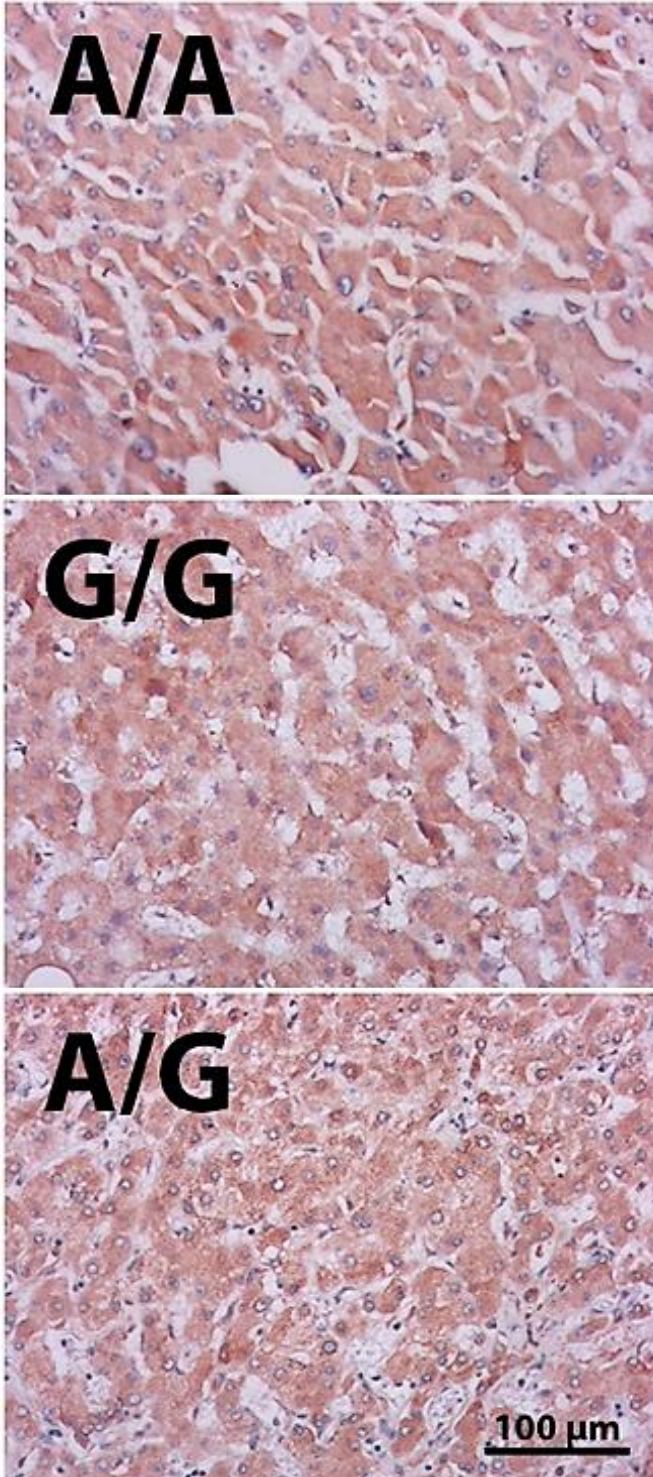
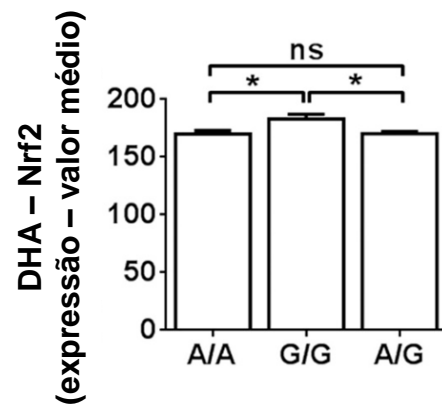
Allele	HCV n (%)		Control n (%)		p value
A/A	4	28,6	4	22,2	0,9222
G/G	7	50,0	10	55,6	
G/A	3	21,4	4	22,2	
Total	14	100,0	18	100,0	
A/A	4	28,6	4	22,2	0,6914
G/G_G/A	10	71,4	14	77,8	
Total	14	100,0	18	100,0	
A/A_G/A	7	50,0	8	44,4	0,7602
G/G	7	50,0	10	55,6	
Total	14	100,0	18	100,0	
A	11	39,3	12	33,3	0,6225
G	17	60,7	24	66,7	
Total	28	100,0	36	100,0	

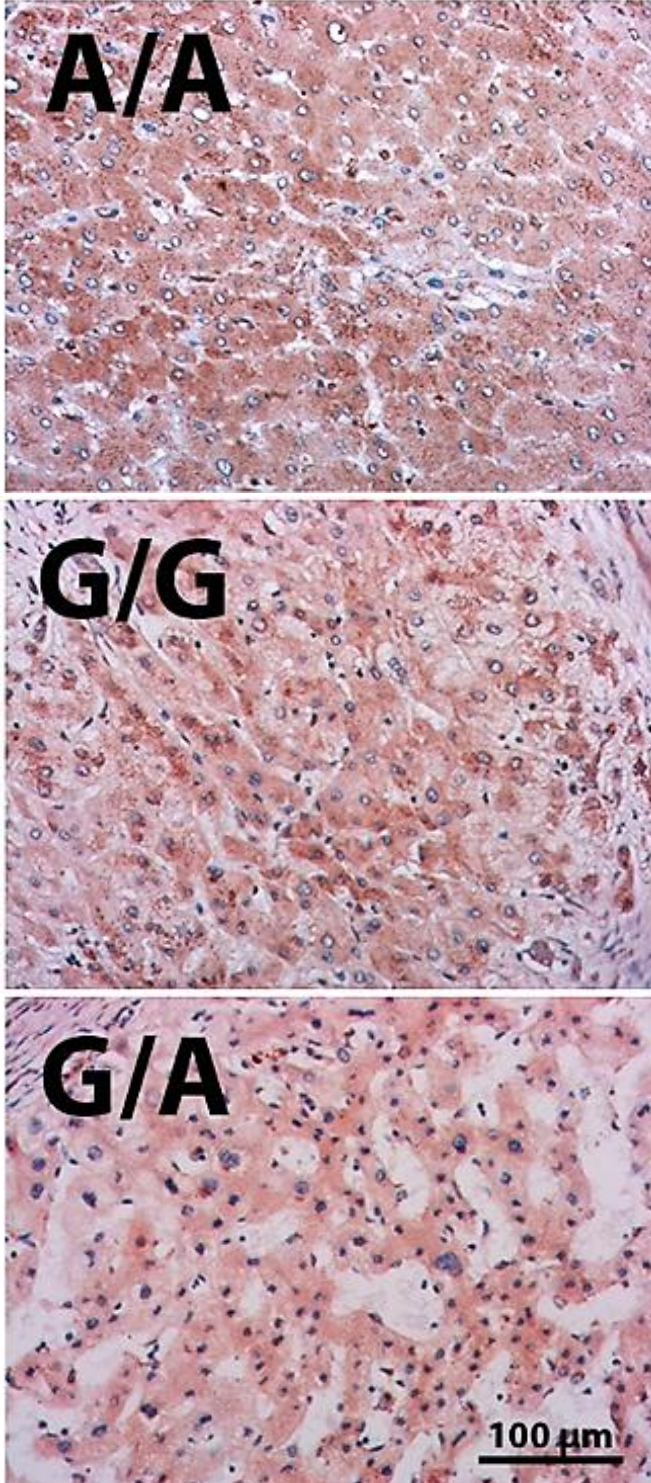
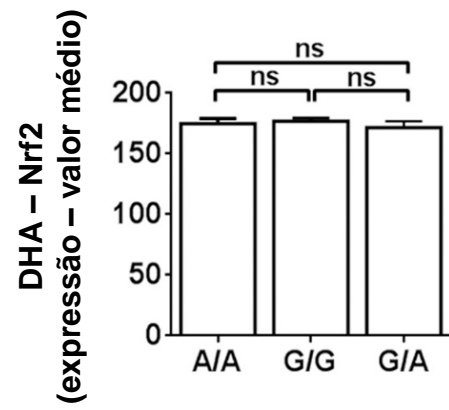
6.4 ASSOCIAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DOS SNPs E DOS NÍVEIS DE EXPRESSÃO DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO NRF2 AOS DADOS CLÍNICOS NA DHA

Após avaliar a correlação entre os SNPs da região promotora do gene *NFE2L2*, responsável por codificar o fator de transcrição Nrf2, à DHA e identificar associação significativa em variações genotípicas para o polimorfismo neste gene (-274 e -178), foi avaliada a relação entre os SNPs e os níveis de expressão do Nrf2 para cada um dos polimorfismos analisados, e correlacionados aos dados clínicos na DHA em comparação aos pacientes doadores e os infectados pelo HCV.

Como foi observado que as variações genotípicas contendo o alelo A (A/A e A/G) e G (G/G), do SNP rs35652124, na região promotora do gene *NFE2L2* estão associados à cirrose durante a DHA, foi analisado se este polimorfismo se correlaciona diretamente aos níveis de expressão do Nrf2 no fígado em comparação aos demais SNPs avaliados.

Para investigar esta associação foi realizada IHC nas amostras envolvendo os casos de DHA e comparados entre os SNPs rs35652124, rs4893819 e rs6721961, conforme demonstrado na Figura 16.

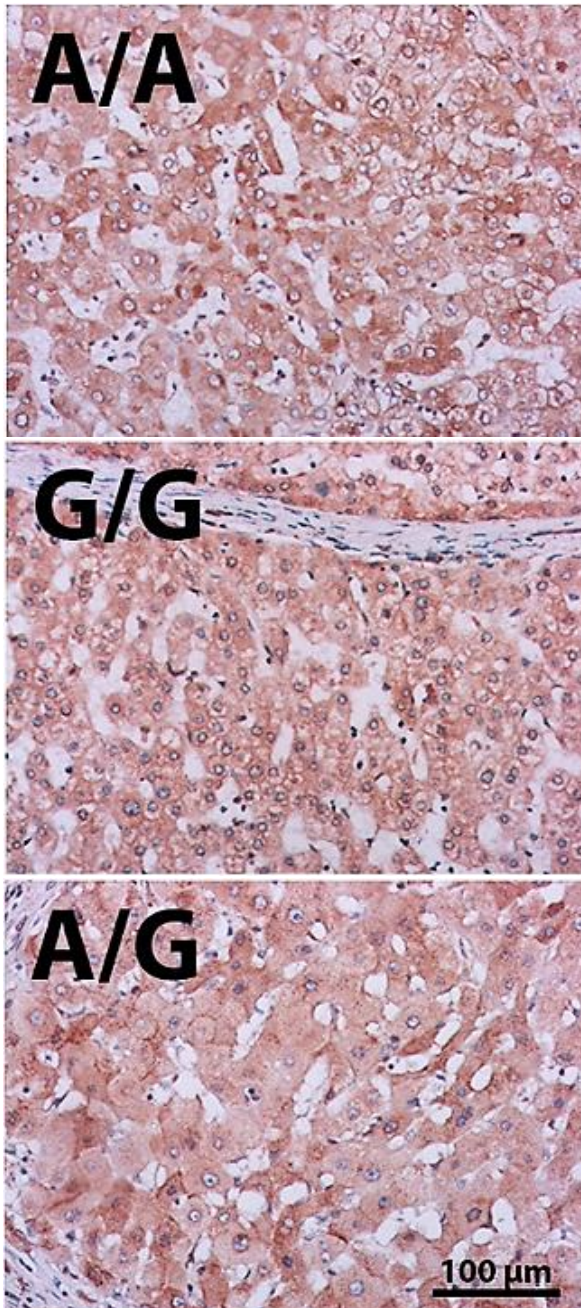
SNP rs35652124**A** DHA**B**

SNP rs4893819**C****DHA****D**

SNP rs6721961

E

DHA



F

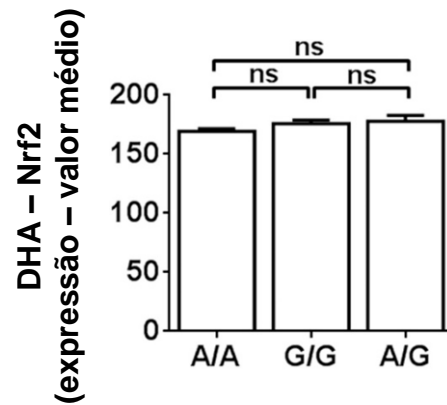


Figura 16: Avaliação dos níveis de imunomarcação do fator de transcrição Nrf2, nos diferentes SNPs de promotor do gene *NFE2L2* em pacientes com cirrose associada a DHA. (A) Corte histológico de tecido hepático humano para análise IHC do Nrf2 nos genótipos dos SNPs rs35652124, (C) rs4893819 e (E) rs6721961. (B) quantificação dos níveis de expressão do Nrf2 (valor médio) nos genótipos do SNP rs35652124, (D) rs4893819 e (F) rs6721961. Houve maior nível significativo no genótipo -274 G/G comparado aos genótipos -274 A/A e -274 A/G ($p < 0,05$).

Fonte: Santos *et al.*, 2020.

Foi observado que os níveis de expressão do Nrf2 foi significativamente maior ($p < 0,05$) nos casos exibindo o genótipo -274G/G do que nos genótipos -274A/A e -274A/G (G/G = 183.1 ± 3.9 ; A/A = 170.1 ± 2.9 ; A/G = 70.3 ± 1.9), (Figura 16 A, B). Isto sustenta a observação de que o alelo -274A, tanto em homozigose (A/A) quanto heterozigose (A/G), atue como possível fator de risco para a DHA, enquanto a variação genotípica -274G/G seja um provável fator protetor contra esta doença, uma vez que a síntese do fator de transcrição Nrf2 também está envolvida nos mecanismos de proteção celular contra a exposição à espécies de oxigênio reativos no estresse oxidativo (Covas *et al.*, 2013; Purdom-Dickinson *et al.*, 2007).

Quando avaliados os SNPs rs4893819 (Figura 15 C, D) e rs6721961 (Figura 16 E, F), não foi observada nenhuma correlação significativa ($p > 0,05$) dos níveis de expressão do Nrf2 entre as variações genotípicas apresentadas em cada um destes SNPs.

Entre as principais funções do fator de transcrição Nrf2 definidas em estudos na última década, está o seu papel na proteção contra o estresse oxidativo (Qiang, 2013).

Na DHA, o consumo crônico de álcool eleva a produção de agentes oxidativos associados ao desenvolvimento da DHA, onde o dano oxidativo hepático induzido pelo álcool conduz ao esgotamento dos agentes antioxidantes, um sistema essencial de proteção contra a hepatotoxicidade alcoólica (Wu e Cederbaum, 2009).

Estudos tem demonstrado que a ativação de Nrf2 em modelos animais os protege das lesões induzidas pelo álcool (Kumar *et al.*, 2011; Dong J, Sulik KK, Chen, 2008). Em contra partida, camundongos silenciados para Nrf2 (*knockout* - KO), demonstraram que a ausência de expressão deste fator de transcrição aumentou significativamente a suscetibilidade destes animais a uma ampla variedade de toxicidades químicas e de doenças associadas à patologias oxidativas (Walters e Cho, 2008; Kensler *et al.*, 2007; Motohashi e Yamamoto, 2004). Semelhantes à este, trabalhos envolvendo camundongos KO para Nrf2 apresentam maior tendência à desenvolverem lesões autoimunes e atividade inflamatória em diferentes tecidos, inclusive hepático, onde camundongos KO para Nrf2 foram mais sensíveis aos efeitos hepáticos por estresse inflamatório após exposição aguda a agentes ambientais e drogas (Kensler; Wakabayashi; Biswal, 2007; Ma; Battelli; Enomoto, 2006; Yoh *et al.*, 2001). Incluindo estudos que utilizaram doses não tóxicas de agentes hepatotóxicos em camundongos KO para Nrf2, os quais apresentaram elevação na atividade sérica de ALT, lesão hepatocelular grave e até morte por insuficiência hepática. Inversamente, o aumento da atividade do Nrf2 induzida por agentes estimuladores ou por manipulação genética, evidenciou a inibição da efetividade

hepatotóxica do acetomifeno nestes animais (Reisman et al., 2009; Okawa et al., 2006; Chan; Han; Kan, 2001; Enomoto et al., 2001).

Apesar da ausência de estudos que relatem especificamente sobre a associação entre os níveis do fator de transcrição Nrf2 aos SNPs analisados neste trabalho, podemos considerar através de estudos semelhantes aos supracitados, que a menor expressão dos níveis do Nrf2 observado nas variações genotípicas -274A/A e -274A/G esteja de fato associado à uma diminuição da atividade antioxidante hepática mediada por Nrf2 durante a indução alcoólica crônica, levando à um desfecho mais grave durante a DHA, assim como, o genótipo -274G/G seja um potencial fator genético de proteção contra o estresse oxidativo induzido pelo uso crônico de etanol, uma vez que esta variação esteve associada a um maior nível de expressão do fator de transcrição Nrf2 na DHA.

Após avaliar a correlação entre os níveis de expressão do fator de transcrição Nrf2 aos polimorfismos avaliados neste estudo, foi analisada por IHC a associação entre os SNPs na região promotora do gene *NFE2L2* aos achados histológicos quanto à atividade inflamatória na DHA em estagio crônico.

A DHA crônica pode ser dividida em diferentes estágios de acordo com o nível de fibrose e atividade inflamatória (Shasthry *et al.*, 2018). Como todos os casos envolvendo a DHA e o HCV apresentaram maior índice de fibrose, foi pontuada a atividade inflamatória quanto as variáveis estágio, número de casos e correlação entre os SNPs e suas variações genotípicas (Tabela 13).

Tabela 13: SNPs comparados à atividade inflamatória na DHA

Genótipo	A/A				G/G				A/G			
	A0	A1	A2	A3	A0	A1	A2	A3	A0	A1	A2	A3
rs35652124	1	6	5	1	1	3	2	1	3	6	5	3
Total	13				7				17			
rs6721961	1	3	3	2	1	7	5	2	2	7	3	1
Total	9				15				13			
	G/A											
rs4893819	0	5	2	1	2	6	6	2	1	4	4	1
Total	8				16				10			

Legenda: A0 = ausente, A1 = leve, A2 = moderado, A3 = Grave

A avaliação da correlação entre os SNPs na DHA e a atividade inflamatória considerou os parâmetros METAVIR, no qual A0 significa ausência de atividade inflamatória, A1 significa atividade inflamatória leve, A2 significa atividade inflamatória moderada e A3 significa atividade inflamatória grave.

Houve maior atividade inflamatória nas amostras de DHA nos genótipos A/A e A/G do SNP rs35652124 em comparação aos demais. Por outro lado, a maioria dos casos envolvendo a variação genotípica -274G/G apresentou atividade inflamatória atenuada. A correlação entre o polimorfismo e a atividade inflamatória não foi observada nos SNPs rs6721961 e rs4893819. Para o SNP rs6721961, o qual o alelo -178A esteve relacionada como fator de risco a um maior dano hepático crônico, houve ausência de correlação entre este polimorfismo e a atividade inflamatória. Da mesma forma, a ausência de correlação entre o polimorfismo e a atividade inflamatória também foi observada no SNP rs4893819.

Os resultados sugerem que a variante genotípica -274A, da região promotora do gene *NEF2L2*, está associada a uma pior atividade inflamatória na cirrose durante a DHA, uma vez que esta variação, tanto homocigoto (A/A) quanto heterocigoto (A/G) expressou um maior número de casos envolvendo atividade inflamatória durante a DHA.

Para expressar melhor estes resultados, foram ilustradas as análises histológicas e representadas em gráficos de acordo com a atividade inflamatória e sua correlação com os polimorfismos, conforme observado na Figura 17.

Com base no papel citoprotetor desempenhado pelo fator de transcrição Nrf2 contra o estresse oxidativo, diversos estudos já correlacionaram a íntima associação entre a expressão do Nrf2 e SNPs envolvidos à sua expressão gênica, à patogênese da inflamação no desenvolvimento de diferentes doenças inflamatórias (Shin *et al.*, 2019; Cho *et al.*, 2015). Entre elas, Córdova e colaboradores (2010), demonstraram não apenas que Nrf2, mas também que SNPs neste fator citoprotetor, esteve associado à um risco maior na disfunção renal durante o lúpus eritematoso sistêmico, doenças autoimune associada ao estresse oxidativo e caracterizada por inflamação crônica.

Apesar do Nrf2 apresentar atividade que varia dependendo dos estimuladores, tipo celular e da patologia, sua participação na sinalização antioxidante induzido durante a inflamação claramente regula a atividade antioxidante nestes processos (Qiang, 2013). Apesar dos mecanismos exatos pelos quais Nrf2 atua durante a inflamação, a inibição da inflamação por Nrf2 está associada à inibição da via mediada por NF- κ B e da produção de citocinas pró-inflamatórias, do contrário, a inflamação é normalmente observada em doenças com deficiência do Nrf2 (Qiang, 2013; Lí *et al.*, 2008; Ma *et al.*, 2003).

INFLAMAÇÃO

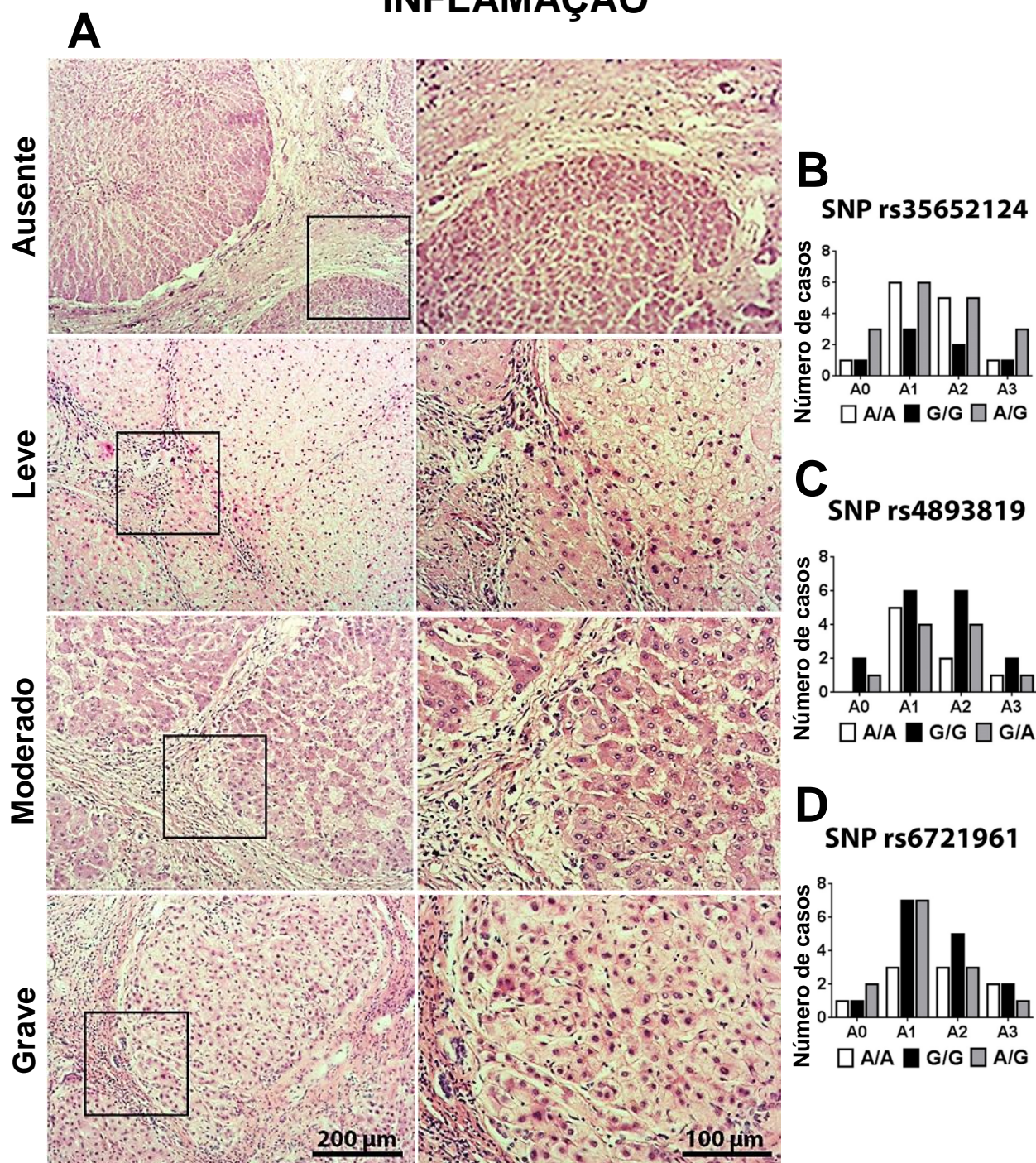


Figura 16: Score de atividade inflamatória nos diferentes polimorfismos da região promotora do gene NFE2L2 na cirrose durante a DHA. (A) atividade inflamatória e (B) número de casos de acordo com score de atividade inflamatória para o SNP rs35652124, (C) para o SNP rs4893819 e (D) para o SNP rs6721961 (n = 37 casos para o SNP rs35652124; n = 37 casos para o SNP rs6721961; e n = 34 para o SNP rs4893819), demonstrando maior atividade inflamatória para o alelo -274A (A/A e A/G), sugerido que tais genótipos estejam associados também a uma maior atividade inflamatória na cirrose causada pela DHA.

Fonte: Santos *et al.*, 2020.

No DMT2, doença inflamatória provavelmente influenciada pelos níveis de expressão celular de genes envolvidos nas respostas antioxidantes, variantes genéticas associadas à expressão celular do fator de transcrição Nrf2 os níveis de expressão deste fator de transcrição é inversamente correlacionado ao risco de desenvolvimento de DMT2 na população. Jiménez-Osorio e colaboradores (2016), demonstraram que os níveis de expressão do fator de transcrição Nrf2 esteve diminuído e sua capacidade em reduzir o estresse oxidativo no DMT2 e na obesidade foi prejudicada, correlacionando polimorfismos relacionados a este gene e seus níveis de expressão celular ao DMT2 e obesidade. Mais recentemente, Shin e colaboradores (2019), demonstraram que seis SNPs associados à expressão celular do Nrf2 foram associados à um maior risco à DMT2 ($p = 0,003$). No fígado, genes citoprotetores e de processamento de drogas, entre os quais Nrf2, apresentam importante papel durante a atividade inflamatória, onde a deficiência ou o polimorfismo genético nestes genes podem agravar a inflamação e a disfunção hepática (Lu; Lei; Zhang, 2019).

Está mais que clara a importância do fator de transcrição Nrf2 na defesa celular contra o estresse oxidativo induzido durante a atividade inflamatória, em que a deficiência ou ausência dos níveis de expressão do Nrf2, assim como, variantes genéticas neste fator de transcrição, estejam correlacionados à uma maior gravidade nas patologias associadas, sendo demonstrado neste estudo onde o SNP rs35652124, associado ao alelo A (A/A e A/G), identificado como potencial fator de risco à cirrose durante a DHA, esteja associado à uma maior atividade inflamatória uma vez que esteve correlacionado a um menor nível do fator de transcrição Nrf2 na doença hepática induzida pelo consumo crônico de etanol.

Após analisar a correlação dos níveis de expressão do Nrf2 entre os SNPs da região promotora do gene *NFL2E2*, e observar a correlação entre as variações genotípicas dos SNPs à atividade inflamatória na DHA, foi realizada uma análise para avaliar se existe correlação entre as variações genotípicas dos SNPs na DHA aos dados clínicos dos casos investigados.

Inicialmente foram comparados os dados clínicos entre os casos controle, HCV e DHA quanto as variáveis sexo, idade e diagnósticos laboratoriais (Tabela 14).

Foi possível observar que em todos os casos a frequência foi maior no sexo masculino do que nas mulheres, com faixa etária entre os 49 aos 57 anos, com destaque à DHA que apresentou média de 55 anos. Entre as variáveis laboratoriais houve ausência de diferença na correlação entre os grupos envolvendo os casos de HCV e DHA, uma vez que a média dos resultados nos exames laboratoriais envolvendo os dois grupos foi

elevada em ambos (HCV > ALT = 98,38; AST = 106,39; Gama GT = 134,3; Bilirrubina direta = 1,47; LDH = 476,62. DHA > MELD = 16,51; Bilirrubina total = 3,37; Bilirrubina indireta = 1,98; ALP = 173,59; Albumina = 3,2; Uréia = 33,7; Creatinina = 1,4).

Tabela 14: Apresentação dos dados clínicos entre os grupos.

	Controle (n = 49)	HCV (n = 18)	DHA (n = 21)
M %	25	81,25	97,68
F %	75	18,75	2,32
Idade	49,5	57,87	53,62
MELD	7,75	14,3	16,51
ALT	20,5	98,38	41,26
AST	39,75	106,39	62,82
Gama GT (GGT)	64,5	134,3	125,96
Fosfatase alcalina (ALP)	110,25	156,91	173,59
Bilirrubina total (BT)	0,57	3,28	3,37
Bilirrubina direta (BD)	0,25	1,47	1,42
Bilirrubina indireta (BI)	0,32	1,81	1,98
LDH	-	476,62	439,25
Albumina	-	3,17	3,2
RNI	-	1,5	1,67
Ureia (UR)	31,75	23,9	33,7
Creatinina (CR)	0,91	0,77	1,04

Legenda: M = masculino, F = feminino = MELD = modelo para doença hepática terminal, LDH = lactato desidrogenase, RNI = razão normalizada internacional.

Finalmente, quando foram associados os dados clínicos e laboratoriais às variações genotípicas do fator de transcrição Nrf2 na DHA, foi observado que não houve correlação para os SNPs rs35652124 e rs4893819 entre os dados apresentados (Tabela 15), exceto quanto a idade ($p < 0,0482$) e de fosfatase alcalina ($p < 0,0235$) para o SNP rs6721961, onde o valor médio foi maior para o genótipo -178A/A (267,62) em comparação aos genótipos -178A/G (126,5) e -178G/G (146,1).

Em 2013, Kasztelan-Szczerbinska e colaboradores avaliou 116 pacientes (62,1% homens e 37,9% mulheres), entre 28 e 69 anos (média de $49,4 \pm 10,7$), quanto aos fatores de risco relevantes ao prognóstico na DHA durante a HA, entre os quais o modelo de parâmetro de prognóstico MELD, o RNI, idade, bilirrubina, creatinina, entre outros, não encontrando diferenças estatísticas significativas entre os parâmetros e os dados clínicos

analisados. Porém, foi observado que os níveis de ALP foram três vezes superior ao limite máximo da normalidade, sugerindo que ALP represente um impacto independente na sobrevivência de pacientes com HA. Tais resultados se assemelham aos achados deste estudo, uma vez que a maioria dos casos de DHA também envolveu pacientes do sexo masculino (97,68%), com idade média de 55 anos e com ausência de diferenças significativas entre as variáveis clínicas analisadas, com exceção da ALP, quando associada à variação genotípica -178A/A (267,62), conforme demonstrado na Tabela 15 ($p = 0,0235$).

Mais recentemente, Kong e colaboradores (2019), relataram que os testes de função hepática estão entre os métodos mais comuns para auxiliar no diagnóstico da DHA, uma vez que, geralmente (70% a 80%), os níveis de AST e ALT podem estar no mínimo o dobro (ou até 8 vezes) maior em comparação à uma pessoa saudável. Neste mesmo ano, Avila e colaboradores (2019), destacaram que os níveis de AST, por exemplo, podem representar um significado importante na avaliação de cortes histopatológicos de tecido hepático em pacientes assintomáticos e não-graves na DHA durante a HA. Entretanto, apesar dos marcadores séricos poderem ser utilizados para avaliar a função hepática no consumo de álcool, tais marcadores, como por exemplo a GGT, são menos úteis nos casos envolvendo doença hepática, uma vez que os níveis podem estar elevados em pacientes com extensa fibrose, independente da causa ou após longo período de abstinência alcoólica, isto é, estes marcadores não podem diagnosticar especificamente a causa do dano hepático (obesidade, indução alcoólica, etc.) (Avila *et al.*, 2019; Kong *et al.*, 2019). Desta forma, a avaliação da DHA não deve depender apenas de um único método de diagnóstico, mas de uma reflexão sobre o histórico de consumo alcoólico, testes laboratoriais, de imagem e a utilização de algoritmos os quais contribuem para a detecção precoce de fibrose avançada e CHC (Dang *et al.*, 2019). Kong e colaboradores, em 2019, ressaltaram a importância da combinação de testes para avaliação da gordura ou fibrose hepática, em que indicadores bioquímicos (GGT, AST e ALT) podem melhorar a precisão de testes (*FibroTest* e o *SteatoTest*), segundo a OMS.

Os resultados apresentados nas Tabela 14 e 15, quanto à correlação entre os dados clínicos em cada grupo e as variações genotípicas dos SNPs na DHA, podem refletir a natureza do estágio final dos casos envolvendo a DHA e o HCV, uma vez que todos os pacientes tinham cirrose e necessidade de transplante de fígado, entre os quais, nos casos envolvendo a DHA, que se encontravam em abstinência alcoólica por pelo menos 6 meses. Segundo Dang e colaboradores, em 2019, “*intervenções destinadas a reduzir o consumo de álcool podem levar à reversibilidade da lesão hepática*”.

Em resumo, os resultados apresentados nesta última seção (item 6.4) demonstraram que o SNP rs35652124, apresentado como provável fator de risco à DHA na fase cirrótica (-214A/A e A/G), também esteve associado significativamente à uma menor expressão do fator de transcrição Nrf2 nos casos envolvendo a DHA para as mesmas frequências alélicas do SNP rs35652124. Além disso, foi demonstrado também que o alelo -214A (A/A e A/G) esteve associado a uma maior atividade inflamatória na cirrose causada durante a DHA, mas sem correlação entre os dados clínicos e laboratoriais para este SNP na DHA, entre os quais, os 3 casos que apresentaram translocação nuclear do fator de transcrição Nrf2 em cortes histológicos de tecido hepático na DHA, identificado por IHC (seção 6.2.3; Figura 14), pertenciam à variação genotípica -214A/A (2 casos) e -214A/G (1 caso).

Table 15: Genótipos dos SNPs comparados aos dados clínicos na DHA.

Alelo		DHA - SNP rs35652124 (-214 A/G)														
	M %	F %	Idade	MELD	ALT	AST	GGT	BT	BD	BI	ALP	LDH	ALB	RNI	UR	CR
A/A	94,45	5,55	53,61 (2,057)	16,54 (1,101)	46,25 (11,02)	76,91 (19,03)	114,75 (21,65)	3,26 (0,3964)	1,20 (0,2407)	2,05 (0,3092)	214,2 (39,73)	460,23 (48,82)	3,12 (0,1612)	1,68 (0,0984)	27,77 (2,699)	1,04 (0,183)
G/G	100	0	55,25 (3,304)	16 (0,7559)	51,71 (4,46)	77,34 (13,1)	212 (56,35)	3,43 (0,5941)	1,68 (0,505)	1,79 (0,1932)	191,3 (51,58)	468,6 (57,1)	3,07 (0,1686)	1,48 (0,085)	34,72 (4,387)	0,95 (0,112)
A/G	100	0	52,21 (2,924)	17 (1,075)	30,47 (5,188)	39,93 (4,364)	88,34 (27,72)	3,36 (0,5608)	1,42 (0,4408)	2,04 (0,2102)	125,63 (16,44)	421,02 (46,45)	3,25 (0,1566)	1,82 (0,1526)	38,04 (3,144)	0,99 (0,068)
p value	-	-	0,7761	0,8396	0,2224	0,1226	0,0514	0,9742	0,6619	0,7853	0,1928	0,8082	0,7287	0,2295	0,0643	0,9129
		DHA - SNP rs4893819 (-1275 G/A)														
	M %	F %	Idade	MELD	ALT	AST	GGT	BT	BD	BI	ALP	LDH	ALB	RNI	UR	CR
A/A	88,89	11,11	48,33 (2,809)	16,66 (0,8028)	46,2 (5,275)	60,05 (11,8)	112,63 (39,07)	3,26 (0,439)	1,3 (0,2762)	2 (0,2608)	159,2 (23,81)	421,44 (40,07)	3,01 (0,04)	1,56 (0,0898)	26,76 (5,056)	1,36 (0,321)
G/G	100	0	53 (2,282)	16,71 (1,029)	44,87 (8,916)	70,73 (15,51)	118,7 (20,65)	3,24 (0,417)	1,2 (0,2856)	2,03 (0,2483)	151,06 (18,09)	468,6 (47,46)	3,10 (0,149)	1,81 (0,1171)	29,85 (3,431)	0,9 (0,074)
G/A	100	0	59 (2,967)	16,86 (1,487)	36 (10,75)	55,67 (15,92)	180 (79,48)	3,71 (0,5114)	1,63 (0,4826)	1,89 (0,3667)	268,3 (79,75)	443,6 (75,63)	3,47 (0,2327)	1,56 (0,1429)	35,45 (5,895)	1,51 (0,107)
p value	-	-	0,0563	0,9946	0,7944	0,8009	0,5107	0,7671	0,7181	0,9516	0,1054	0,8480	0,2425	0,2825	0,6952	0,1259
		DHA - SNP rs6721961 (-178 A/G)														
	M %	F %	Idade	MELD	ALT	AST	GGT	BT	BD	BI	ALP	LDH	ALB	RNI	UR	CR
A/A	90	10	56,5 (3,212)	16,63 (1,101)	39,5 (7,058)	72,75 (10,37)	158,71 (60,2)	3,64 (0,3599)	1,63 (0,3632)	2,03 (0,3692)	267,62 (68,49)	381,42 (58,18)	3,3 (0,184)	1,5 (0,1257)	37 (4,687)	1,32 (0,269)
G/G	100	0	49,71 (1,957)	15 (0,7977)	40,18 (5,564)	58,94 (8,13)	115,7 (21,53)	2,63 (0,3742)	0,93 (0,1771)	1,87 (0,2752)	146,1 (16,06)	471,01 (49,53)	3,07 (0,1274)	1,7 (0,107)	32,04 (3,942)	0,84 (0,051)
A/G	100	0	57,14 (2,344)	17,36 (1,002)	43,73 (11,83)	59,85 (21,59)	120,5 (33,98)	3,74 (0,5585)	1,69 (0,4554)	1,92 (0,181)	126,5 (19,45)	470,8 (47,57)	3,18 (0,198)	1,68 (1,1344)	34,19 (2,451)	0,97 (0,086)
p value	-	-	0,0482	0,1959	0,9359	0,7991	0,7017	0,1677	0,2381	0,9141	0,0235	0,4332	0,6492	0,5050	0,6612	0,0623

7. CONCLUSÃO

Em conclusão, o referido estudo demonstrou que a indução alcoólica crônica na DHA, de fato, compromete os níveis da expressão do ITPR3 em colangiócitos, sugerindo que este evento seja seletivo à condição da DHA, uma vez que durante a infecção pelo HCV (outra condição de agressão hepática crônica), não ocorra o comprometimento na expressão do ITPR3 em colangiócitos. Além disso, foram apresentadas evidências de que variações genótípicas na região promotora do gene *NFE2L2*, seja um potencial biomarcador genético de suscetibilidade e progressão na DHA, uma vez que o alelo -214A (A/A e A/G), do SNP rs35652124, parece contribuir para a patogênese da cirrose na DHA, sendo associado à uma menor expressão do fator de transcrição Nrf2 e à uma maior atividade inflamatória hepática induzida pelo álcool.

Entretando, se faz necessário mais estudos que possam esclarecer por quais mecanismos, e se de fato, Nrf2 regula negativamente a expressão dos níveis de de expressão do ITPR3 em conlangiócitos durante a DHA.

REFERÊNCIAS

- Ahmad, S.F; Ansari, M.A; Zoheir, K.M.A; Bakheet, S.A; Korashy, H.M; Nadeem, A; Ashour, A.E; Attia, S.M. **Regulation of TNF- α and NF- κ B activation through the JAK/STAT signaling pathway downstream of Histamine 4 receptor in a rat model of LPS-induced joint inflammation.** *Immunobiology.* 2015, 220(7): 889-898.
- Al Azhary, N.M; Kamel, M.M; Ismail, Y.M; Mahmoud, A.A; Radwan, E.M. **The Role of Genetic Polymorphisms in Nrf2 and P73 in Egyptian Women with Breast Cancer.** *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention.* 2016, 17(11), 4945-4949.
- Alam, A; Mukhopadhyay, N.D; Ning, Y.Y; Reshko, L.B; Cardnell, R.J.G; Alam, O; Rabender, C.S; Yakovlev, V.A; Walker, L; Anscher, M. S; Mikkelsen, R.B. **A Preliminary Study on Racial Differences in HMOX1, NFE2L2, and TGF β 1 Gene Polymorphisms and Radiation-Induced Late Normal Tissue Toxicity.** *International Journal of Radiation Oncology.* 2015, 93(2): 436-443.
- Almeida, J.R.S; Araújo, R.C; Castilho, G.V; Stahelin, L; Pandolfi, L.R; Silva, C.Q. **Usefulness of a new prognostic index for alcoholic hepatitis.** *Arquivos de Gastroenterologia.* 2015, 52(1): 22-26.
- Altamirano, J; Miquel, R; Katoonizadeh, A; Abraldes, J.G; Duarte-Rojo, A; Louvet, A; Augustin, S; Mookerjee, R.P; Michelena, J; Smyrk, T.C; Buob, D; Leteurtre, E; Rincon, D; Ruiz, P; Garcia-Pagan, J.C; Guerrero-Marquez, C; Jones, P.D; Barritt, A.S; Arroyo, V; Bruguera, M; Banares, R; Gines, P; Caballeria, J; Roskams, T; Nevens, F; Jalan, R; Mathurin, P; Shah, V.H; Bataller, R. **A histologic scoring system for prognosis of patients with alcoholic hepatitis.** *Gastroenterology.* 2014, 146(5): 1231-1239.
- Ambros, V. **The functions of animal microRNAs.** *Nature.* 2004, 431(2004): 350–355.
- Amini, M; Runyon, B.A. **Alcoholic hepatitis 2010: A clinician's guide to diagnosis and therapy.** *World Journal Gastroenterology.* 2010, 16(39): 4905-4912.
- Ananthanarayanan, M; Banales, J.M; Guerra, M.T; Spirli, C; Munoz-Garrido, P; Mitchell-Richards, K; Tafur, D; Saez, E; Nathanson, M.H. **Post-translational Regulation of the Type III Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor by miRNA-506.** *The Journal of Biological Chemistry.* 2015, 290(1): 184-196.
- Ananth, R. **Neonatal Cholestasis: A Primer of Selected Etiologies.** *Pediatric annals.* 2018, 47(11): 433-439.
- Anstee, Q.M; Seth, D; Day, C.P. **Genetic factors that affect risk of alcoholic and nonalcoholic fatty liver disease.** *Gastroenterology.* 2016, 150: 1728-1744.
- Arisawa, T; Tahara, T; Shibata, T; Nagasaka, M; Nakamura, M; Kamiya, Y; Fujita, H; Yoshioka, D; Okubo, M; Hirata, I; Nakano, H. **Nrf2 gene promoter polymorphism and gastric carcinogenesis.** *Hepato-gastroenterology.* 2008, 55(82 – 83): 750-754.
- Avila, M.A; Dufour, J.F; Gerbes, A.L; Zoulim, F; Bataller, R; Burra, P; Cortez-Pinto, H; Gao, B; Gilmore, I; Mathurin, P; Moreno, C; Poznyak, V; Schnabl, B; Szabo, G;

Thiele, M; Thursz, K.R. **Recent advances in alcohol-related liver disease (ALD): summary of a Gut round table meeting.** *Recent advances in clinical practice.* 2019, 0: 1-17.

Bala, S; Petrasek, J; Mundkur, S; Catalano, D; Levin, I; Ward, J; Alao, H; Kodys, K; Szabo, G. **Circulating microRNAs in exosomes indicate hepatocyte injury and inflammation in alcoholic, drug-induced and inflammatory liver diseases.** *Hepatology.* 2012, 56(5): 1946-1957.

Banales, J.M; Sáez, E; Úriz, M; Sarvide, S; Urribarri, A.D; Splinter, P; Bogert, P.S.T; Bujanda, L; Prieto, J; Medina, J.F; LaRusso, N.F. **Up-regulation of microRNA 506 leads to decreased Cl-/HCO₃⁻ anion exchanger 2 expression in biliary epithelium of patients with primary biliary cirrhosis.** *Hepatology.* 2012, 56(2): 687-697.

Bang, N.U; Iversen, K; Jagt, T; Madsen, S. **Serum glutamic oxalacetic transaminase activity in acute and chronic alcoholism.** *JAMA.* 1958, 168(2): 156-160.

Bargalló-García, A; Serra-Matamala, I; Marin-Fernández, I; Masnou-Ridaura, H; Leal-Valdivieso, C; Marcos-Neira, P; Sala-Llinars, M; Morillas-Cunill, R; Planas-Vila, R. **Prognostic factors associated with mortality in patients with severe alcoholic hepatitis.** *Revista Española de Enfermedades Digestivas.* 2013, 105(9): 513-520.

Barrio, E; Tomé, S; Rodríguez, I; Gude, F; Sánchez-Leira, J; Pérez-Becerra, E; González-Quintela, A. **Liver disease in heavy drinkers with and without alcohol withdrawal syndrome.** *Alcoholism Clinical e Experimental Research.* 2004, 28(1): 131-136.

Basra, S; Anand, B.S. **Definition, epidemiology and magnitude of alcoholic hepatitis.** *World Journal of Hepatology.* 2011, 3(5): 108-113.

Beckett, A.G; Livingstone, A.V; Hill, K.R. **Acute alcoholic hepatitis.** *British Medical Journal.* 1961: 1113-1119.

Beckett, A.G; Livingstone, A.V; Hill, K.R. **Acute alcoholic hepatitis without jaundice.** *British Medical Journal.* 1962, 580-582.

Berridge, M.J. **Inositol Trisphosphate and Calcium Signalling.** *Nature.* 1993, 361(6410): 315-325.

Bertola, A; Mathews, S; Ki, S.H; Wang, H; Gao, B. **Mouse model of chronic and binge ethanol feeding (the NIAAA model).** *Nature Protocols.* 2013, 8: 627-637.

Bertola, A; Park, O; Gao, B. **Chronic plus binge ethanol feeding synergistically induces neutrophil infiltration and liver injury in mice: a critical role for E-selectin.** *Hepatology.* 2013, 58(5): 1814-1823.

Blokker, B.A; Maijo, M; Echeandia, M; Galduroz, M; Patterson, A.M; Ten, A; Philo, M; Schunge, R; Juan, V.G; Halilbasic, E; Fuchs, C; Gall, G.G; Milkiewicz, M; Milkiewicz, P; Banales, J.M; Rushbrook, S.M; Mato, J.M; Trauner, M; Müller, M; Martínez-Chantar, M.L; Varela-Rey, M; Beraza, N. **Fine-Tuning of Sirtuin 1**

Expression Is Essential to Protect the Liver From Cholestatic Liver Disease.

Hepatology. 2019, 999-716.

Brandon-Warner, E; Schrum, L.W; Schmidt, C.M; McKillop, I.H. **Rodent models of alcoholic liver disease: of mice and men.** Alcohol. 2012, 46(8): 715-725.

Bruha, R; Dvorak, K; Petrtyl, J. **Alcoholic liver disease.** World Journal Hepatololy. 2012, 4(3): 08-90.

Caballeria, J. **Establishing prognosis in alcoholic hepatitis.** Revista Española de Enfermedades Digestivas. 2013, 105(9): 509-512.

Caballeria, J. **Epidemiological aspects of alcoholic liver disease.** Hepatology. Oxford: Blackwell Publishing. 2007: 1129-1134.

Chan, K; Han, X.D; Kan, Y.W. **An important function of Nrf2 in combating oxidative stress: detoxification of acetaminophen.** Proceedings of the National Academy of Sciences. 2001, 98(8): 4611-4616.

Chen, H; Shen, F; Sherban, A; Nocon, A; Li, Y; Wang, H; Xu, M.J; Rui, X; Han, J; Jiang, B; Lee, D; Li, N; Keyhani-Nejad, F; Fan, J.G; Liu, F; Kamat, A; Musi, N; Guarente, L; Pacher, P; Gao, B; Zang, M. **DEPTOR Suppresses Lipogenesis and Ameliorates Hepatic Steatosis and Acute-on-Chronic Liver Injury in Alcoholic Liver Disease.** Hepatology. 2018, 68(2): 496-514.

Cho, H.Y; Kleeberger, S.R. **Association of Nrf2 with airway pathogenesis: lessons learned from genetic mouse models.** Archives of Toxicology. 2015, 89(11): 1931-1957.

Cho, H.Y; Marzec, J; Kleeberger, S.R. **Functional polymorphisms in NRF2: implications for human disease.** Free Radical Biology and Medicine. 2019, 88(Pt B): 362-372.

Collares, M; Valverde, M; Fernández, I; Ormaechea, G. **Colestasis intrahepática: un desafío diagnóstico.** Archives of Internal Medicine. 2014, 36(1): 33-38.

Costa, E.L.O; Petroianu, A; Azevedo, G.M.J. **Influence of distal ileum exclusion on hepatic and renal functions in presence of extrahepatic cholestasis.** Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões. 2014, 41(2): 112-116.

Cordova, E.J; Velazquez-Cruz, R; Centeno, F; Baca, V; Orozco, L. **The NRF2 gene variant, -653G/A, is associated with nephritis in childhood-onset systemic lupus erythematosus.** Lupus. 2010, 19(10): 1237-1242.

Covas, G; Marinho, H.S; Cyrne, L; Antunes, F. **Activation of Nrf2 by H2O2: De Novo Synthesis Versus Nuclear Translocation.** In Methods in Enzymology; Academic Press: Cambridge, MA, USA. 2013, 528:157-171.

Csiszar, A; Wang, M; Lakatta, E.G; Ungvari, Z. **Inflammation and endothelial dysfunction during aging: role of NF-kappaB.** Journals Appl. Physiology. 2008,105: 1333-1341.

Dang, K; Hirode, G; Singal, A; Sundaram, V; Wong, R.J. **Alcoholic Liver Disease Epidemiology in the United States: A Retrospective Analysis of 3 US Databases.** American Journal Gastroenterology. 2019, 00: 1-9.

Dalot, E; Méhats, C; Oger, S; Leroy, Marie-Josèphe; Breuiller Fouché, M. **A role for PKC in the LPS-induced translocation NF-κB p65 subunit in cultured myometrial cells.** Biochimie. 2002, 87(6): 513-21.

Dong, J; Sulik, K.K; Chen, S.Y. **Nrf2-mediated transcriptional induction of antioxidant response in mouse embryos exposed to ethanol in vivo: implications for the prevention of fetal alcohol spectrum disorders.** Antioxidant & Redox Signaling. 2008, 10(12): 2023-2033.

Donohue T.M. **Alcohol-induced steatosis in liver cells.** World Journal Gastroenterology. 2007, 13(37): 4974-4978.

Enomoto, A; Itoh, K; Nagayoshi, E; Haruta, J; Kimura, T; O'Connor, T; Harada, T; Yahamoto, Y. **High sensitivity of Nrf2 knockout mice to acetaminophen hepatotoxicity associated with decreased expression of ARE-regulated drug metabolizing enzymes and antioxidant genes.** Toxicological Sciences. 2001, 59(1): 169-77.

Franca, A; Filho, A.C.M.L; Guerra, M.T; Weerachayaphorn, J; Santos, M.L; Njei, B; Robert, M; Lima, C.X; Vidigal, P.V.T; Banales, J.M; Ananthanarayanan, M; Leite, M.F; Nathanson, M.H. **Effects of Endotoxin on Type 3 Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor in Human Cholangiocytes.** Hepatology. 2019, 69(2): 817-830.

French, H. **An index of differential diagnosis of main symptoms.** 3rd ed. New York: W. Wood, 1912.

de Groot, H. **Reactive oxygen species in tissue injury.** Hepato-gastroenterology. 1994, 41(4): 328-332.

Guerra, M.T; Nathanson, M.H. **Calcium signaling and secretion in cholangiocytes.** Pancreatology. 2015, 15(4): 44-48.

Gui, Y.X; Zhang, L.S; Lv, W; Zhang, W.M; Zhao, J.J; Hu, X.Y. **NFE2L2 variations reduce antioxidant response in patients with Parkinson disease.** Oncotarget. 2016, 7(10): 10756-10764.

Hagar, R.E; Burgstahler, A.D; Nathanson, M.H; Ehrlich, B.E. **Type III InsP3 receptor channel stays open in the presence of increased calcium.** Nature. 1998, 396(6706): 81-84.

Hed, R. **Clinical Studies in Chronic Alcoholism.** Journal of Internal Medicine. 1959, 165(3):161-166.

Hinz, M; Arslan, S.C; Scheidereit, C. **It takes two to tango: IκBs, the multifunctional partners of NFκB.** Immunological Reviews. 2012, 246(1): 59-76.

Hiragi, K.O; Miranda-Vilela, A.L; Rocha, D.M.S; Oliveira, S.F; Hatagima, A; Klautau-Guimarães, M.N. **Superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and glutathione S-transferases M1 and T1 gene polymorphisms in three Brazilian population groups.** Genetics and Molecular Biology. 2011, 34(1): 11-18.

Hirata, K; Dufour, J.F; Shibao, K; Knickelbein, R; O'Neill, A.F; Bode, H.P; Cassio, D; St-Pierre, M.V; Larusso, N.F; Leite, M.F; Nathanson, M.H; **Regulation of Ca²⁺ signaling in rat bile duct epithelia by inositol 1,4,5-trisphosphate receptor isoforms.** Hepatology. 2002, 36(2): 284-296.

Hirschfield, G.M; Heathcote, E.J; Gershwin, M.E; **Pathogenesis of cholestatic liver disease and therapeutic approaches.** Gastroenterology. 2010, 139(5): 1481-1496.

Hurst, A. **A textbook of the practice of medicine.** 6th ed. p.727. Oxford University. 1941.

Hybertson, B.M; Gao, B; Bose, S.K; McCord, J.M. **Oxidative stress in health and disease: the therapeutic potential of Nrf2 activation.** Molecular Aspects of Medicine. 2011, 32(4-6): 234-246.

Jiménez-Osorio, A.S; González-Reyes, S; García-Niño, W.R; Moreno-Macías, H; Rodríguez-Arellano, M.E; Vargas-Alarcón, G; Zúñiga, J; Barquera, R; Pedraza-Chaverri, J. **Association of Nuclear Factor-Erythroid 2-Related Factor 2, Thioredoxin Interacting Protein, and Heme Oxygenase-1 Gene Polymorphisms with Diabetes and Obesity in Mexican Patients.** Oxidative Medicine and Cellular Longevity. 2016, 2016: 1-8.

Jing, N; Yin, L; Sun, J; Cao, Z; Mao, W. **Expression levels of miR-205 and miR-506 in colon cancer tissues and their relationships with clinicopathological features.** Oncology Letters. 2018, 16(4): 4331-4336.

Kang, J.S; Kim, D.J; Kim, Gi-Young; Cha, Hee-Jae, Kim, S; Kimf, Heui-Soo; Park, C; Hwang, H.J; Kim, B.W; Kim, C.M; Choi, Y.W. **Ethanol extract of Prunus mume fruit attenuates hydrogen peroxide-induced oxidative stress and apoptosis involving Nrf2/HO-1 activation in C2C12 myoblasts.** Revista Brasileira de Farmacognosia. 2016, 26(2016): 184-190.

Kasztelan-Szczerbinska, B; Slomka, M; Celinski, K; Szczerbinski, M; **Alkaline phosphatase: the next independent predictor of the poor 90-day outcome in alcoholic hepatitis.** BioMed Research International. 2013, 2013(5): 1-8.

Kensler, T.W; Wakabayashi, N; Biswal S. **Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway.** Annual Review Pharmacology and Toxicology. 2007, 47: 89-116.

- Kolla, B.P; Schneekloth, T.D; Biernacka, J; Shah, V; Lazaridis, K.N; Geske, J; Karpyak, V. **Alcohol and Alcoholism**. Medical Council on Alcohol and Oxford University Press. 2018, 1(4): 01-04.
- Kong, L.Z; Chandimali, N; Han, Y.H; Lee, D.H; Kim, J.S; Kim, S.U; Kim, T.D; Jeong, D.K; Sun, H.N; Lee, D.S; Kwon, T. **Pathogenesis, Early Diagnosis, and Therapeutic Management of Alcoholic Liver Disease**. International Journal of Molecular Sciences. 2019, 20(2712): 1-27.
- Krawczyk, P; Powrózek, T; Olesiński, T; Dmitruk, A; Dziwota J; Kowalski, D; Milanowski, J. **Evaluation of miR-506 and miR-4316 expression in early and non-invasive diagnosis of colorectal cancer**. International Journal Colorectal Disease. 2017, 32(7): 1057-1060.
- Kumar, A; Singh, C.K; Lavoie, H.A; Dipette, D.J; Singh, U.S. **Resveratrol restores Nrf2 level and prevents ethanol-induced toxic effects in the cerebellum of a rodent model of fetal alcohol spectrum disorders**. Molecular Pharmacology. 2011, 80(3): 446-457.
- Kunnas, T; Määttä, K; Nikkari, S.T. **Genetic Polymorphisms of Transcription Factor NRF2 and of its Host Gene Sulfiredoxin (SRXN1) are Associated with Cerebrovascular Disease in a Finnish Cohort, the TAMRISK Study**. International Journal of Medical Sciences. 2016, 13(5): 325-329.
- Lamas-Paz, A; Hao, F; Nelson, L.J; Vázquez, M.T; Canals, S; Moral, M.G; Martínez-Naves, E; Nevzorova, Y.A; Cubero, F.J. **Alcoholic liver disease: Utility of animal models**. World Journal Gastroenterology. 2018, 24(45): 5063-5075.
- Lamle, J; Marhenke, S; Borlak, J; von Wasielewski, R; Eriksson, C.J; Geffers, R; Manns, M.P; Yamamoto, M; Vogel, A. **Nuclear factor-eythroid 2-related factor 2 prevents alcohol-induced fulminant liver injury**. Gastroenterology. 2008, 134(4): 1159-1168.
- Lazaro, R; Wu, R; Lee, S; Zhu, N.L; Chen, C.L; French, S.W; Xu, J; Machida, K; Tsukamoto, H. **Osteopontin deficiency does not prevent but promotes alcoholic neutrophilic hepatitis in mice**. Hepatology. 2015, 61(1): 129-140.
- Lee, R.C; Feinbaum, R.L; Ambros, V. The C. *Elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. Cell. 1993, 75(5): 843-854.
- Li, Q; Verma, I.M. **NF-κB regulation in the immune system**. Nature Reviews Immunology. 2012, 2(2002): 725-734.
- Li, M; Wang, X.F; Shi, J.J; Li, Y.P; Yang, N; Zhai, S; Dang, S.S. **Caffeic acid phenethyl ester inhibits liver fibrosis in rats**. World journal of gastroenterology. 2015, 21(13): 3893-3903.

- Li, W; Khor, T.O; Xu, C; Shen, G; Jeong, W.S; Yu, W; Kong, A.N. **Activation of Nrf2-antioxidant signaling attenuates NFκB-inflammatory response and elicits apoptosis.** *Biochemical Pharmacology*. 2008, 76(11): 1485-1489.
- Lieber, C.S; Jones, D.P; Decarli, L.M. **Effects of prolonged ethanol intake: production of fatty liver despite adequate diets.** *The Journal of Clinical Investigation*. 1965, 44: 1009-1021.
- Lieber, C.S; Leo, M.A; Mak, K.M; DeCarli, L.M; Sato, S. **Choline fails to prevent liver fibrosis in ethanol-fed baboons but causes toxicity.** *Hepatology*. 1985, 5(4): 561-572.
- Liu, J; Wu, K.C; Lu, Y.F; Ekuase, E; Klaassen, C.D. **Nrf2 protection against liver injury produced by various hepatotoxicants.** *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2013, 2013: 01-08.
- Lock, J.T; Alzayady, K.J; Yule, D.I; Parker, I. **All three IP3 receptor isoforms generate Ca²⁺ puffs that display similar characteristics.** *Sci Signal*. 2019, 11(561): 01-35.
- Lucey, M.R; Mathurin, P; Morgan, T.R; **Alcoholic hepatitis.** *The New England journal of medicine*. 2009, 360(26): 2758-2769.
- Lu, H; Lei, X; Zhang, Q. **Liver-specific knockout of histone methyltransferase G9a impairs liver maturation and dysregulates inflammatory, cytoprotective, and drug-processing genes.** *Xenobiotica*. 2019, 49(6): 740-752.
- M-Al-Azhary, N; Kamel, M.M; Ismail, M.Y; Mahmoud, A.A; Radwan, M.E. **The Role of Genetic Polymorphisms in Nrf2 and P73 in Egyptian Women with Breast Cancer.** *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2016, 17(11): 4945-4949.
- Ma, Q; Battelli, L; Hubbs, A.F. **Multiorgan autoimmune inflammation, enhanced lymphoproliferation, and impaired homeostasis of reactive oxygen species in mice lacking the antioxidant-activated transcription factor Nrf2.** *The American Journal of Pathology*. 2006, 168(6): 1960-74.
- Ma, Q; Kinner, K; Ye, J; Chen, B.J. **Inhibition of nuclear factor κB by phenolic antioxidants: interplay between antioxidant signaling and inflammatory cytokine expression.** *Molecular Pharmacology*. 2003, 64(2): 211-219.
- Maddrey, W.C; Boitnott, J.K; Bedine, M.S; Weber, F.L; Jr., Mezey, E; White, R.I; **Corticosteroid therapy of alcoholic hepatitis.** *Gastroenterology*. 1978, 75(2): 193-199.
- Marczak, E.D; Marzec, J; Zeldin, D.C; Kleeberger, S.R; Brown, N.J; Pretorius, M; Lee, C.R. **Polymorphisms in the transcription factor NRF2 and forearm vasodilator responses in humans.** *Pharmacogenetics and genomics*. 2012, 22(8): 620 - 628.
- Marzec, J.M; Christie, J.D; Reddy, S.P; Jedlicka, A.E; Vuong, H; Lancken, P.N; Aplenc, N; Yamamoto, T; Yamamoto, M; Cho, H.Y; Kleeberger, S.R. **Functional**

polymorphisms in the transcription factor NRF2 in humans increase the risk of acute lung injury. FASEB Journal. 2007, 21(9): 2237-2246.

Marin, J.J.G; B; Bujanda, L; Banales, J.M. **MicroRNAs and cholestatic liver diseases.** Curr Opin Gastroenterol. 2014, 30(3): 303-309.

Matos, L; Batista, P; Monteiro, N; Henriques, P; Carvalho, A. **Hepatite alcoólica aguda - Artigo de Revisão.** Jornal Português de Gastrenterologia. 2013, 20(4): 153-161.

Minagawa, N; Nagata, J; Shibao, K; Masyuk, A.I; Gomes, D.A; Rodrigues, M.A; Lesage, G; Akiba, Y; Kaunitz, J.D; Ehrlich, B.E; Larusso, N.F; Nathanson, M.H; **Cyclic AMP regulates bicarbonate secretion in colangiócitos through release of ATP into bile.** Gastroenterology. 2007, 133(5): 1592-1602.

Miyakawa, T; Maeda, A; Yamazawa, T; Hirose, K; Kurosaki1, T; Iino, M. **Encoding of Ca²⁺ signals by differential expression of IP3 receptor subtypes.** The EMBO Journal. 1999, 18(5): 1303–1308.

Motohashi, H; Yamamoto, M. **Nrf2-Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism.** Trends in Molecular Medicine. 2004,10(11): 549-557.

Naveau, S; Giraud, V; Borotto, E; Aubert, A; Capron, F; Chaput, J.C. **Excess weight risk factor for alcoholic liver disease.** Hepatology. 1997, 25(1): 108-111.

Neame, P.B; Joubert, S.M. **Postalcoholic hypoglycemia and toxic hepatitis.** Lancet. 1961, 278(7208): 893-897.

Niture, S.K; Khatri, R; Jaiswal, A.K. **Regulation of Nrf2-an update.** Free Radical Biology and Medicine. 2014, 66: 36-44.

Okawa, H; Motohashi, H; Kobayashi, A; Aburatani, H; Kensler, TW; Yamamoto, M. **Hepatocyte-specific deletion of the *keap1* gene activates Nrf2 and confers potent resistance against acute drug toxicity.** Biochemical and Biophysical Research Communications. 2006, 339(1): 79-88.

Okano, Y; Nezu, U; Enokida, Y; Lee, M.T; Kinoshita, H; Lezhava, A; Hayashizaki, Y; Morita, S; Taguri, M; Ichikawa, Y; Kaneko, T; Natsumeda, Y; Yokose, T; Nakayama, H; Miyagi, Y; Ishikawa, T. **SNP (-617C > A) in ARE-like loci of the NRF2 gene: a new biomarker for prognosis of lung adenocarcinoma in Japanese non-smoking women.** PLoS one. 2013, 8(9) 1-11.

O'Shea, R.S; Dasarathy, S; McCullough, A.J. **Alcoholic liver disease.** Hepatology. 2010, 51(1): 307-328.

von Otter, M; Bergstrom, P; Quattrone, A; Marco, E.V; Annesi, G; Suderkvist, D; Wettinger, S.B; Drozdik, M; Bialecka, M; Nissbrandt, H; Klein, C; Nilsson, M; Hammarsten, O; Nilsson, S; Zetterberg, H. **Genetic associations of Nrf2-encoding NFE2L2 variants with Parkinsons disease a multicenter study.** BMC Medical Genetics. 2014, 15(131): 1-13.

von Otter, M; Landgren, S; Nilsson, S; Celojovic, D; Bergstrom, P; Håkansson, A; Nissbrandt, H; Drozdik, M; Bialecka, M; Kurzawski, M; Blennow, K; Nilsson, M; Hammarsten, O; Zetterberg, H. **Association of Nrf2-encoding NFE2L2 haplotypes with Parkinson's disease.** BMC medical genetics. 2010, 11(36): 1-9.

von Otter, M; Landgren, S; Nilsson, S; Zetterberg, M; Celojovic, D; Bergström, P; Minthon, L; Bogdanovic, N; Andreasen, N; Gustafson, D.R; Skoog, I; Wallin, A; Tasa, G; Blennow, K; Nilsson, M; Hammarsten, O; Zetterberg, H. **Nrf2-encoding NFE2L2 haplotypes influence disease progression but not risk in Alzheimer's disease and age-related cataract.** Mechanisms of ageing and development. 2020, 131(2): 105-110.

Panqueva, R.P.L. **Approaches to pathological diagnosis of cholestatic diseases.**

Revista Colombiana de Gastroenterología. 2014, 29(2): 183-192.

Patrick, C.H. **Alcohol, Culture, and Society.** Durham, NC: Duke University Press. 1952.

Peiyuan, H; Zhiping, H; Chengjun, S; Chunqing, W; Bingqing, L; Imam, M.U.

Resveratrol Ameliorates Experimental Alcoholic Liver Disease by Modulating Oxidative Stress. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2017, 2017: 01-10.

Popper, H; Szanto, P.B. **Intrahepatic cholestasis (cholangiolitis).** Gastroenterology. 1956, 31(6): 699-700.

Prom-Wormley, E.C; Ebejer, J; Dick, D.M; Bowers, M.S. **The genetic epidemiology of substance use disorder: A review.** Drug and alcohol dependence. 2017, 180: 241-259.

Purdum-Dickinson, S.E; Sheveleva, E.V; Sun, H; Chen, Q.M. **Translational control of nrf2 protein in activation of antioxidant response by oxidants.** Molecular Pharmacologic. 2007, 72(4): 1074-1081.

Qiang, M. **Role of Nrf2 in Oxidative Stress and Toxicity.** Annual Review Pharmacology and Toxicology. 2013, 53: 401-426.

Ramos-Franco, J; Fill, M; Mignery, G.A. **Isoform-specific function of single inositol 1,4,5-trisphosphate receptor channels.** Biophysic Journal. 1998, 75(2): 834-839.

Reed, T; Page, W.F; Viken, R.J; Christian, J.C. **Genetic predisposition to organ-specific endpoints of alcoholism.** Alcoholism: clinical and experimental research. 1996, 20(9): 1528-1533.

Rehm, J; Mathers, C; Popova, S; Thavorncharoensap, M; Teerawattananon, Y; Patra, J. **Global burden of disease and injury and economic cost attributable to alcohol use and alcohol-use disorders.** Lancet. 2009, 373(9682): 2223-2233.

Rehm, J; Probst, C; Shield, K.D; Shuper, P.A. **Does alcohol use have a causal effect on HIV incidence and disease progression? A review of the literature and a modeling strategy for quantifying the effect.** Population Health Metrics. 2017, 15(1): 01-07.

- Reisman, S.A; Buckley, D.B; Tanaka, Y; Klaassen, C.D. **CDDO-Im protects from acetaminophen hepatotoxicity through induction of Nrf2-dependent genes.** Toxicology and Applied Pharmacology. 2009, 236(1): 109-114.
- Rosato, V; Abenavoli, L; Federico, A; Masarone, M; Persico, M. **Pharmacotherapy of alcoholic liver disease in clinical practice.** The International Journal of Clinical Practice. 2016, 70(2): 119-131.
- Salameh, H; Raff, E; Erwin, A. **PNPLA3 gene polymorphism is associated with predisposition to and severity of alcoholic liver disease.** The American Journal of Gastroenterology. 2015, 110(6): 846-856.
- Sampath, V; Garland, J.S; Helbling, D; Dimmock, D; Mulrooney, N.P; Simpson, P.M; Murray, J.C; Dagle, J.M. **Antioxidant response genes sequence variants and BPD susceptibility in VLBW infants.** Pediatric Research. 2015, 77(3): 477-483.
- Sarin, S.K; Pande, A; Schnabl, B. **Microbiome as a therapeutic target in alcohol-related liver disease.** Journal of Hepatology. 2019, 70: 260-272.
- Sharma, H.K; Tripathi, B.M; Pelto, P.J. **The evolution of alcohol use in India.** AIDS and Behavior. 2010, 14(1): 08-17.
- Shasthry, S.M; Rastogi, A; Bihari, C; Vijayaraghavan, R; Arora, V; Sharma, M.K; Sarin, S.K. **Histological activity score on baseline liver biopsy can predict non-response to steroids in patients with severe alcoholic hepatitis.** Virchows Arch. 2018, 472(4): 667-675.
- Shi, X; DeLucia, A.L; Bao, J; Zhang, P. **Alcohol abuse and disorder of granulopoiesis.** Pharmacology Therapy. 2019, 198: 206-219.
- Shibao, K; Hirata, K; Robert, M.E; Nathanson, M.H. **Loss of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors from bile duct epithelia is a common event in cholestasis.** Gastroenterology. 2003, 125(4): 1175-1187.
- Shimoyama, Y; Mitsuda, Y; Tsuruta, Y; Hamajima, N; Niwa, T. **Polymorphism of Nrf2, an antioxidative gene, is associated with blood pressure and cardiovascular mortality in hemodialysis patients.** International journal of medical sciences. International Journal of Medical Sciences. 2014, 11(7): 726-731.
- Shimoyama, Y; Mitsuda, Y; Hamajima, N; Niwa, T. **Polymorphisms of NRF2, an antioxidative gene, are associated with blood pressure in Japanese.** Nagoya Journal of Medical Science. 2014, 76(1 - 2): 113-120.
- Shin, J.H; Lee, K.M; Shin, J; Kang, K.D; Nho, C.W; Cho, Y.S. **Genetic risk score combining six genetic variants associated with the cellular NRF2 expression levels correlates with Type 2 diabetes in the human population.** Genes & Genomics. 2019, 41(5): 537-545.
- Singal, A.K; Bataller, R; Ahn, J; Kamath, P.S; Shah, V.H. **ACG Clinical Guideline: Alcoholic Liver Disease.** American Journal Gastroenterology. 2018, 113(2): 175-194.

- Singal, A.K; Shah, V.H. **Current trials and novel therapeutic targets for alcoholic hepatitis.** Journal of Hepatology. 2019, 70(2): 305-313.
- Singh, G.K; Hoyert, D.L. **Social epidemiology of chronic liver disease and cirrhosis mortality in the United States, 1935-1997; trends and differentials by ethnicity, socioeconomic status, and alcohol consumption.** Human Biology. 2010, 72(5): 801-820.
- Spahr, L; Rubbia-Brandt, M; Genevay, A; Hadengue; Giostra, E. **Early liver biopsy, intraparenchymal cholestasis, and prognosis in patients with alcoholic steatohepatitis.** BMC Gastroenterology. 2011, 11(115): 01-09.
- Sueblinvong, V; Mills, S.T; Neujahr, D.C; Go, Y.M; Jones, D.P; Guidot, D.M. **Nuclear Thioredoxin-1 Overexpression Attenuates Alcohol-Mediated Nrf2 Signaling and Lung Fibrosis.** Alcoholism: clinical and experimental research. 2016, 40(9): 1846-1856.
- Sueblinvong, V; Kerchberger, V.E; Saghafi, R; Mills, S.T; Fan, X; Guidot, D.M. **Chronic Alcohol Ingestion Primes the Lung for Bleomycin-Induced Fibrosis in Mice.** Alcoholism: clinical and experimental research. 2014, 38(2): 336-343.
- Summerskill, W.H.J; Wolfe, S.J; Davidson, C.S. **Response to alcohol in chronic alcoholics with liver disease.** Lancet. 1957, 1: 335-340.
- Sun, J; Fu, J; Li, L; Chen, C; Wang, H; Hou, Y; Xu, Y; Pi, J. **Nrf2 in alcoholic liver disease.** Toxicology and Applied Pharmacology. 2018, 357: 62-69.
- Souiden, Y; Mallouli, H; Meskhi, S; Chaabouni, Y; Rebai, A; Chéour, F; Mahdouani, K. **MnSOD and GPx1 polymorphism relationship with coronary heart disease risk and severity.** Biological Research. 2016, 49(22): 1-12.
- Szabo, G; Bala, S. **MicroRNAs in liver disease.** Nature Reviews, Gastroenterology & Hepatology. 2013, 10: 01-11.
- Teena, R; Dhamodharan, U; Ali, D; Rajesh, K; Ramkumar, K.M. **Genetic Polymorphism of the Nrf2 Promoter Region (rs35652124) Is Associated with the Risk of Diabetic Foot Ulcers.** Hindawi Oxidative Medicine and Cellular Longevity. 2020, (2020): 1-9.
- Toyokuni, S. **Reactive oxygen species-induced molecular damage and its application in pathology.** Pathology international. 1999, 49(2): 91-102.
- Ungvari, I; Hadadi, E; Virag, V; Nagy, A; Kiss, A; Kalmár, A; Zsigmond, G; Semsei, A.F; Falus, A; Szalai, C. **Relationship between air pollution, NFE2L2 gene polymorphisms and childhood asthma in a Hungarian population.** Journal of community genetics. 2012, 3(1): 25-33.
- Walters, D.M; Cho, H.Y; Kleeberger, S.R. **Oxidative stress and antioxidants in the pathogenesis of pulmonary fibrosis: a potential role for Nrf2.** Antioxidants & Redox Signaling. 2008, 10(2): 321-32.

Wang, Y; Li, G; Goode, J; Paz, J.C; Ouyang, K; Sreaton, R; Fischer, W.H; Chen, J; Tabas, I; Montminy, M. **Inositol-1,4,5-trisphosphate receptor regulates hepatic glyconeogenesis in fasting and diabetes.** *Nature*. 2012, 485(7396): 128-132.

Wang, T; Zhang, X; Li, J.J. **The role of NF- κ B in the regulation of cell stress responses.** *Int. Immunopharmacol.* 2002, 2(11): 1509-1520.

Wang, X; Chen, H; Liu, J; Ouyang, Y; Wang, D; Bao, W; Liu, L. **Association between the NF-E2 Related Factor 2 Gene Polymorphism and Oxidative Stress, Anti-Oxidative Status, and Newly-Diagnosed Type 2 Diabetes Mellitus in a Chinese Population.** *International Journal of Molecular Sciences*. 2015, 16(7): 16483-16496.

Weerachayaphorn, J; Amaya, M.J; Spirli, C; Chansela, P; Mitchell, K.A; Ananthanarayanan, M; Nathanson, M.H. **Nuclear Factor Erythroid 2-like 2 Regulates Expression of Inositol 1,4,5-trisphosphate Receptor, Type 3 and Calcium Signaling in Cholangiocytes.** *Gastroenterology*. 2015, 149(1): 211-222.

World Health Organization - WHO. **Global status report on alcohol and health.** Geneva: Switzerland. 2018.

World Health Organization - WHO. **Global status report on alcohol and health.** Geneva: Switzerland. 2011.

Wu, D; Cederbaum, A.I. **Oxidative stress and alcoholic liver disease.** *Seminars in Liver Disease*. 2009, 29(2): 141-54.

Wu, K.C; Liu, J; Klaassen, C.D. **Role of Nrf2 in preventing ethanol-induced oxidative stress and lipid accumulation.** *Toxicology and applied pharmacology*. 2012, 262(3): 321-329.

Yin, M; Wheeler, M.D; Kono, H; Bradford, B.U; Gallucci, R.M; Luster, M.I; Thurman, R.G. **Essential role of tumor necrosis factor alpha in alcohol-induced liver injury in mice.** *Gastroenterology*. 1999, 117: 942-952.

Yoh, K; Itoh, K; Enomoto, A; Hirayama, A; Yamaguchi, N; Kobaiashi, M; Morito, N; Koyama, A; Yamamoto, M; Takahashi, S. **Nrf2-deficient female mice develop lupus-like autoimmune nephritis.** *Kidney International*. 2001, 60: 1343-53.

Yoon, Y.H; Chen, C.M. **Liver Cirrhosis Mortality in the United States: National, State, and Regional Trends, 2000-2013.** *National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism*. 2016, 105: 01-69.

AGRADECIMENTO ÀS AGÊNCIAS DE FOMENTO


O presente estudo foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), por meio do Programa de Excelência Acadêmica (PROEX) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG). O presente projeto contou também com o apoio do Centro de Pesquisa do Fígado da Universidade Federal de Minas Gerais – Brasil (*Liver Center at UFMG*), através da concessão de bolsas de estudo de pós-graduação (Mestrado e Doutorado) e auxílio ao projeto de pesquisa.





Article

Polymorphism in the Promoter Region of NFE2L2 Gene Is a Genetic Marker of Susceptibility to Cirrhosis Associated with Alcohol Abuse

Kemper Nunes dos Santos ^{1,†}, Rodrigo M. Florentino ^{1,†}, Andressa França ¹, Antônio Carlos Melo Lima Filho ¹, Marcone Loiola dos Santos ¹, Dabny Missiaggia ¹, Matheus de Castro Fonseca ² , Igor Brasil Costa ³, Paula Vieira Teixeira Vidigal ¹, Michael H. Nathanson ⁴, Fernanda de Oliveira Lemos ^{1,*} and M. Fatima Leite ¹

¹ Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG 31270-901, Brazil

² Laboratório Nacional de Biociências (LNBio), Centro de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), Campinas, SP 13083-970, Brazil

³ Instituto de Pesquisas Evandro Chagas – IEC, Ananindeua, PA 67030-000, Brazil

⁴ Section of Digestive Diseases, Yale University School of Medicine, New Haven, CT 06510, USA

* Correspondence: folemos@hotmail.com

† These authors contributed equally to this work.

Received: 19 June 2019; Accepted: 15 July 2019; Published: 23 July 2019



Abstract: Alcoholic liver disease (ALD) is a highly prevalent spectrum of pathologies caused by alcohol overconsumption. Morbidity and mortality related to ALD are increasing worldwide, thereby demanding strategies for early diagnosis and detection of ALD predisposition. A potential candidate as a marker for ALD susceptibility is the transcription factor nuclear factor erythroid-related factor 2 (Nrf2), codified by the nuclear factor erythroid 2-related factor 2 gene (NFE2L2). Nrf2 regulates expression of proteins that protect against oxidative stress and inflammation caused by alcohol overconsumption. Here, we assessed genetic variants of NFE2L2 for association with ALD. Specimens from patients diagnosed with cirrhosis caused by ALD were genotyped for three NFE2L2 single nucleotide polymorphisms (SNP) (SNPs: rs35652124, rs4893819, and rs6721961). Hematoxylin & eosin and immunohistochemistry were performed to determine the inflammatory score and Nrf2 expression, respectively. SNPs rs4893819 and rs6721961 were not specifically associated with ALD, but analysis of SNP rs35652124 suggested that this polymorphism predisposes to ALD. Furthermore, SNP rs35652124 was associated with a lower level of Nrf2 expression. Moreover, liver samples from ALD patients with this polymorphism displayed more severe inflammatory activity. Together, these findings provide evidence that the SNP rs35652124 variation in the Nrf2-encoding gene NFE2L2 is a potential genetic marker for susceptibility to ALD.

Keywords: Alcoholic liver disease; Nrf2; Polymorphism; NFE2L2 gene

1. Introduction

Alcoholic liver disease (ALD), a spectrum of pathologies that include fatty liver disease, alcoholic hepatitis, and cirrhosis caused by alcohol overconsumption [1,2], is a global public health issue. Approximately 2.4 billion people consume alcohol worldwide, and 75 million people are at risk of alcohol-associated liver disease [3]. It is estimated that 2 million people die of liver disease each year, and up to 50% of these cases are due in part to alcoholic cirrhosis [1]. ALD, as with other chronic liver diseases, may not be clinically apparent early in the disease process. This highlights the importance of early diagnosis for management and treatment to prevent cirrhosis-related morbidity and mortality, as well as to detect ALD susceptibility.

Ethanol metabolism generates reactive oxygen species (ROS), causing oxidative stress and inflammation, the main pathogenic events involved in ALD [4,5]. Therefore, preventing the increase in ROS is a potential mechanism to protect the liver tissue from the damage caused by alcohol consumption. An endogenous mechanism of hepatoprotection is mediated by the nuclear erythroid-related factor 2 (Nrf2). Nrf2 is a basic leucine zipper transcription factor that controls the expression of the antioxidant response element (ARE)—dependent genes, leading to the expression of cytoprotective and anti-inflammatory proteins [6,7]. Dysregulation of Nrf2 activity correlates with the development of several chronic inflammatory diseases [7–10]. For instance, knock-out (KO) mice for Nrf2 displayed aggravated liver injury after alcohol ingestion [11,12].

Progression and prognosis of alcohol-related liver disease is influenced by multiple factors, including genetics [2]. The most common type of genetic variation is the single nucleotide polymorphism (SNP), which represents a nucleotide substitution in the genome that is associated with altered vulnerability to disease [13,14]. SNPs in the promoter region of the Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 gene (NFE2L2) have been associated with disease susceptibility and other inherited phenotypes, especially conditions characterized by increased levels of oxidative stress [15]. However, SNPs in NFE2L2 have not yet been related to ALD. Here we investigated whether polymorphisms in the promoter region of the NFE2L2 gene are associated with worse prognosis in a cohort of ALD patients. For comparison, we examined the specificity of NFE2L2 SNPs for ALD by comparing the occurrence of these SNPs in patients with chronic hepatitis C virus (HCV) infection. Our findings suggest SNP rs35652124 is a specific genetic marker for susceptibility to the development of ALD.

2. Results

2.1. Single Nucleotide Polymorphism at -274 of the NFE2L2 Promoter Region Is a Genetic Marker for ALD Susceptibility

Two of the three analyzed polymorphisms in the promoter region of NFE2L2, the gene that encodes Nrf2 (Figure 1), showed clinical significance in ALD samples.

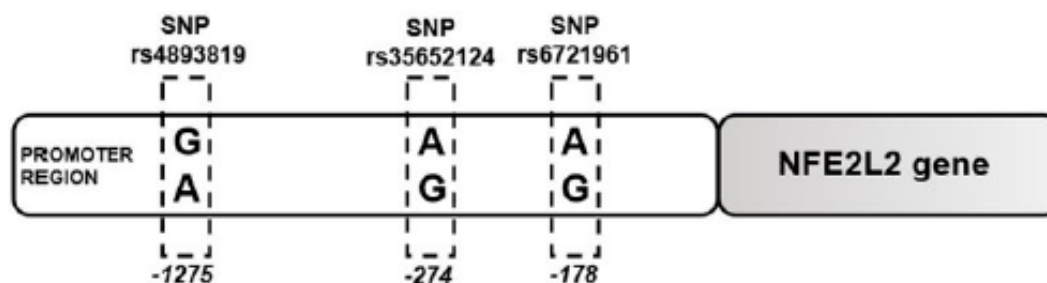


Figure 1. Schematic position of the selected polymorphisms in nuclear factor erythroid 2-related factor 2 gene (NFE2L2). The three polymorphisms studied in this work are localized in promoter region of NFE2L2 gene. Single Nucleotide Polymorphism (SNP) rs6721961 is located at position -178, where can be present an adenine (A) or guanine (G). SNP rs35652124 is in position -274 in the promoter region, and the variation is the same of the first. Lastly, SNP rs4893819 is localized in position -1275 in the promoter region of NFE2L2 gene. In this position, the variation occurs between G and A. All these positions are considering the position in relation 3' → 5'.

The SNP rs35652124 analysis showed the polymorphism -274 adenine (A) in the promoter region of NFE2L2 gene in most ALD patients ($n = 55$ patients (59.8%)), while the variant -274 guanine (G) was also present but less frequently in the same group ($n = 37$ patients (40.2%)). Conversely, control group showed the variant -274G in most of the samples ($n = 25$ patients (59.5%)), whereas the polymorphism -274A was less frequent in normal tissue ($n = 17$ patients (40.5%)) (Table 1). We also performed the SNP rs35652124 analysis in patients with cirrhosis caused by HCV to evaluate the specificity of this polymorphism for ALD. In contrast to what was observed in ALD, most patients with cirrhosis caused

by HCV had the variant -274G (n = 19 patients - 67.9%) instead of -274A (n = 9 patients—32.1%) (Table 2). The comparison between HCV and control liver samples did not show any significant difference regarding the frequency of the variant -274A or -274G (Table 3). These observations are consistent with the idea that the presence of an A in SNP rs35652124 is associated with ALD development, while the presence of a G may be a protective factor.

Table 1. Allele Frequencies Compared to Alcoholic liver disease (ALD)/Control Groups—SNP rs35652124 (-214 A > G).

Allele	ALD n (%)		Control n (%)		p Value
A/A	18	39.1	5	23.8	0.1457
G/G	9	19.6	9	42.9	
A/G	19	41.3	7	33.3	
Total	46	100.0	21	100	
A/A	18	39.1	5	23.8	0.2192
G/G_A/G	28	60.9	16	76.2	
Total	46	100.0	21	100	
A/A_A/G	37	80.4	12	57.1	0.0460
G/G	9	19.6	9	42.9	
Total	46	100.0	21	100	
A	55	59.8	17	40.5	0.0387
G	37	40.2	25	59.5	
Total	92	100.0	42	100	

Table 2. Allele Frequencies Compared to Alcoholic liver disease (ALD)/hepatitis C virus (HCV) Groups—SNP rs35652124 (-214 A > G).

Allele	ALD n (%)		HCV n (%)		p Value
A/A	18	39.1	2	14.3	0.0668
G/G	9	19.6	7	50.0	
A/G	19	41.3	5	35.7	
Total	46	100.0	14	100.0	
A/A	18	39.1	2	14.3	0.0746
G/G_A/G	28	60.9	12	85.7	
Total	46	100.0	14	100.0	
A/A_A/G	37	80.4	7	50.0	0.0345
G/G	9	19.6	7	50.0	
Total	46	100.0	14	100.0	
A	55	59.8	9	32.1	0.0106
G	37	40.2	19	67.9	
Total	92	100.0	28	100.0	

Table 3. Allele Frequencies Compared to hepatitis C virus (HCV)/Control Groups—SNP rs35652124 (-214 A > G).

Allele	HCV n (%)		Control n (%)		p Value
A/A	2	14.3	5	23.81	0.7898
G/G	7	50.0	9	42.86	
A/G	5	35.7	7	33.33	
Total	14	100.0	21	100	
A/A	2	14.3	5	23.81	0.4995
G/G_A/G	12	85.7	16	76.19	
Total	14	100.0	21	100	
A/A_A/G	7	50.0	12	57.14	0.6846
G/G	7	50.0	9	42.86	
Total	14	100.0	21	100	
A	9	32.1	17	40.48	0.4832
G	19	67.9	25	59.52	
Total	28	100.0	42	100	

The second polymorphism with clinical importance was the SNP rs6721961, located at position -178 in the promoter region of the NFE2L2 gene. The frequency of -178A and -178G in the samples from ALD patients was not different when we compared them to HCV samples (HCV—A: n = 22 patients—61.1%; and G: n = 14 patients—38.9%/ ALD A: n = 38 patients—41.3%; and G: n = 54 patients—58.7%) (Table 4). However, the frequency of the alleles A/A and A/G was lower in the ALD group (allele A/A: n = 27 patients—58.7%; and allele G/G: n = 19 patients—41.3%) than in the HCV group (alleles A/A and A/G: n = 16 patients—88.9%; allele G/G: n = 2 patients—11.1%) (Table 4). Together, these results suggest that the presence of the nucleotide A in the position -178 of the promoter region of NFE2L2 is associated with cirrhotic liver disease, since both ALD and HCV samples preferentially showed this polymorphism.

Table 4. Allele Frequencies Compared to Alcoholic liver disease (ALD)/hepatitis C virus (HCV) Groups—SNP rs6721961 (-178 A > G).

Allele	ALD n (%)		HCV n (%)		p Value
A/G	16	34.8	10	55.6	0.0531
A/A	11	23.9	6	33.3	
G/G	19	41.3	2	11.1	
Total	46	100.0	18	100.0	
A/A	11	23.9	6	33.3	0.6510
A/G_G/G	35	76.1	12	66.7	
Total	46	100.0	18	100.0	
A/A_A/G	27	58.7	16	88.9	0.0360
G/G	19	41.3	2	11.1	
Total	46	100.0	18	100.0	
A	38	41.3	22	61.1	0.0685
G	54	58.7	14	38.9	
Total	92	100.0	36	100.0	

The third polymorphism analyzed was the SNP rs4893819, in the position -1275 of the promoter region of NFE2L2 gene. The comparison between ALD and HCV liver samples did not show any significant difference regarding the frequency of the variant -1275A or -1275G (Table 5).

Table 5. Allele Frequencies Compared to Alcoholic liver disease (ALD)/hepatitis C virus (HCV) Groups—SNP rs4893819 (-1275 G > A).

Allele	ALD n (%)		HCV n (%)		p Value
A/A	10	22.7	4	28.6	0.8715
G/G	22	50.0	7	50.0	
G/A	12	27.3	3	21.4	
Total	44	100.0	14	100.0	
A/A	10	22.7	4	28.6	0.7245
G/G_C/A	34	77.3	10	71.4	
Total	44	100.0	14	100.0	
A/A_G/A	22	50.0	7	50.0	1.000
G/G	22	50.0	7	50.0	
Total	44	100.0	14	100.0	
A	32	36.4	11	39.3	0.9568
G	56	63.6	17	60.7	
Total	88	100.0	28	100.0	

Together, these results are consistent with the idea that the polymorphism -274A in the promoter region of NFE2L2 predisposes to ALD while the polymorphism at -178A might be associated with susceptibility to develop cirrhosis from ALD plus other causes as well.

2.2. Single Nucleotide Polymorphism Rs35652124 in the NFE2L2 Gene Correlates With Inflammatory Score in ALD

In light of the protective effect of Nrf2 against oxidative stress caused by alcohol consumption, we aimed to assess whether polymorphisms in the promoter region of NFE2L2 directly correlate with expression of Nrf2 in the liver. To address this question, immunohistochemistry was performed in the ALD and HCV samples after Nrf2 antibody optimization, using liver specimens from healthy patients (negative control—nonspecific binding), and specimens from patients with extrahepatic biliary atresia (positive control for Nrf2 nuclear translocation) [16] (Figure S1). Although Nrf2 staining was not nuclear in most ALD specimens analyzed, Nrf2 was localized throughout the cytoplasm in the ALD samples, and preferentially in the perinuclear region (Figure 2). This altered distribution could be due to the fact that ALD specimens used here were from patients with at least six months of alcohol abstinence before liver transplantation. Therefore, the absence of the acute alcohol stimuli could contribute to the lower nuclear translocation of Nrf2 observed in these ALD samples. In addition to the Nrf2 nuclear translocation, the de novo synthesis of this transcription factor is also involved in the mechanism of cell protection after exposure to reactive oxygen species [17,18]. This is in agreement with our findings that in SNP rs35652124 polymorphisms, Nrf2 expression was higher in samples exhibiting the -274G/G allele than in samples with the -274A/A or -274A/G alleles (G/G = 183.1 ± 3.9 ; A/A = 170.1 ± 2.9 ; A/G = 70.3 ± 1.9), (Figure 2A,B). The expression of superoxide dismutase 1 (SOD1), a gene which transcription is targeted for a variety of transcription factors, including Nrf2 [19], was also observed in most ALD samples (Figure S2), suggesting some level of Nrf2 activation. These results support the observation that the presence of -274A in SNP rs35652124, both in homozygosity (A/A) or heterozygosity (A/G), may be a risk factor for ALD, while the -274G/G allele is a protective factor.

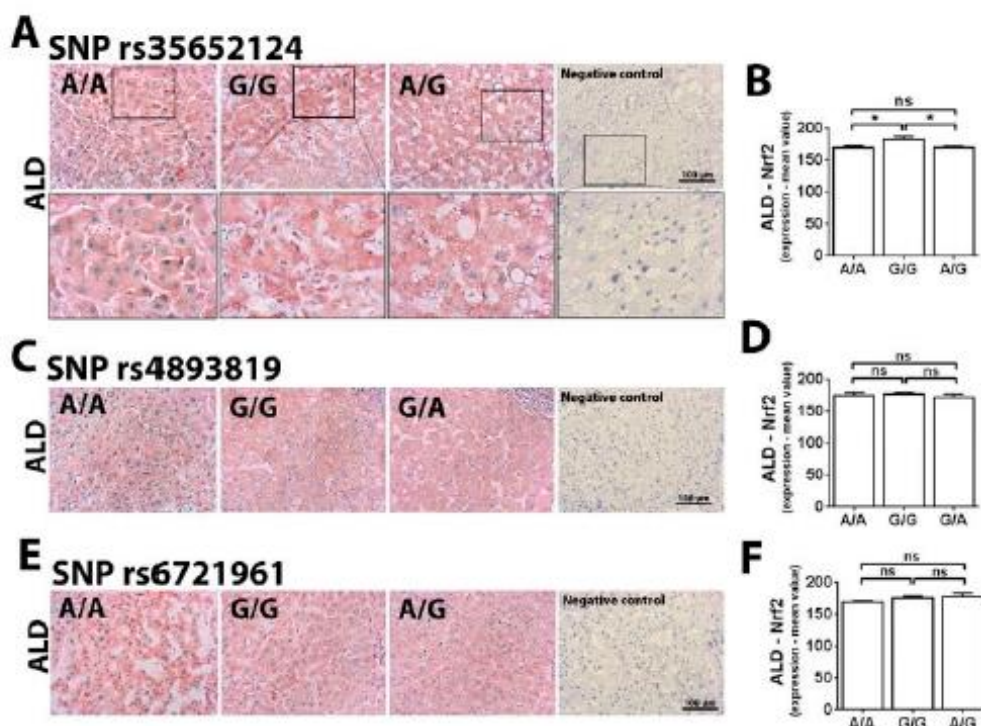


Figure 2. Nrf2 expression in the different polymorphisms of NFE2L2 gene in patients with ALD-associated cirrhosis. (A) Immunohistochemistry for Nrf2 in the SNP rs35652124 genotypes. (B) Quantification of Nrf2 expression (mean value) in the different genotypes of SNP rs35652124. (C) Immunohistochemistry for Nrf2 in the SNP rs4893819 genotypes. (D) Quantification of Nrf2 expression (mean value) in the different genotypes of SNP rs4893819. (E) Immunohistochemistry for Nrf2 in the SNP rs6721961 genotypes. (F) Quantification of Nrf2 expression (mean value) in different genotypes of SNP rs6721961 ($n = 15$ patients with ALD-associated cirrhosis; and $n = 5$ patients in each genotype. * $p < 0.05$. Values are expressed as mean \pm SEM).

When it comes to the SNP rs4893819 (Figure 2C,D) and SNP rs6721961 (Figure 2E,F) polymorphisms, no correlation was observed regarding Nrf2 expression and the alleles A/A, A/G or G/G. Moreover, Nrf2 expression was not associated with the presence of any specific allele in SNP rs35652124, SNP rs4893819 or SNP rs6721961 in HCV samples (Figure S3).

There was no correlation between the polymorphism in the promoter region of NFE2L2 and the biochemical data of patients with either ALD (Table 6) or HCV (Tables S2–S4). These results might reflect the end-stage nature of the ALD and HCV cases, because all these patients had cirrhosis and required liver transplantation.

Table 6. Allele frequencies compared clinical data to Alcoholic liver disease (ALD) SNPs.

Allele	ALD - SNP rs35652124 (-214 A > G)															
	M %	F %	Age	MELD	ALT	AST	GGT	TB	DB	IB	ALP	LDH	ALB	INR	UR	CR
A/A	94.45	5.55	53.61 (2.057)	16.54 (1.101)	46.25 (11.02)	76.91 (19.03)	114.75 (21.65)	3.26 (0.3964)	1.20 (0.2407)	2.05 (0.3092)	214.2 (39.73)	460.23 (48.82)	3.12 (0.1612)	1.68 (0.0984)	27.77 (2.699)	1.04 (0.183)
G/G	100	0	55.25 (3.304)	16 (0.7559)	51.71 (4.46)	77.34 (13.1)	212 (56.35)	3.43 (0.5941)	1.68 (0.505)	1.79 (0.1932)	191.3 (51.58)	468.6 (57.1)	3.07 (0.1686)	1.48 (0.085)	34.72 (4.387)	0.95 (0.112)
A/G	100	0	52.21 (2.924)	17 (1.075)	30.47 (5.188)	39.93 (4.364)	88.34 (27.72)	3.36 (0.5608)	1.42 (0.4408)	2.04 (0.2102)	125.63 (16.44)	421.02 (46.45)	3.25 (0.1566)	1.82 (0.1526)	38.04 (3.144)	0.99 (0.068)
<i>p</i> value	-	-	0.7761	0.8396	0.2224	0.1226	0.0514	0.9742	0.6619	0.7853	0.1928	0.8082	0.7287	0.2295	0.0643	0.9129
Allele	ALD - SNP rs4893819 (-1275 G > A)															
	M %	F %	Age	MELD	ALT	AST	GGT	TB	DB	IB	ALP	LDH	ALB	INR	UR	CR
A/A	88.89	11.11	48.33 (2.809)	16.66 (0.8028)	46.2 (5.275)	60.05 (11.8)	112.63 (39.07)	3.26 (0.439)	1.3 (0.2762)	2 (0.2608)	159.2 (23.81)	421.44 (40.07)	3.01 (0.04)	1.56 (0.0898)	26.76 (5.056)	1.36 (0.321)
G/G	100	0	53 (2.282)	16.71 (1.029)	44.87 (8.916)	70.73 (15.51)	118.7 (20.65)	3.24 (0.417)	1.2 (0.2856)	2.03 (0.2483)	151.06 (18.09)	468.6 (47.46)	3.10 (0.149)	1.81 (0.1171)	29.85 (3.431)	0.9 (0.074)
G/A	100	0	59 (2.967)	16.86 (1.487)	36 (10.75)	55.67 (15.92)	180 (79.48)	3.71 (0.5114)	1.63 (0.4826)	1.89 (0.3667)	268.3 (79.75)	443.6 (75.63)	3.47 (0.2327)	1.56 (0.1429)	35.45 (5.895)	1.51 (0.107)
<i>p</i> value	-	-	0.0563	0.9946	0.7944	0.8009	0.5107	0.7671	0.7181	0.9516	0.1054	0.8480	0.2425	0.2825	0.6952	0.1259
Allele	ALD - SNP rs6721961 (-178 A > G)															
	M %	F %	Age	MELD	ALT	AST	GGT	TB	DB	IB	ALP	LDH	ALB	INR	UR	CR
A/A	90	10	56.5 (3.212)	16.63 (1.101)	39.5 (7.058)	72.75 (10.37)	158.71 (60.2)	3.64 (0.3599)	1.63 (0.3632)	2.03 (0.3692)	267.62 (68.49)	381.42 (58.18)	3.3 (0.184)	1.5 (0.1257)	37 (4.687)	1.32 (0.269)
G/G	100	0	49.71 (1.957)	15 (0.7977)	40.18 (5.564)	58.94 (8.13)	115.7 (21.53)	2.63 (0.3742)	0.93 (0.1771)	1.87 (0.2752)	146.1 (16.06)	471.01 (49.53)	3.07 (0.1274)	1.7 (0.107)	32.04 (3.942)	0.84 (0.051)
A/G	100	0	57.14 (2.344)	17.36 (1.002)	43.73 (11.83)	59.85 (21.59)	120.5 (33.98)	3.74 (0.5585)	1.69 (0.4554)	1.92 (0.181)	126.5 (19.45)	470.8 (47.57)	3.18 (0.198)	1.68 (1.1344)	34.19 (2.451)	0.97 (0.086)
<i>p</i> value	-	-	0.0482	0.1959	0.9359	0.7991	0.7017	0.1677	0.2381	0.9141	0.0235	0.4332	0.6492	0.5050	0.6612	0.0623

M: male; F: female; MELD: Model for End-Stage Liver Disease; ALT: alanine transaminase; AST: aspartate transaminase; GGT: Gamma-glutamyltransferase; TB: total bilirubin; DB: direct bilirubin; IB: indirect bilirubin; ALP: alkaline phosphatase; LDH: lactate dehydrogenase; ALB: albumin; INR: international normalized ratio; UR: urea; CR: creatinine.

Finally, the association between histological findings and polymorphisms in the promoter region of NFE2L2 was evaluated after histological analysis of the hematoxylin and eosin (H&E)-stained ALD samples. Chronic liver disease can be divided in different stages of fibrosis levels and inflammatory activity [20]. All the ALD and HCV liver samples showed higher level of fibrosis, in such a way that just the inflammatory activity was scored (Figure 3A). For the SNP rs35652124 in the ALD samples (Figure 3B), we observed higher inflammatory activity for the alleles -274A/A and -274A/G (A/A: absent = 1 case; mild = 6 cases; moderate = 5 cases; severe = 1 case. A/G: absent = 3 cases; mild = 6 cases; moderate = 5 cases; severe = 3 cases). On the other hand, most of the samples with -274G/G allele showed attenuated inflammatory activity (G/G: absent = 1 case; mild = 3 cases; moderate = 2 cases; severe = 1 case). For the SNP rs6721961 -178A allele as a risk factor for liver damage, no difference was observed in the inflammatory activity (A/A: absent = 1 case; mild = 3 cases; moderate = 3 cases; severe = 2 case. A/G: absent = 2 cases; mild = 7 cases; moderate = 3 cases; severe = 1 cases. G/G: absent = 1 case; mild = 7 cases; moderate = 5 cases; severe = 2 case) (Figure 3C). The absence of correlation between the polymorphism and inflammatory activity was also observed for the SNP rs4893819 (A/A: absent = 0 case; mild = 5 cases; moderate = 2 cases; severe = 1 case. G/A: absent = 1 cases; mild = 4 cases; moderate = 4 cases; severe = 1 cases. G/G: absent = 2 case; mild = 6 cases; moderate = 6 cases; severe = 2 cases) (Figure 3D).

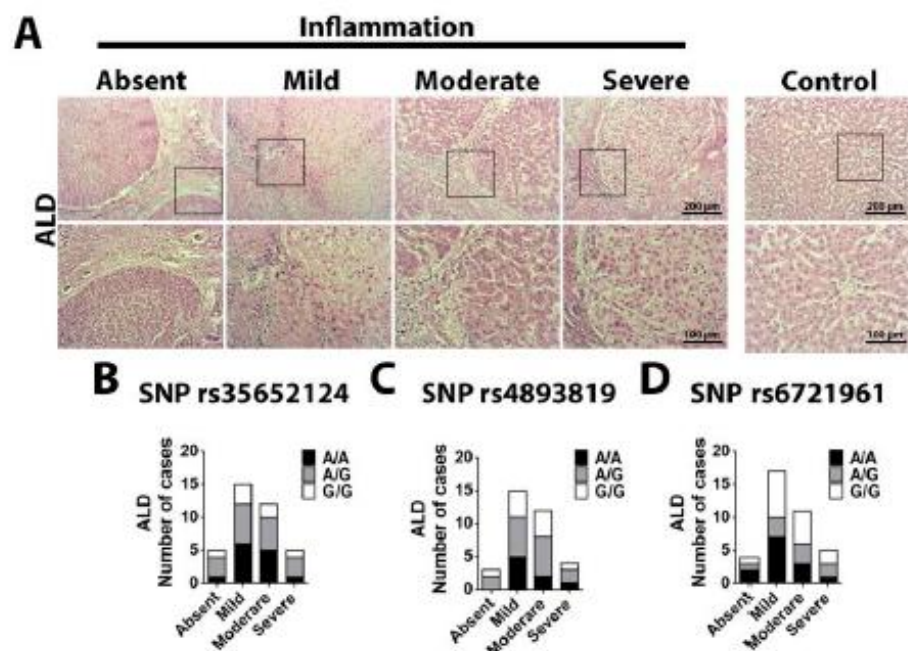


Figure 3. Inflammation score in the different polymorphism of NFE2L2 gene in patients with cirrhosis from ALD. (A) HE from ALD patients showing the score of inflammation. The METAVIR parameters are considered: A0 mean no inflammation activity; A1 means mild inflammatory activity; A2 means moderate inflammatory activity and A3 means intense inflammatory activity. (B) Number of cases in each inflammatory score considering the polymorphism SNP rs35652124. (C) Number of cases in each inflammatory score considering the polymorphism SNP rs4893819. (D) Number of cases in each inflammatory score considering the polymorphism SNP rs6721961 (n = 37 patients for SNP rs35652124; n = 37 patients for SNP rs6721961; and n = 34 patients for SNP rs4893819).

Together, these results suggest that polymorphism -274A in the promoter region of NFE2L2 gene is associated with worse inflammatory activity in ALD samples.

3. Discussion

Single nucleotide polymorphisms are the most common type of polymorphisms and occur at a frequency of approximately 1 in 1000 base pairs [21] throughout the genome (coding sequences, intronic sequences, and promoter region).

In this study, we established, for the first time, a specific and functional association between a SNP in the promoter region of the NFE2L2 gene and susceptibility to ALD. ALD can lead to cirrhosis, liver cancer, and liver failure, and is the most frequent indication for orthotopic liver transplantation in some populations [22]. Although the pathogenesis of ALD has not yet been fully elucidated, an interaction among behavioral, environmental and genetic factors is appreciated [22,23]. Most studies of the genetic predisposition to ALD have focused on genes related to cell metabolism and detoxifying enzymes [24–26]. Recently, genes for patatin-like phospholipase domain-containing protein 3 (PNPLA3), transmembrane 6 superfamily member 2 (TM6SF2) and membrane-bound O-acyltransferase domain-containing 7 (MBOAT7) have emerged as potential markers of susceptibility to develop alcohol-related liver injury [27]. These three proteins are involved in lipid metabolism, and therefore may also participate in the pathogenesis of ALD, because steatosis is the initial histological finding from alcohol overconsumption [27]. For example, PNPLA3 is expressed in hepatocytes, and functions as a lipase, catalyzing the hydrolysis of triglycerides [28]. SNP rs738409 in the PNPLA3 gene is strongly associated with the alcoholic hepatitis [29,30], alcoholic cirrhosis [31,32], hepatocellular carcinoma (HCC) and reduced transplantation-free survival [32–34], as well as non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) [27,35]. TM6SF2 is involved in very low-density lipoprotein (VLDL) secretion, and the rs58542926 variant has been associated with ALD cirrhosis [31], HCC [34], and NAFLD [36,37]. SNP rs10401969 of the TM6SF2 gene also correlates with ALD cirrhosis [31]. MBOAT7 catalyzes the transfer of fatty acids between phospholipids and lysophospholipids, and the SNP rs641738 is associated with higher risk of NAFLD [38] and inflammation and fibrosis in chronic hepatitis B [39], while rs626283 is correlated with ALD cirrhosis [31].

Generation of ROS is a common consequence of alcohol metabolism [23,40], which is counteracted by the Nrf2/ARE axis [41]. Nrf2 is a switch for the endogenous antioxidant response by activating its downstream target genes responsible for regulating oxidative stress and inactivating toxic chemicals and proteins [9,42–44]. Although a decline in Nrf2 expression has already been observed in older rodents [45] and in age-related neurodegenerative disorder in humans [46], which can contribute to the susceptibility to various diseases, the specimens selected for the current work were from patients with similar ages. Several endogenous mechanisms are responsible for reducing cellular oxidative stress through expression of antioxidant genes, such as glutathione-S-transferase (GST), coenzyme Q10 (Q10), NAD(P)Hiquinone oxidoreductase (QR), and superoxide dismutase 1 (SOD1) which have the common promoter element called the antioxidant response element [47]. Activation of Nrf2 as a response to cell injury has already been described in different liver cells and several liver diseases, such as cholestatic liver injury [16], viral hepatitis, drug-induced hepatitis, liver fibrosis, and cirrhosis, HCC, and alcoholic and non-alcoholic steatohepatitis [44]. For instance, impairment of acetaldehyde detoxification, aggravation of inflammatory response, and liver failure are key common events observed in ethanol-fed Nrf2 knock-out mice, confirming the importance of this transcriptional factor to prevent liver injury [12].

Several SNPs in the encoding region of the NFE2L2 gene, have already been associated with diseases characterized by oxidative stress and inflammation, including acute lung injury [48], chronic gastritis [49], gastric ulcer [50], ulcerative colitis [51], chronic obstructive pulmonary disease [52], and type 2 diabetes mellitus [15]. Our findings suggest that a variant of the NFE2L2 gene specifically correlates with ALD cirrhosis. Our findings show that the variant -274A in SNP rs35652124 correlates with the occurrence of ALD cirrhosis but not with HCV-associated cirrhosis. Additionally, we observed that this variant associates with reduced expression of Nrf2, followed by a more severe inflammatory condition, which is in agreement with previous studies showing that Nrf2-deficient mice exhibit worst liver damage induced by alcohol intake [12]. This polymorphism of NFE2L2 has also been implicated

in other diseases, such as Parkinson's disease (PD) [53], hypertension, and cardiovascular disease [54]. In PD, for example, 10 SNPs within the NFE2L2 gene, including 3 exonic SNPs, 2 intronic SNPs, 3 promoter SNPs, and 2 SNPs in 3' region of NFE2L2 gene were found [55].

In conclusion, our findings provide evidence that single nucleotide variations in the promoter region of NFE2L2, specifically the variant -274A of SNP rs35652124, might contribute to the pathogenesis of cirrhosis from ALD. In addition, the lower Nrf2 expression and severe inflammatory activity observed in patients carrying the -274A allele, suggest the potential relevance of this polymorphism in ALD susceptibility and in the progression of this disease

4. Materials and Methods

4.1. Human Specimens

Human liver tissue specimens and clinical data from 49 patients with ALD in the cirrhotic phase were collected from patients, with alcohol abstinence for at least 6 months, who underwent liver transplantation at Hospital das Clínicas, Federal University of Minas Gerais (UFMG), from 1998 to 2015. Eighteen liver specimens from patients with HCV and 21 liver biopsies from liver organ donors, from 2012 to 2017, were used for comparison to the ALD group (Table S1). The average age of the patients used in this study were similar among the groups (control: 49.5, ALD: 53.6, and HCV: 57.9; $p > 0.05$ one-way analysis of variance (ANOVA)). The study was approved on 31st may 2017 by the Research Ethics Committee of UFMG, CAAE 67814117.6.0000.5149. Written informed consent was obtained from all subjects.

4.2. Genotyping

SNP analysis of the variants present in the promoter region of NFE2L2 gene was performed in the liver specimens of ALD, HCV, and healthy groups. SNPs rs35652124 (-214 A > G), rs4893819 (-1275 G > A) and rs6721961 (-178 A > G) were analyzed in approximately 25 mg of paraffin-embedded hepatic tissues. Genomic DNA was extracted and purified with the DNeasy Blood & Tissue kit (Qiagen®, Hilden, North Rhine-Westphalia, Germany), in accordance with the manufacturer's instruction. For genotyping, the genomic DNA was incubated with rhAmp™ Genotyping Master Mix and rhAmp™ Reporter Mix and the primers (rhAmp™ SNP Assay) for the SNPs rs35652124, rs4893819, and rs6721961, according to the guidelines (Integrated DNA Technologies—IDT®, Coralville, Iowa, USA). The polymerase chain reaction (PCR) amplification was performed in the 7500 real-time PCR system (Thermo Fisher Scientific, Foster City, California, USA) under the following conditions: 95 °C for 10 minutes (1 cycle), 40 cycles at 95 °C for 10 sec., 60 °C for 30 sec., and 68 °C for 20 sec. The assay model was the rhAmp™ SNP Genotyping System, for qPCR-SNP (IDT®, Coralville, Iowa, USA).

4.3. Histopathological Analysis

Formalin-fixed, paraffin-embedded human liver specimens were sectioned at 4 µm thicknesses and stained with hematoxylin and eosin (H&E). The slides were evaluated under a light microscope (CX4; Olympus, Shinjuku, Tokyo, Japan) and the inflammatory cell infiltrate, polymorphonuclear leukocytes and mononuclear cells, in the epithelial and connective tissues was graded as absent—no inflammation activity; mild inflammatory activity; moderate inflammatory activity; and intense inflammatory activity, by an experienced pathologist, in a blinded fashion [20].

4.4. Immunohistochemistry

Immunohistochemistry was performed using formalin-fixed, paraffin-embedded human liver specimens with the Novolink Polymer Detection Kit (Leica Biosystems, Benton Lane, Newcastle, UK). Four µm-thick sections were dewaxed, and antigen retrieval was performed in citrate buffer 1 mM (pH 6.0). Following peroxidase and protein block, specimens were incubated with anti-Nrf2 (Abcam, Cambridge, MA, USA) and anti-SOD1 (Santa Cruz, Dallas, TX, USA) antibody overnight at room temperature. Reactions were revealed by applying 3,3'-diaminobenzidine (DAB). To compare Nrf2 expression in ALD,

HCV, and healthy groups, images were converted to 8-bit. Regions of interest were selected and pixel intensity (0–255, grayscale) was measured in Image J software (Bethesda, Maryland, USA) [56].

4.5. Statistical Analysis

Results are presented as mean \pm SEM. Data were analyzed using GraphPad Prism software (version 7; GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Differences among experimental groups were assessed for significance $p < 0.05$, using the Student's t-test or one-way ANOVA followed by Bonferroni post-test.

Supplementary Materials: Supplementary materials can be found at <http://www.mdpi.com/1422-0067/20/14/3589/s1>.

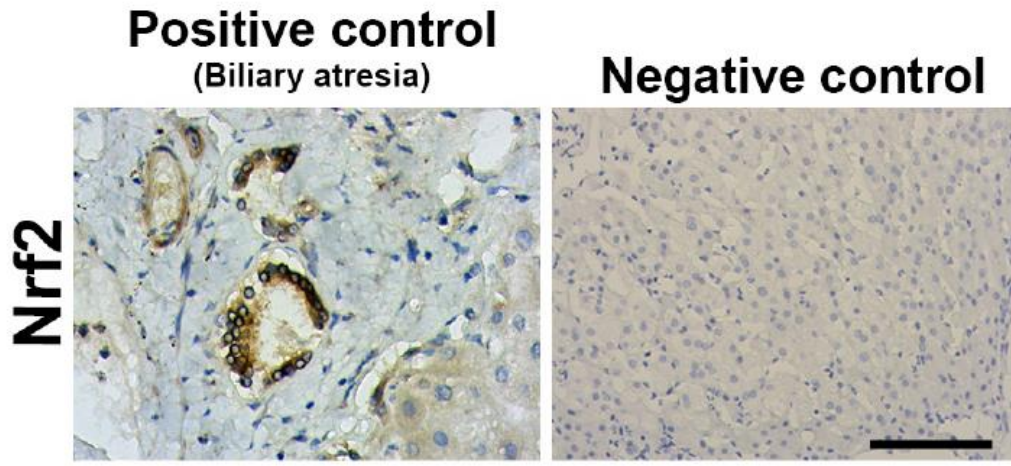
Author Contributions: K.N.d.S., R.M.F. and M.E.L. conceived the project. K.N.d.S., R.M.F., A.E., A.C.M.L.F., M.L.d.S., D.M., M.d.C.F. and E.d.O.L. conducted experiments. K.N.d.S., R.M.F., A.E., A.C.M.L.F., M.L.d.S. and D.M. analyzed data. I.B.C., P.V.T.V., M.H.N. and M.E.L. contributed with reagents/materials/analysis tools. E.d.O.L. and M.d.C.F. wrote the first draft of the manuscript. M.d.C.F., M.H.N., E.d.O.L. and M.E.L. edited the manuscript. All authors agreed to the final version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq 159892/2018-0), Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP 2018/20014-0), Liver Center at UFMG, NIH (DK57751, DK34989, DK114041, and DK112797 to MHN). This work also was supported by the Gladys Phillips Crofoot Professorship.

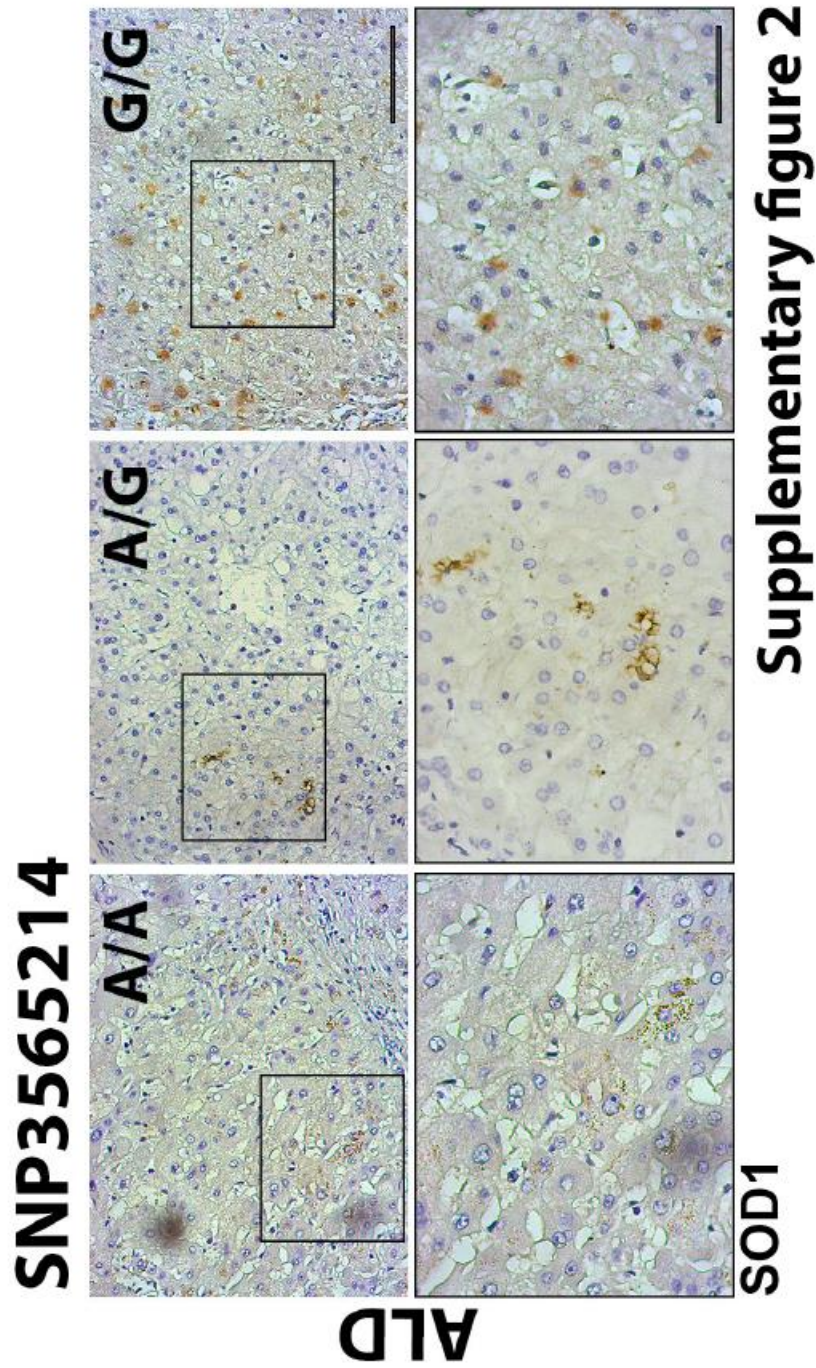
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

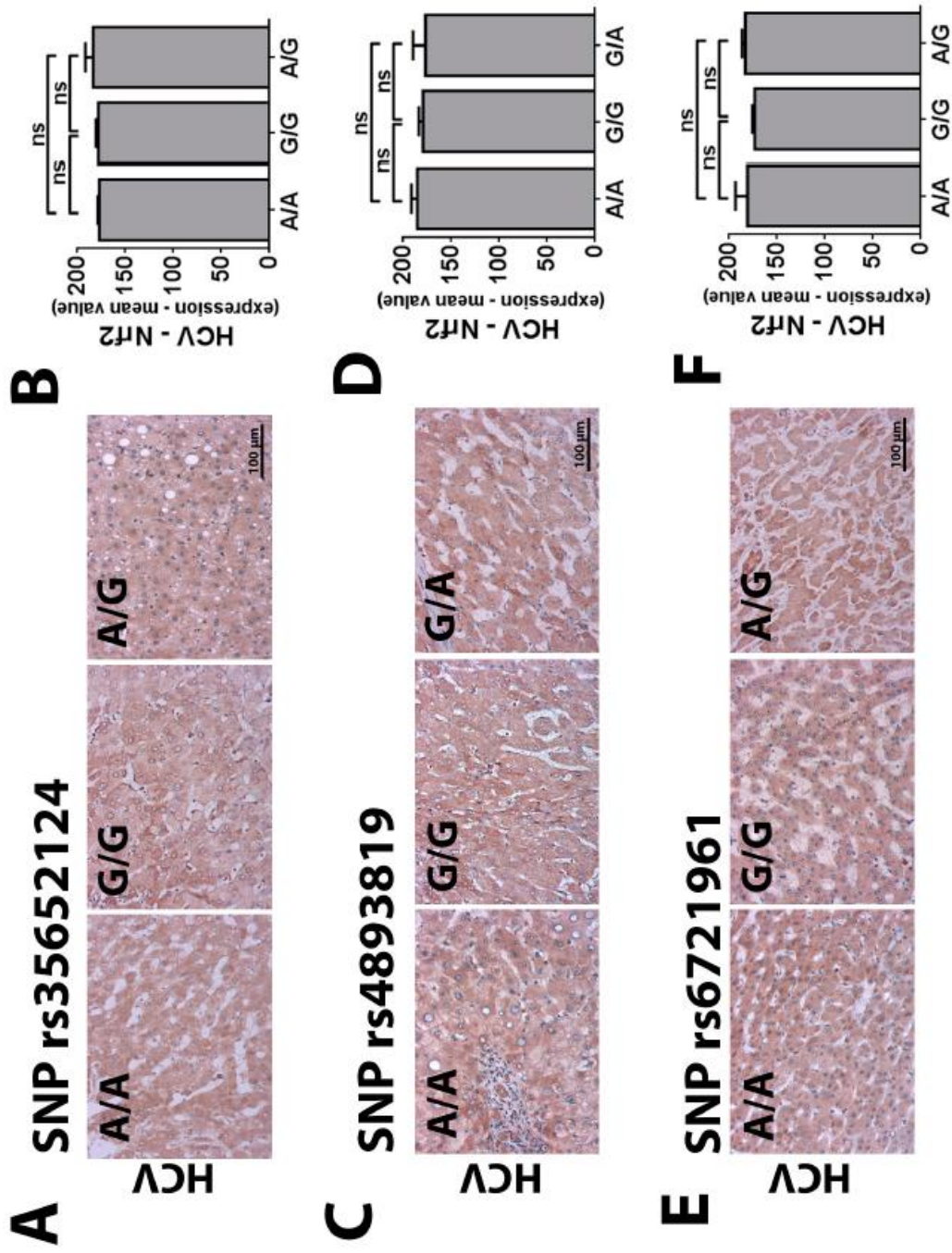
Abbreviations

ALD	Alcoholic Liver Disease
ROS	Reactive Oxygen Species
Nrf2	Nuclear erythroid-related factor 2
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
NFE2L2	Nuclear erythroid-related factor 2 gene
HCV	Hepatitis C virus
A	Adenine
G	Guanine
PNPLA3	Patatin-like phospholipase domain-containing protein 3
TM6SF2	Transmembrane 6 superfamily member 2
MBOAT7	Membrane-bound O-acyltransferase domain-containing 7
HCC	Hepatocellular carcinoma
NAFLD	Non-alcoholic fatty liver disease
VLDL	Very low-density lipoprotein
ARE	Antioxidant response element
GST	Glutathione-S-transferase
Q10	Coenzyme Q10
QR	NAD(P)H:quinone oxidoreductase
SOD1	Superoxide dismutase 1
PD	Parkinson's disease
M	Male
F	Female
MELD	Model for End-Stage Liver Disease
ALT	Alanine transaminase
AST	Aspartate transaminase
GGT	Gamma-glutamyltransferase
TB	Total bilirubin
DB	Direct bilirubin
IB	Indirect bilirubin
ALP	Alkaline phosphatase
LDH	Lactate dehydrogenase
ALB	Albumin
INR	International normalized ratio
UR	Urea
CR	Creatinine



Supplementary figure 1





Supplementary figure 3

Supplementary Table 1: Clinical data of the groups

	ALD (49 patients)	HCV (18 patients)	Control (21 patients)
MALE (%)	97,68	81,25	25
FEMALE (%)	2,32	18,75	75
AGE (years)	53,62	57,87	49,5
MELD	16,51	14,3	7,75
ALT (U/mL)	41,26	98,38	20,5
AST (U/mL)	62,82	106,39	39,75
GGT	125,96	134,3	64,5
TB (mg/dL)	3,37	3,28	0,57
DB (mg/dL)	1,42	1,47	0,25
IB (mg/dL)	1,98	1,81	0,32
ALD	173,59	156,91	110,25
LDH	439,25	476,62	-
ALB	3,2	3,17	-
INR	1,67	1,5	-
UREA	33,7	23,9	31,75
CREATININE	1,04	0,77	0,91

Supplementary Table 2: allele frequencies compared to clinical data of Alcoholic liver disease (ALD)/hepatitis C virus (HCV) - SNP rs35652124 (-214 A >

G)

	ALD		HCV		p value	ALD		HCV		p value	ALD		HCV		p value
	A/A	A/A	A/A	A/A		G/G	G/G	G/G	G/G		A/G	A/G	A/G	A/G	
MALE %	94,45	100	100	80	-	100	80	100	80	-	100	80	80	-	-
FEMALE %	5,55	0	0	20	-	0	20	0	20	-	0	20	20	-	-
AGE	53,61 (2,057)	51 (0)	55,25 (3,304)	60,4 (3,01)	0,6844	55,25 (3,304)	60,4 (3,01)	52,21 (2,924)	57,4 (4,007)	0,3101	52,21 (2,924)	57,4 (4,007)	57,4 (4,007)	0,3568	0,3568
MELD	16,54 (1,101)	19,5 (4,5)	16 (0,7559)	14 (0)	0,3706	16 (0,7559)	14 (0)	17 (1,075)	12 (2,646)	0,2199	17 (1,075)	12 (2,646)	12 (2,646)	0,0612	0,0612
ALT	46,25 (11,02)	73,5 (3,5)	51,71 (4,46)	135,5 (0,5)	0,3488	51,71 (4,46)	135,5 (0,5)	30,47 (5,188)	75,5 (18,05)	<0,0001	30,47 (5,188)	75,5 (18,05)	75,5 (18,05)	0,0052	0,0052
AST	76,92 (19,03)	151 (26,05)	77,34 (13,1)	123 (14)	0,1558	77,34 (13,1)	123 (14)	39,94 (4,364)	82,75 (21,26)	0,1277	39,94 (4,364)	82,75 (21,26)	82,75 (21,26)	0,0093	0,0093
GGT	114,8 (21,65)	84,5 (7,8)	212 (56,35)	85,5 (24,5)	0,5917	212 (56,35)	85,5 (24,5)	88,35 (27,72)	131 (46,69)	0,2926	88,35 (27,72)	131 (46,69)	131 (46,69)	0,4427	0,4427
TB	3,272 (0,3964)	4,485 (3,285)	3,437 (0,5941)	3,25 (0,85)	0,4118	3,437 (0,5941)	3,25 (0,85)	3,363 (0,5608)	2,88 (1,003)	0,8826	3,363 (0,5608)	2,88 (1,003)	2,88 (1,003)	0,6641	0,6641
DB	1,203 (0,2407)	2,665 (2,565)	1,681 (0,505)	1,1 (0,3)	0,1717	1,681 (0,505)	1,1 (0,3)	1,426 (0,4408)	0,9225 (0,1118)	0,5792	1,426 (0,4408)	0,9225 (0,1118)	0,9225 (0,1118)	0,4516	0,4516
IB	2,051 (0,3092)	1,82 (0,72)	1,794 (0,1932)	2,15 (0,55)	0,7818	1,794 (0,1932)	2,15 (0,55)	2,049 (0,2102)	1,958 (0,9039)	0,4520	2,049 (0,2102)	1,958 (0,9039)	1,958 (0,9039)	0,8957	0,8957
FALK	214,2 (39,73)	226,2 (125,8)	191,3 (51,58)	102,5 (74,5)	0,9153	191,3 (51,58)	102,5 (74,5)	125,6 (16,44)	165,7 (52,37)	0,4308	125,6 (16,44)	165,7 (52,37)	165,7 (52,37)	0,3413	0,3413
LDH	460,2 (48,82)	450,5 (231,5)	468,6 (57,1)	394,5 (191,5)	0,9478	468,6 (57,1)	394,5 (191,5)	421 (46,45)	436,2 (125)	0,6175	421 (46,45)	436,2 (125)	436,2 (125)	0,8892	0,8892
ALB	3,12 (0,1612)	3,01 (0,19)	3,071 (0,1686)	2,9 (0,5)	0,8012	3,071 (0,1686)	2,9 (0,5)	3,258 (0,1566)	3,25 (0,1708)	0,6769	3,258 (0,1566)	3,25 (0,1708)	3,25 (0,1708)	0,9773	0,9773
INR	1,682 (0,09848)	2,23 (0,26)	1,487 (0,08501)	1,33 (0,08)	0,0636	1,487 (0,08501)	1,33 (0,08)	1,824 (0,1526)	1,313 (0,1151)	0,3872	1,824 (0,1526)	1,313 (0,1151)	1,313 (0,1151)	0,0780	0,0780
UREA	27,77 (2,699)	18,5 (2,5)	34,73 (4,387)	26,5 (1,5)	0,2168	34,73 (4,387)	26,5 (1,5)	38,05 (3,144)	26,25 (1,887)	0,3727	38,05 (3,144)	26,25 (1,887)	26,25 (1,887)	0,0494	0,0494
CREATININE	1,048 (0,1839)	0,92 (0,05)	0,9571 (0,1129)	0,85 (0,05)	0,7960	0,9571 (0,1129)	0,85 (0,05)	0,9927 (0,06683)	0,78 (0,07439)	0,6453	0,9927 (0,06683)	0,78 (0,07439)	0,78 (0,07439)	0,1020	0,1020

Supplementary Table 3: allele frequencies compared to clinical data of Alcoholic liver disease (ALD)/hepatitis C virus (HCV) - SNP rs4893819 (-1275 G >

A)

	ALD		HCV		p value	ALD		HCV		p value	ALD		HCV		p value
	A/A	A/A	A/A	A/A		G/G	G/G	G/A	G/A		G/G	G/G	G/A	G/A	
MALE	88,89	100	100	100	-	100	100	100	100	-	100	100	100	100	-
FEMALE	11.11	0	0	0	-	0	0	0	0	-	0	0	0	0	-
AGE	48,33 (2,809)	60 (9)	53 (2,282)	55 (2,91)	0,1319	53 (2,282)	55 (2,91)	59 (2,967)	63 (3)	0,6416	59 (2,967)	63 (3)	63 (3)	63 (3)	0,5626
MELD	16,67 (0,802)	13,5 (1,5)	16,71 (1,029)	12 (1,581)	0,0996	16,71 (1,029)	12 (1,581)	16,86 (1,487)	15,5 (1,5)	0,0406	16,86 (1,487)	15,5 (1,5)	15,5 (1,5)	15,5 (1,5)	0,6637
ALT	46,2 (5,275)	25 (2)	44,87 (8,916)	89,33 (12,33)	0,0710	44,87 (8,916)	89,33 (12,33)	36 (10,75)	110 (26)	0,0500	36 (10,75)	110 (26)	110 (26)	110 (26)	0,0187
AST	60,05 (11,8)	56,5 (13,5)	70,73 (15,51)	112 (15,32)	0,8796	70,73 (15,51)	112 (15,32)	55,67 (15,92)	105,5 (31,5)	0,2080	55,67 (15,92)	105,5 (31,5)	105,5 (31,5)	105,5 (31,5)	0,1777
GGT	112,6 (39,07)	187,5 (67,5)	118,7 (20,65)	105,4 (13,39)	0,3748	118,7 (20,65)	105,4 (13,39)	180 (79,48)	47,5 (13,5)	0,7525	180 (79,48)	47,5 (13,5)	47,5 (13,5)	47,5 (13,5)	0,3968
TB	3,263 (0,439)	2,125 (0,375)	3,249 (0,417)	2,13 (0,6742)	0,2148	3,249 (0,417)	2,13 (0,6742)	3,71 (0,5114)	4,1 (1,7)	0,2132	3,71 (0,5114)	4,1 (1,7)	4,1 (1,7)	4,1 (1,7)	0,7625
DB	1,305 (0,276)	0,85 (0,15)	1,205 (0,2856)	0,7475 (0,266)	0,4060	1,205 (0,2856)	0,7475 (0,266)	1,63 (0,4826)	1 (0,2)	0,4271	1,63 (0,4826)	1 (0,2)	1 (0,2)	1 (0,2)	0,4742
IB	2,003 (0,260)	1,275 (0,225)	2,038 (0,2483)	1,383 (0,4633)	0,1860	2,038 (0,2483)	1,383 (0,4633)	1,898 (0,3667)	3,1 (1,5)	0,2311	1,898 (0,3667)	3,1 (1,5)	3,1 (1,5)	3,1 (1,5)	0,2846
FALK	159,2 (23,81)	227 (94)	151,1 (18,09)	129,8 (17,59)	0,3164	151,1 (18,09)	129,8 (17,59)	268,3 (79,75)	64 (36)	0,5698	268,3 (79,75)	64 (36)	64 (36)	64 (36)	0,2354
LDH	421,4 (40,07)	368,5 (199,5)	468,6 (47,46)	436,4 (110,4)	0,6896	468,6 (47,46)	436,4 (110,4)	443,6 (75,63)	419 (216)	0,7648	443,6 (75,63)	419 (216)	419 (216)	419 (216)	0,8909
ALB	3,017 (0,040)	3,1 (0,1)	3,107 (0,1493)	3,15 (0,263)	0,3758	3,107 (0,1493)	3,15 (0,263)	3,471 (0,2327)	3,1 (0,3)	0,8940	3,471 (0,2327)	3,1 (0,3)	3,1 (0,3)	3,1 (0,3)	0,4596
INR	1,56 (0,0898)	1,51 (0,09)	1,811 (0,1171)	1,378 (0,2028)	0,7779	1,811 (0,1171)	1,378 (0,2028)	1,553 (0,1647)	1,385 (0,025)	0,1017	1,553 (0,1647)	1,385 (0,025)	1,385 (0,025)	1,385 (0,025)	0,6199
UREA	30,93 (3,372)	20,5 (0,5)	31,73 (3,067)	24 (2,799)	0,1413	31,73 (3,067)	24 (2,799)	35,71 (4,704)	28,5 (0,5)	0,2298	35,71 (4,704)	28,5 (0,5)	28,5 (0,5)	28,5 (0,5)	0,4606
CREATININE	1,313 (0,374)	0,65 (0,01)	0,8513 (0,060)	0,8875 (0,037)	0,3693	0,8513 (0,060)	0,8875 (0,037)	1,083 (0,0953)	0,75 (0,05)	0,7695	1,083 (0,0953)	0,75 (0,05)	0,75 (0,05)	0,75 (0,05)	0,1207

Supplementary Table 4: allele frequencies compared to clinical data of Alcoholic liver disease (ALD)/hepatitis C virus (HCV) - SNP rs6721961(-178 A > G)

	ALD		HCV		p value	ALD		HCV		p value	ALD		HCV		p value
	A/A	A/A	A/A	A/A		G/G	G/G	A/G	A/G		A/G	A/G			
MALE	90	66,66	100	100	-	100	100	87,5	87,5	-	100	100	87,5	87,5	-
FEMALE	10	33,33	0	0	-	0	0	12,5	12,5	-	0	0	12,5	12,5	-
AGE	56,5 (3,212)	60,67 (1,202)	49,71 (1,957)	40,33 (7,446)	0,3493	49,71 (1,957)	40,33 (7,446)	57,5 (2,86)	57,5 (2,86)	0,1039	57,14 (2,344)	57,5 (2,86)	57,5 (2,86)	57,5 (2,86)	0,9257
MELD	16,63 (1,101)	13 (2,121)	15 (0,7977)	11 (2,517)	0,1208	15 (0,7977)	11 (2,517)	17,36 (1,002)	15,4 (2,731)	0,0632	17,36 (1,002)	15,4 (2,731)	15,4 (2,731)	15,4 (2,731)	0,4122
ALT	39,5 (7,058)	110,9 (35,16)	40,18 (5,564)	15 (1)	0,0196	40,18 (5,564)	15 (1)	43,73 (11,83)	88,4 (12,11)	0,0993	43,73 (11,83)	88,4 (12,11)	88,4 (12,11)	88,4 (12,11)	0,0382
AST	72,75 (10,37)	92 (18,91)	58,94 (8,13)	54 (27,62)	0,3508	58,94 (8,13)	54 (27,62)	59,85 (21,59)	117,4 (19,7)	0,8146	59,85 (21,59)	117,4 (19,7)	117,4 (19,7)	117,4 (19,7)	0,1228
GGT	158,7 (60,2)	108,8 (21,86)	115,7 (21,53)	77 (16,5)	0,5622	115,7 (21,53)	77 (16,5)	120,5 (33,98)	159,6 (94,09)	0,4047	120,5 (33,98)	159,6 (94,09)	159,6 (94,09)	159,6 (94,09)	0,6300
TB	3,648 (0,3599)	2,645 (0,6874)	2,632 (0,3742)	1,74 (1,18)	0,1804	2,632 (0,3742)	1,74 (1,18)	3,745 (0,5585)	3,64 (1,342)	0,3497	3,745 (0,5585)	3,64 (1,342)	3,64 (1,342)	3,64 (1,342)	0,9317
DB	1,631 (0,3632)	1,325 (0,6295)	0,934 (0,1771)	0,586 (0,4093)	0,6585	0,934 (0,1771)	0,586 (0,4093)	1,698 (0,4554)	1,608 (0,9225)	0,3902	1,698 (0,4554)	1,608 (0,9225)	1,608 (0,9225)	1,608 (0,9225)	0,9225
IB	2,039 (0,3692)	1,32 (0,3656)	1,871 (0,2752)	1,153 (0,7764)	0,2358	1,871 (0,2752)	1,153 (0,7764)	1,929 (0,181)	2,032 (0,7362)	0,2868	1,929 (0,181)	2,032 (0,7362)	2,032 (0,7362)	2,032 (0,7362)	0,8579
FALK	267,6 (68,49)	173,4 (31,02)	146,1 (16,06)	130,3 (26,57)	0,3748	146,1 (16,06)	130,3 (26,57)	126,5 (19,45)	139,7 (55,29)	0,6604	126,5 (19,45)	139,7 (55,29)	139,7 (55,29)	139,7 (55,29)	0,7789
LDH	381,4 (58,18)	547,2 (135,2)	471 (49,53)	585,5 (0,5)	0,2128	471 (49,53)	585,5 (0,5)	470,8 (47,57)	412,4 (102,8)	0,3622	470,8 (47,57)	412,4 (102,8)	412,4 (102,8)	412,4 (102,8)	0,5645
ALB	3,308 (0,184)	3,25 (0,1555)	3,075 (0,1274)	2,35 (0,05)	0,8448	3,075 (0,1274)	2,35 (0,05)	3,185 (0,198)	3,264 (0,2381)	0,0445	3,185 (0,198)	3,264 (0,2381)	3,264 (0,2381)	3,264 (0,2381)	0,8187
INR	1,505 (0,1257)	1,383 (0,1684)	1,706 (0,107)	1,245 (0,005)	0,5802	1,706 (0,107)	1,245 (0,005)	1,685 (0,1344)	1,66 (0,2535)	0,1148	1,685 (0,1344)	1,66 (0,2535)	1,66 (0,2535)	1,66 (0,2535)	0,9236
UREA	37 (4,687)	22,25 (3,945)	32,04 (3,942)	35,33 (8,413)	0,0706	32,04 (3,942)	35,33 (8,413)	34,19 (2,451)	25 (2,811)	0,7177	34,19 (2,451)	25 (2,811)	25 (2,811)	25 (2,811)	0,0428
CREATININE	1,326 (0,2696)	0,67 (0,1338)	0,8442 (0,051)	1,047 (0,5133)	0,1326	0,8442 (0,051)	1,047 (0,5133)	0,9727 (0,086)	0,842 (0,0446)	0,4299	0,9727 (0,086)	0,842 (0,0446)	0,842 (0,0446)	0,842 (0,0446)	0,3436

References

1. Singal, A.K.; Bataller, R.; Ahn, J.; Kamath, P.S.; Shah, V.H. ACG clinical guideline: Alcoholic liver disease. *Am. J. Gastroenterol.* **2018**, *113*, 175–194. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Thursz, M.; Kamath, P.S.; Mathurin, P.; Szabo, G.; Shah, V.H.; Szabo, G.; Kamath, P.S.; Shah, V.H.; Thursz, M.; Mathurin, P.; et al. Alcohol-related liver disease: Areas of consensus, unmet needs and opportunities for further study. *J. Hepatol.* **2019**, *70*, 521–530. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Asrani, S.K.; Devarbhavi, H.; Eaton, J.; Kamath, P.S. Burden of liver diseases in the world. *J. Hepatol.* **2019**, *70*, 151–171. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Ceni, E.; Mello, T.; Galli, A. Pathogenesis of alcoholic liver disease: Role of oxidative metabolism. *World J. Gastroenterol.* **2014**, *20*, 17756–17772. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Gao, B.; Tsukamoto, H. Inflammation in alcoholic and nonalcoholic fatty liver disease: Friend or foe? *Gastroenterology* **2016**, *150*, 1704–1709. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Iranshahy, M.; Iranshahi, M.; Abtahi, S.R.; Karimi, G. The role of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 in hepatoprotective activity of natural products: A review. *Food Chem. Toxicol.* **2018**, *120*, 261–276. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Vomund, S.; Schafer, A.; Parnham, M.J.; Brune, B.; von Knethen, A. Nrf2, the master regulator of anti-oxidative responses. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 2772. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Bellezza, I. Oxidative stress in age-related macular degeneration: Nrf2 as therapeutic target. *Front. Pharmacol.* **2018**, *9*, 1280. [[CrossRef](#)]
9. Hennig, P.; Garstkiewicz, M.; Grossi, S.; Di Filippo, M.; French, L.E.; Beer, H.D. The crosstalk between Nrf2 and inflammasomes. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 562. [[CrossRef](#)]
10. Li, N.; Nel, A.E. Role of the Nrf2-mediated signaling pathway as a negative regulator of inflammation: Implications for the impact of particulate pollutants on asthma. *Antioxid Redox Signal* **2006**, *8*, 88–98. [[CrossRef](#)]
11. Lu, C.; Xu, W.; Zhang, E.; Shao, J.; Zheng, S. Nrf2 knockdown disrupts the protective effect of curcumin on alcohol-induced hepatocyte necroptosis. *Mol. Pharm.* **2016**, *13*, 4043–4053. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Lamle, J.; Marhenke, S.; Borlak, J.; von Wasielewski, R.; Eriksson, C.J.; Geffers, R.; Manns, M.P.; Yamamoto, M.; Vogel, A. Nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 prevents alcohol-induced fulminant liver injury. *Gastroenterology* **2008**, *134*, 1159–1168. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Kim, S.S.; Eun, J.W.; Cho, H.J.; Lee, H.Y.; Seo, C.W.; Noh, C.K.; Shin, S.J.; Lee, K.M.; Cho, S.W.; Cheong, J.Y. Effect of fibroblast growth factor-2 and its receptor gene polymorphisms on the survival of patients with hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma. *Anticancer Res.* **2019**, *39*, 2217–2226. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Zhang, Y.; Gong, X.; Yin, Z.; Cui, L.; Yang, J.; Wang, P.; Zhou, Y.; Jiang, X.; Wei, S.; Wang, F.; et al. Association between NRG1 gene polymorphism and resting-state hippocampal functional connectivity in schizophrenia. *BMC Psychiatry* **2019**, *19*, 108. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Wang, X.; Chen, H.; Liu, J.; Ouyang, Y.; Wang, D.; Bao, W.; Liu, L. Association between the NF-E2 related factor 2 gene polymorphism and oxidative stress, anti-oxidative status, and newly-diagnosed type 2 diabetes mellitus in a Chinese population. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16*, 16483–16496. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Weerachayaphorn, J.; Amaya, M.J.; Spirli, C.; Chansela, P.; Mitchell-Richards, K.A.; Ananthanarayanan, M.; Nathanson, M.H. Nuclear factor, Erythroid 2-Like 2 regulates expression of type 3 Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor and calcium signaling in cholangiocytes. *Gastroenterology* **2015**, *149*, 211–222.e10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Purdom-Dickinson, S.E.; Sheveleva, E.V.; Sun, H.; Chen, Q.M. Translational control of nrf2 protein in activation of antioxidant response by oxidants. *Mol. Pharmacol.* **2007**, *72*, 1074–1081. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Covas, G.; Marinho, H.S.; Cyrne, L.; Antunes, F. Activation of Nrf2 by H₂O₂: De Novo Synthesis Versus Nuclear Translocation. In *Methods in Enzymology*; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2013; Volume 528, pp. 157–171.
19. Milani, P.; Gagliardi, S.; Cova, E.; Cereda, C. SOD1 transcriptional and posttranscriptional regulation and its potential implications in ALS. *Neurol. Res. Int.* **2011**, *2011*, 458427. [[CrossRef](#)]

20. Shasthry, S.M.; Rastogi, A.; Bihari, C.; Vijayaraghavan, R.; Arora, V.; Sharma, M.K.; Sarin, S.K. Histological activity score on baseline liver biopsy can predict non-response to steroids in patients with severe alcoholic hepatitis. *Virchows Arch.* **2018**, *472*, 667–675. [[CrossRef](#)]
21. Brookes, A.J. The essence of SNPs. *Gene* **1999**, *234*, 177–186. [[CrossRef](#)]
22. Stickel, F.; Datz, C.; Hampe, J.; Bataller, R. Pathophysiology and management of alcoholic liver disease: Update 2016. *Gut Liver* **2017**, *11*, 173–188. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Magdaleno, E.; Blajszczak, C.C.; Nieto, N. Key events participating in the pathogenesis of alcoholic liver disease. *Biomolecules* **2017**, *7*, 9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Reed, T.; Page, W.F.; Viken, R.J.; Christian, J.C. Genetic predisposition to organ-specific endpoints of alcoholism. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **1996**, *20*, 1528–1533. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Toth, R.; Fiatal, S.; Petrovski, B.; McKee, M.; Adany, R. Combined effect of ADH1B RS1229984, RS2066702 and ADH1C RS1693482/RS698 alleles on alcoholism and chronic liver diseases. *Dis. Markers* **2011**, *31*, 267–277. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Zhang, Y.; Guo, T.; Yang, F.; Mao, Y.; Li, L.; Liu, C.; Sun, Q.; Li, Y.; Huang, J. Single-nucleotide rs738409 polymorphisms in the PNPLA3 gene are strongly associated with alcoholic liver disease in Han Chinese males. *Hepatol. Int.* **2018**, *12*, 429–437. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Anstee, Q.M.; Daly, A.K.; Day, C.P. Genetics of alcoholic liver disease. *Semin. Liver Dis.* **2015**, *35*, 361–374. [[PubMed](#)]
28. BasuRay, S.; Wang, Y.; Smagris, E.; Cohen, J.C.; Hobbs, H.H. Accumulation of PNPLA3 on lipid droplets is the basis of associated hepatic steatosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2019**, *116*, 9521–9526. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Liangpunsakul, S.; Puri, P.; Shah, V.H.; Kamath, P.; Sanyal, A.; Urban, T.; Ren, X.; Katz, B.; Radaeva, S.; Chalasani, N.; et al. Effects of age, sex, body weight, and quantity of alcohol consumption on occurrence and severity of alcoholic hepatitis. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **2016**, *14*, 1831–1838.e3. [[CrossRef](#)]
30. Atkinson, S.R.; Way, M.J.; McQuillin, A.; Morgan, M.Y.; Thursz, M.R. Homozygosity for rs738409:G in PNPLA3 is associated with increased mortality following an episode of severe alcoholic hepatitis. *J. Hepatol.* **2017**, *67*, 120–127. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Buch, S.; Stickel, F.; Trépo, E.; Way, M.; Herrmann, A.; Nischalke, H.D.; Brosch, M.; Rosendahl, J.; Berg, T.; Ridinger, M.; et al. A genome-wide association study confirms PNPLA3 and identifies TM6SF2 and MBOAT7 as risk loci for alcohol-related cirrhosis. *Nat. Genet.* **2015**, *47*, 1443. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Salameh, H.; Raff, E.; Erwin, A.; Seth, D.; Nischalke, H.D.; Falletti, E.; Burza, M.A.; Leathert, J.; Romeo, S.; Molinaro, A.; et al. PNPLA3 gene polymorphism is associated with predisposition to and severity of alcoholic liver disease. *Am. J. Gastroenterology* **2015**, *110*, 846–856. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Friedrich, K.; Wannhoff, A.; Kattner, S.; Brune, M.; Hov, J.R.; Weiss, K.H.; Antoni, C.; Dollinger, M.; Neumann-Haefelin, C.; Seufferlein, T.; et al. PNPLA3 in end-stage liver disease: Alcohol consumption, hepatocellular carcinoma development, and transplantation-free survival. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **2014**, *29*, 1477–1484. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Falletti, E.; Cussigh, A.; Cmet, S.; Fabris, C.; Toniutto, P. PNPLA3 rs738409 and TM6SF2 rs58542926 variants increase the risk of hepatocellular carcinoma in alcoholic cirrhosis. *Dig. Liver Dis.* **2016**, *48*, 69–75. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Goossens, N.; Hoshida, Y. Is hepatocellular cancer the same disease in alcoholic and nonalcoholic fatty liver diseases? *Gastroenterology* **2016**, *150*, 1710–1717. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Sookoian, S.; Castano, G.O.; Scian, R.; Mallardi, P.; Fernandez Gianotti, T.; Burgueno, A.L.; San Martino, J.; Pirola, C.J. Genetic variation in transmembrane 6 superfamily member 2 and the risk of nonalcoholic fatty liver disease and histological disease severity. *Hepatology* **2015**, *61*, 515–525. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Goffredo, M.; Caprio, S.; Feldstein, A.E.; D'Adamo, E.; Shaw, M.M.; Pierpont, B.; Savoye, M.; Zhao, H.; Bale, A.E.; Santoro, N. Role of TM6SF2 rs58542926 in the pathogenesis of nonalcoholic pediatric fatty liver disease: A multiethnic study. *Hepatology* **2016**, *63*, 117–125. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Mancina, R.M.; Dongiovanni, P.; Petta, S.; Pingitore, P.; Meroni, M.; Rametta, R.; Boren, J.; Montalcini, T.; Pujia, A.; Wiklund, O.; et al. The MBOAT7-TMC4 variant rs641738 increases risk of nonalcoholic fatty liver disease in individuals of European descent. *Gastroenterology* **2016**, *150*, 1219–1230. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Thabet, K.; Chan, H.L.Y.; Petta, S.; Mangia, A.; Berg, T.; Boonstra, A.; Brouwer, W.P.; Abate, M.L.; Wong, V.W.; Nazmy, M.; et al. The membrane-bound O-acyltransferase domain-containing 7 variant rs641738 increases inflammation and fibrosis in chronic hepatitis B. *Hepatology* **2017**, *65*, 1840–1850. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

40. Meroni, M.; Longo, M.; Rametta, R.; Dongiovanni, P. Genetic and epigenetic modifiers of alcoholic liver disease. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 3857. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Bataille, A.M.; Manautou, J.E. Nrf2: A potential target for new therapeutics in liver disease. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2012**, *92*, 340–348. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Xu, D.; Xu, M.; Jeong, S.; Qian, Y.; Wu, H.; Xia, Q.; Kong, X. The role of Nrf2 in liver disease: Novel molecular mechanisms and therapeutic approaches. *Front. Pharmacol.* **2018**, *9*, 1428. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Zhao, N.; Guo, F.F.; Xie, K.Q.; Zeng, T. Targeting Nrf-2 is a promising intervention approach for the prevention of ethanol-induced liver disease. *Cell. Mol. Life Sci.* **2018**, *75*, 3143–3157. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Shin, S.M.; Yang, J.H.; Ki, S.H. Role of the Nrf2-ARE pathway in liver diseases. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2013**, *2013*, 763257. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Suh, J.H.; Shenvi, S.V.; Dixon, B.M.; Liu, H.; Jaiswal, A.K.; Liu, R.M.; Hagen, T.M. Decline in transcriptional activity of Nrf2 causes age-related loss of glutathione synthesis, which is reversible with lipoic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 3381–3386. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Niedzielska, E.; Smaga, I.; Gawlik, M.; Moniczewski, A.; Stankowicz, P.; Pera, J.; Filip, M. Oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Mol. Neurobiol.* **2016**, *53*, 4094–4125. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Kensler, T.W.; Wakabayashi, N.; Biswal, S. Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2007**, *47*, 89–116. [[CrossRef](#)]
48. Marzec, J.M.; Christie, J.D.; Reddy, S.P.; Jedlicka, A.E.; Vuong, H.; Lanke, P.N.; Aplenc, R.; Yamamoto, T.; Yamamoto, M.; Cho, H.Y.; et al. Functional polymorphisms in the transcription factor NRF2 in humans increase the risk of acute lung injury. *FASEB J.* **2007**, *21*, 2237–2246. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Arisawa, T.; Tahara, T.; Shibata, T.; Nagasaka, M.; Nakamura, M.; Kamiya, Y.; Fujita, H.; Hasegawa, S.; Takagi, T.; Wang, F.Y.; et al. The relationship between *Helicobacter pylori* infection and promoter polymorphism of the Nrf2 gene in chronic gastritis. *Int. J. Mol. Med.* **2007**, *19*, 143–148. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Arisawa, T.; Tahara, T.; Shibata, T.; Nagasaka, M.; Nakamura, M.; Kamiya, Y.; Fujita, H.; Yoshioka, D.; Arima, Y.; Okubo, M.; et al. Association between promoter polymorphisms of nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 gene and peptic ulcer diseases. *Int. J. Mol. Med.* **2007**, *20*, 849–853. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Arisawa, T.; Tahara, T.; Shibata, T.; Nagasaka, M.; Nakamura, M.; Kamiya, Y.; Fujita, H.; Yoshioka, D.; Okubo, M.; Sakata, M.; et al. Nrf2 gene promoter polymorphism is associated with ulcerative colitis in a Japanese population. *Hepato-gastroenterology* **2008**, *55*, 394–397.
52. Hua, C.C.; Chang, L.C.; Tseng, J.C.; Chu, C.M.; Liu, Y.C.; Shieh, W.B. Functional haplotypes in the promoter region of transcription factor Nrf2 in chronic obstructive pulmonary disease. *Dis. Markers* **2010**, *28*, 185–193. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Von Otter, M.; Bergstrom, P.; Quattrone, A.; De Marco, E.V.; Annesi, G.; Soderkvist, P.; Wettinger, S.B.; Drozdziak, M.; Bialecka, M.; Nissbrandt, H.; et al. Genetic associations of Nrf2-encoding NFE2L2 variants with Parkinson's disease—A multicenter study. *BMC Med. Genet.* **2014**, *15*, 131. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Shimoyama, Y.; Mitsuda, Y.; Tsuruta, Y.; Hamajima, N.; Niwa, T. Polymorphism of Nrf2, an antioxidative gene, is associated with blood pressure and cardiovascular mortality in hemodialysis patients. *Int. J. Mol. Sci.* **2014**, *11*, 726–731. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Gui, Y.; Zhang, L.; Lv, W.; Zhang, W.; Zhao, J.; Hu, X. NFE2L2 variations reduce antioxidant response in patients with Parkinson disease. *Oncotarget* **2016**, *7*, 10756–10764. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Camp, R.L.; Chung, G.G.; Rimm, D.L. Automated subcellular localization and quantification of protein expression in tissue microarrays. *Nat. Med.* **2002**, *8*, 1323–1328. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Expressão de Canais de Cálcio na Hepatite Alcoólica

Pesquisador: Maria de Fatima Leite

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 67814117.6.0000.5149

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE MINAS GERAIS

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.093.116

Apresentação do Projeto:

O projeto propõe uma análise em paralelo de dois estudos. Um do tipo não intervencional, que envolverá 100 pacientes de ambos os sexos e de todas as idades, diagnosticados com histórico de hepatite alcoólica à pelo menos cinco anos por médico hepatologista, assistidos através de acompanhamento clínico-laboratorial por especialista em hepatologia do Ambulatório do Fígado da Fundação Santa Casa de Misericórdia/FSCM-PA, para a investigação da associação entre os dados clínicos e laboratoriais dos pacientes à possíveis evidências de suscetibilidade genética na análise do polimorfismo de SNP, na região promotora do gene NFE2L2, responsável por codificar o fator de transcrição Nrf2 - um fator que regula negativamente a expressão de IP3R-3 nos canais de cálcio em colangiócitos. Em segundo, pretendemos demonstrar a relação da hepatite alcoólica à possíveis evidências colestatícas, através da indução da doença hepática alcoólica em modelos experimentais de ratos Sprague-Dawley, onde serão avaliados a regulação molecular da expressão de IP3R-3 e o fator de transcrição Nrf2 em linhagens celulares de colangiócitos, determinando se e como sua expressão pode ser inibida pelo álcool na HA e colestatase.

Serão avaliados os prontuários médicos dos pacientes da pesquisa para análise do histórico clínico e dos exames laboratoriais de interesse para o diagnóstico e monitoramento da hepatite alcoólica. Informe o número de indivíduos abordados pessoalmente, recrutados, ou que sofrerão algum tipo de intervenção neste centro de pesquisa:

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005

Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901

UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br

Continuação do Parecer: 2.093.116

200.

Critério de Exclusão: Os pacientes que não concordarem em fazer parte do estudo e aqueles com quaisquer tipos de doença hepática simultâneas, especificamente as hepatites virais B ou C, ou carcinoma hepatocelular, serão excluídos do projeto

Objetivo da Pesquisa:

Hipótese: Dados preliminares do nosso grupo sugerem que a hepatite alcoólica pode também resultar em lesão hepática colestativa, e que esta manifestação associa-se a um prognóstico desfavorável. A colestase, que reflete comprometimento da função secretora dos colangiócitos, geralmente é vista como um processo separado de lesão hepatocelular (Lazaro et al., 2015). Porém, muitas vezes a colestase também reflete prejuízo na propriedade secretagoga dos hepatócitos. Coletivamente, este projeto visa investigar a nova hipótese de que a hepatite alcoólica é, em parte, uma doença de colangiócitos. Isto por sua vez tem o potencial de mudar radicalmente a nossa compreensão da patogênese molecular desta desordem, e ao fazê-lo, definir novos alvos de terapia. Nossa hipótese é que o álcool diminui a expressão de IP3R em colangiócitos, levando à colestase, observada na hepatite alcoólica.

Objetivo Primário: Determinar com que frequência a hepatite alcoólica exibe evidências de colestase, e se ela está associada com a expressão diminuída de IP3R-3 em colangiócitos **Objetivo Secundário:** Investigar os fatores que regulam a expressão de IP3R-3 em colangiócitos, e determinar se e como o tratamento com álcool modula esses fatores para levar à expressão prejudicada de IP3R-3.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Será necessário a realização de coleta de sangue através de punção venosa na região cubital do braço, na altura da dobra do cotovelo. O procedimento será realizado por profissional responsável devidamente habilitado, seguindo todas as medidas de biossegurança exigidas, sendo de nossa responsabilidade prestar total assistência ao participante da pesquisa mediante os riscos de dor e sangramento esperados devido o procedimento de coleta de sangue, assim como, por qualquer desconforto apresentado antes, durante ou após a coleta de sangue. Para minimizar ou evitar tais efeitos, o paciente será orientado pelo profissional durante a coleta de como proceder e quais cuidados deve tomar após a coleta de sangue, recebendo o auxílio adequado com curativo para estancar o sangramento, minimizar as dores e possíveis hematomas após o procedimento de coleta sanguínea. Todo acompanhamento com os cuidados, orientação e procedimentos serão prestados através do corpo técnico de profissionais do laboratório responsável pela coleta. Além destes, para minimizar quaisquer constrangimentos pela análise do prontuário médico,

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005
Bairro: Unidade Administrativa II CEP: 31.270-901
UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE
Telefone: (31)3409-4592 **E-mail:** coep@prpq.ufmg.br

Continuação do Parecer: 2.093.116

esclareceremos o participante que tais informações serão utilizadas exclusivamente para delinear os dados da pesquisa sem a divulgação ou a exposição dos seus nomes, pois os dados servirão para apresentar os resultados deste estudo em eventos da área de saúde e publicar em revista científica nacional e/ou internacional em que, por ocasião da publicação dos resultados, o nome do participante será mantido em sigilo absoluto.

Benefícios: Dado o fato de que o dano hepatocelular é tido como um dos componentes mais críticos da HA, demonstrar que a lesão hepática colestática é também um componente prevalente nesta patologia pode mudar nossa compreensão sobre a HA e os paradigmas sobre a fisiopatologia desta doença, abrindo novas estratégias para o tratamento. Principalmente ao considerarmos que até o momento, a colestase vem sendo estudada separadamente da HA. Enquanto que os modelos animais atuais de HA apenas recapitulam características clínicas, tais como esteatose, infiltração de neutrófilos e lesão hepatocelular, mas não a colestase, na hipótese de que o álcool diminui a expressão de IP3R em colangiócitos, levando à colestase, observada na HA.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Projeto de Relevância nas áreas de Ciências Biológicas e Ciências da Saúde.

O tema é relevante e apresenta metodologia pertinente com o objetivo proposto.

Tamanho da Amostra no Brasil: 200

Término do projeto: 10/03/2019

Final 10/03/2019

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os Termos estão adequados em sua apresentação.

Como solicitado por esse CEP, foram acrescentados ao TCLE os seguintes dados:

O telefone, email e endereço completo do COEP/UFMG no TCLE; que o termo seguirá em duas vias com espaço destinado para rubricas e que o COEP/UFMG poderá ser contatado em caso de dúvidas éticas. Além da descrição dos riscos mínimos no TCLE (conforme Res.466/12 não existe pesquisa sem riscos) e os procedimentos para minimizá-los. Foi retirada ainda, a identificação institucional em seu cabeçalho.

Na folha de rosto, consta agora, a assinatura do pesquisador responsável e da diretora da entidade nos devidos campos, bem como do carimbo da mesma.

Iniciar TCLE em formato de carta convite.

Foram incluídos os seguintes documentos na proposta:

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad Sl 2005	
Bairro: Unidade Administrativa II	CEP: 31.270-901
UF: MG	Município: BELO HORIZONTE
Telefone: (31)3409-4562	E-mail: coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 2.093.116

- Informações básicas do projeto;
- Folha de Rosto;
- Projeto Detalhado;
- TCLE;
- TDUD2 (ofício de compromisso de confidencialidade dos dados dos prontuários dos pacientes assinada pelos pesquisadores);
- Ofício de concordância do coorientador que receberá o estudante de pós-doutorado no laboratório do Instituto Evandro Chagas sobre sua responsabilidade na execução dos experimentos;
- Ofício de Coconcordância do Coorientador;
- Parecer consubstanciado do Departamento de Fisiologia do ICB/UFMG (2 documentos);
- TERMO DE COMPROMISSO DE UTILIZAÇÃO DE DADOS - TCUD;
- Carta de Concordância de colaborador 1 (profa. do Instituto Evandro Chagas);
- Carta de Concordância do colaborador responsável pelo laboratório de análises clínicas do Instituto Evandro Chagas.

Recomendações:

O pesquisador atendeu às solicitações, dessa forma, salvo melhor juízo, sou favorável a aprovação. Expressão de Canais de Cálcio na Hepatite Alcoólica, pesquisador Responsável: Maria de Fatima Leite.

Solicito apenas, que a pesquisadora reveja na página 1 do TCLE a diferença entre os termos "o depósito, e o armazenamento" das amostras e enumere as páginas do mesmo.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Somos favoráveis à aprovação do projeto.

Considerações Finais a critério do CEP:

Tendo em vista a legislação vigente (Resolução CNS 466/12), o COEP-UFMG recomenda aos Pesquisadores: comunicar toda e qualquer alteração do projeto e do termo de consentimento via emenda na Plataforma Brasil, informar imediatamente qualquer evento adverso ocorrido durante o

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad Sl 2005
 Bairro: Unidade Administrativa II CEP: 31.270-901
 UF: MG Município: BELO HORIZONTE
 Telefone: (31)3408-4592 E-mail: coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 2.093.116

desenvolvimento da pesquisa (via documental encaminhada em papel), apresentar na forma de notificação relatórios parciais do andamento do mesmo a cada 06 (seis) meses e ao término da pesquisa encaminhar a este Comitê um sumário dos resultados do projeto (relatório final).

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_883589.pdf	28/04/2017 00:27:10		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	28/04/2017 00:26:33	Kemper Nunes dos Santos	Aceito
Outros	TCUD2.pdf	15/04/2017 06:04:10	Kemper Nunes dos Santos	Aceito
Outros	Coorientacao.pdf	15/04/2017 05:29:29	Kemper Nunes dos Santos	Aceito
Outros	Consubienciado2.pdf	15/04/2017 05:21:29	Kemper Nunes dos Santos	Aceito
Outros	Consubienciado1.pdf	15/04/2017 05:20:46	Kemper Nunes dos Santos	Aceito
Outros	TCUD1.pdf	15/04/2017 05:13:00	Kemper Nunes dos Santos	Aceito
Outros	Colaborador2.pdf	15/04/2017 05:05:26	Kemper Nunes dos Santos	Aceito
Outros	Colaborador1.pdf	15/04/2017 05:04:56	Kemper Nunes dos Santos	Aceito
Outros	Coorientador.pdf	15/04/2017 05:04:21	Kemper Nunes dos Santos	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	AnuenciaFSCM.pdf	15/04/2017 05:03:04	Kemper Nunes dos Santos	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	AnuencialEC.pdf	15/04/2017 05:02:10	Kemper Nunes dos Santos	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.pdf	15/04/2017 05:01:08	Kemper Nunes dos Santos	Aceito
Folha de Rosto	Folha.pdf	15/04/2017 04:59:21	Kemper Nunes dos Santos	Aceito
Outros	67814117aprovacaoassinada.pdf	31/05/2017 14:28:55	Vivian Resende	Aceito

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005
 Bairro: Unidade Administrativa II CEP: 31.270-901
 UF: MG Município: BELO HORIZONTE
 Telefone: (31)3409-4592 E-mail: coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 2.093.116

Outros	67814117parecerassinado.pdf	31/05/2017 14:29:02	Vivian Resende	Aceito
--------	-----------------------------	------------------------	----------------	--------

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BELO HORIZONTE, 31 de Maio de 2017

Assinado por:
Vivian Resende
(Coordenador)

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005

Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901

UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "EXPRESSÃO DE CANAIS DE CÁLCIO EM COLANGIÓCITOS, DE PACIENTES COM DOENÇA HEPÁTICA ALCOÓLICA", protocolo do CEUA: 280/2018 sob a responsabilidade de Maria de Fatima Leite que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 26/02/2019.

Vigência da Autorização	25/02/2019 a 24/02/2024
Finalidade	Pesquisa
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / B57BL/6
Nº de animais	8
Peso/Idade	24g / 12(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / B57BL/6
Nº de animais	8
Peso/Idade	24g / 12(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / B57BL/6
Nº de animais	8
Peso/Idade	24g / 12(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / B57BL/6
Nº de animais	8
Peso/Idade	24g / 12(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Instituto de Ciências Biológicas da UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / B57BL/6
Nº de animais	8
Peso/Idade	24g / 12(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Instituto de Ciências Biológicas da UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / B57BL/6

Nº de animais	8
Peso/Idade	24g / 12(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Instituto de ciências Biológicas da UFMG

Considerações posteriores:

26/02/2019	Aprovado na reunião do dia 25/02/2019. Validade: 25/02/2019 à 24/02/2024
25/02/2019	Aprovado na reunião do dia 25/02/2019. Validade: 25/02/2019 à 24/02/2023

Belo Horizonte, 11/02/2021.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG
https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - cetea@prpq.ufmg.br