

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS EM  
GASTROENTEROLOGIA E HEPATOLOGIA

MATHEUS TRUCCOLO MICHALCZUK

**EFEITOS DA RIFAXIMINA EM MARCADORES DE EPIGENÉTICA E DE  
AUTOFAGIA EM MODELO EXPERIMENTAL DE CARCINOMA  
HEPATOCELULAR SECUNDÁRIO A DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA  
NÃO ALCOÓLICA**

Porto Alegre

2023

MATHEUS TRUCCOLO MICHALCZUK

**EFEITOS DA RIFAXIMINA EM MARCADORES DE EPIGENÉTICA E DE  
AUTOFAGIA EM MODELO EXPERIMENTAL DE CARCINOMA  
HEPATOCELULAR SECUNDÁRIO A DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA  
NÃO ALCOÓLICA**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito para obtenção do título de Doutor em Gastroenterologia e Hepatologia.

Orientador: Prof. Mário Reis Álvares-da-Silva

Porto Alegre

2023

**MATHEUS TRUCCOLO MICHALCZUK**

## FICHA CATALOGRÁFICA

### CIP - Catalogação na Publicação

Michalczuk, Matheus Tuccolo

Efeitos da rifaximina em marcadores de epigenética e de autofagia em modelo experimental de carcinoma hepatocelular secundário a doença hepática gordurosa não alcoólica / Matheus Tuccolo Michalczuk. -- 2023.

77 f.

Orientador: Mário Reis Álvares-da-Silva.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia, Porto Alegre, BR-RS, 2023.

1. Carcinoma hepatocelular. 2. Epigenética. 3. Autofagia. 4. Doença hepática gordurosa não alcoólica. 5. Rifaximina. I. Álvares-da-Silva, Mário Reis, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

## **DEDICATÓRIA**

À minha amada esposa Daniela, companheira em todos os momentos, que além de me oportunizar compartilhar nossas vidas, serve de alicerce e exemplo, conhece minhas virtudes e defeitos, me fazendo crescer e desenvolver o melhor de mim.

Aos meus queridos filhos Lucas e Rafael, que me ensinaram o que é amor incondicional e tornaram minha vida ainda mais feliz.

Aos meus pais, Valdemar e Nelisa, e meu irmão Thiago, pelo amor e ensinamentos que me deram sustentação para seguir em frente.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Professor Mário Reis Álvares-da-Silva, pelo constante incentivo, confiança, sabedoria, liderança, capacidade de motivar e agregar pessoas através do exemplo e conhecimento. Incansável na pesquisa, ensino e assitência, oportunizando o crescimento dos que estão em sua volta.

À Larisse Longo, parceira na pesquisa clínica e acadêmica, que foi fundamental para o desenvolvimento deste projeto, atuando em momentos decisivos e me incentivando sempre.

Ao grupo do Laboratório Experimental de Hepatologia e Gastroenterologia, onde foi desenvolvido esse projeto, em especial ao Gabriel Tayguara Guerreiro, Jéssica Tonin Ferrari e Melina Belén Keingeski, pessoas fundamentais em sua execução.

Ao Professor Eduardo Filippi-Chiela, que com seu conhecimento, contribuiu de forma decisiva para o estudo do processo de autofagia.

A Professora Carolina Uribe-Cruz pela importante participação na base do projeto e desenvolvimento do modelo experimental.

Ao Professor Carlos Thadeu Schmidt Cerski, por nos emprestar seus conhecimentos em patologia hepática, fundamentais no desenvolvimento deste projeto.

À Professora Cláudia Pinto Marques Souza de Oliveira, por sua participação intelectual e auxílio na replicação do modelo experimental.

Ao Sr. Fernando Augusto Soares, secretário da gastroenterologia, pela amizade e auxílio durante todos os anos em que convivemos.

Ao Professor Carlos Fernando de Magalhães Francisconi, pelo exemplo como professor, gastroenterologista e pelo constante incentivo para meu desenvolvimento profissional.

Ao Programa de Pós-Graduação: Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre pela oportunidade de desenvolver este estudo.

Ao Fundo de Incentivo à Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE/HCPA) pelo financiamento desta pesquisa.

## SUMÁRIO

Resumo.....	9
Abstract.....	10
Lista de abreviaturas.....	11
Lista de figuras e tabelas.....	13
1. Introdução.....	12
2. Revisão Bibliográfica.....	14
3. Justificativa.....	25
4. Questão de Pesquisa.....	26
5. Hipótese.....	27
6. Objetivos.....	28
7. Conclusões.....	29
8. Considerações finais e perspectivas futuras.....	31
9. Referências bibliográficas.....	33

## RESUMO

**Introdução/Objetivos:** A incidência do carcinoma hepatocelular (HCC) associado à doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) é alta e são necessárias novas estratégias de prevenção. Foi avaliado o efeito da rifaximina (RIF) em marcadores epigenéticos e de autofagia em modelo de HCC secundário à DHGNA (DHGNA-HCC).

**Métodos:** 24 ratos Sprague Dawley adultos foram distribuídos aleatoriamente (8 animais/grupo) e tratados da semana 5 a 16 — controle (CONT), dieta padrão, água sem dietilnitrosamina (DEN) e gavagem com veículo (Veh), HCC [dieta hiperlipídica deficiente em colina (HFCD), DEN na água de beber e gavagem com Veh] e RIF [HFCD e DEN e gavagem com RIF (50 mg/kg/dia)]. **Resultados:** Todos os animais desenvolveram DHGNA. Tumor ocorreu em todos do grupo HCC e em 4 do RIF. A expressão hepática de Mmp-9 foi maior no grupo HCC em relação ao CONT, o inverso ocorrendo com p62/Sqtm-1 ( $p < 0,05$ ). Map113b, Becn-1 e Ezh-2 foram inferiores em HCC e RIF versus CONT ( $p < 0,05$ ). Carm-1 foi inferior em HCC versus RIF ( $p < 0,05$ ). Não houve diferença entre os grupos para Tuba-1c, Aldo-b, Afp e Mmp2 ( $p > 0,05$ ); miR-122 foi maior em HCC versus CONT ( $p < 0,05$ ), e miR-34a foi maior em RIF versus CONT ( $p < 0,05$ ); miR-26b foi menor em HCC vs RIF, o inverso para miR-224 ( $p < 0,05$ ). Houve correlação negativa entre miR-122 e miR-34a com relação aos marcadores de autofagia Becn1, p62/Sqtm1 e Map113b. Comparando os animais que desenvolveram HCC e os que não tiveram, miR122, miR34a, Tuba-1c, Mmp2, Mmp9 foram mais elevados no grupo HCC ( $p < 0,05$ ). **Conclusão:** O estudo mostrou possível benefício da RIF em ratos com NAFLD-HCC em relação a marcadores de epigenética e de autofagia, sugerindo utilidade na prevenção da carcinogênese.

Palavras-chave: Modelo animal; Autofagia; Epigenética; Carcinoma hepatocelular; Doença hepática gordurosa não alcoólica; rifaximina



## ABSTRACT

**Background/Aims:** The incidence of hepatocellular carcinoma (HCC) associated with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is high and are necessary new prevention strategies. We evaluated the effect of rifaximin (RIF) on epigenetic and autophagy markers in a model of HCC secondary to NAFLD (NAFLD-HCC). **Methods:** 24 adult Sprague Dawley rats were randomized (8 animals/group) and treated from week 5 to 16 — control (CONT), standard diet, water without diethylnitrosamine (DEN) and gavage with vehicle (Veh), HCC [high-fat diet deficient in choline (HFCD), DEN in drinking water and gavage with Veh] and RIF [HFCD and DEN and gavage with RIF (50 mg/kg/day)]. **Results:** All animals developed NAFLD. Tumor occurred in all of the HCC group and in 4 of RIF. The hepatic expression of Mmp-9 was higher in the HCC group compared to the CONT, the opposite occurring with p62/Sqtm-1 ( $p < 0.05$ ). Map113b, Becn-1 and Ezh-2 were inferior in HCC and RIF versus CONT ( $p < 0.05$ ). Carm-1 was lower in HCC versus RIF ( $p < 0.05$ ). There was no difference between groups for Tuba-1c, Aldo-b, Afp and Mmp2 ( $p > 0.05$ ); miR-122 was greater in HCC versus CONT ( $p < 0.05$ ), and miR-34a was greater in RIF versus CONT ( $p < 0.05$ ); miR-26b was lower in HCC vs RIF, the inverse for miR-224 ( $p < 0.05$ ). There was a negative correlation between miR-122 and miR-34a with respect to autophagy markers Becn1, p62/Sqtm1 and Map113b. Comparing animals that developed HCC and those that did not, miR122, miR34a, Tuba-1c, Mmp2, Mmp9 were higher in the HCC group ( $p < 0.05$ ). **Conclusion:** The study showed a possible benefit of RIF in rats with NAFLD-HCC in relation to epigenetic and autophagy markers, suggesting it could be useful in preventing carcinogenesis.

**Keywords:** Animal model; Autophagy; Epigenetic; Hepatocellular carcinoma; Non-alcoholic fatty liver disease; Rifaximin

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

AFP: Alfafetoproteína

Aldo-b: Aldolase b

Becn-1: beclin-1

Carm-1: coactivator associated arginine methyltransferase-1

CCL4: Tetracloroeto de Carbono

CPC: Centro de Pesquisa Clínica

CPE: Centro de Pesquisa Experimental

DEN: N-nitrosodietilamina

DHGNA: Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica

DM-2: - Diabetes Mellitus Tipo 2

Ezh2: enhancer of zeste homolog 2

HCC: Carcinoma hepatocelular

HCPA: Hospital de Clínicas de Porto Alegre

H&E: Hematoxilina & Eosina

HFCD: high-fat and choline-deficient diet

LC3: microtubule-associated protein-1 light chain-3

LEHG: Laboratório Experimental de Hepatologia e Gastroenterologia

MAFLD: metabolic-associated fatty liver disease

Map113b: autophagy-related factor LC3A/B

MEC: Matriz extracelular

Mmps: metaloproteinases de matriz

Mmp-2: metaloproteinase de matriz-2

Mmp-9: metaloproteinase de matriz -9

NASH: Esteato hepatite não alcoólica

PNPLA3: *Patatin-like phospholipase domain-containing protein 3*

p62/Sqtm-1: p62/sequestosome-1

RIF: rifaximina

ROS: Espécies Reativas de Oxigênio

TM6SF2: *Transmembrane 6 Superfamily Member 2*

TEM: Transição epitelial mesenquimal

Tuba-1c: Tubulina-1C

UPL: Unidade de Patologia Laboratorial

Veh: veículo

## 1. INTRODUÇÃO

A doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA), é uma patologia complexa com potencial evolutivo, variando de esteatose isolada, podendo progredir para a esteato-hepatite, cirrose, insuficiência hepática e/ou carcinoma hepatocelular (HCC). Um consenso publicado em 2020, sugere chamar a DHGNA de doença hepática associada ao metabolismo (MAFLD), porém, devido a essa mudança na definição da doença ainda em transição, optamos por utilizar o conceito de DHGNA no presente trabalho (1, 2, 3). Além da dieta e estilo de vida sedentário, outros fatores contribuem para a progressão da DHGNA e o desenvolvimento do processo de carcinogênese associado à DHGNA (4).

Vários mecanismos de oncogênese associados à DHGNA, como defeitos genéticos estruturais, alterações epigenéticas e autofagia, promovem modificações significativas nas vias regulatórias e de sinalização, criando um microambiente hepático favorável para progressão da lesão e desenvolvimento de HCC (5, 6, 7, 8, 9). Dentre os mecanismos epigenéticos, os microRNAs atuam na expressão ou supressão de genes responsáveis pelo agravamento do dano hepático, com potencial para serem utilizados como biomarcadores para diagnóstico precoce e/ou alvos terapêuticos no HCC (9, 10, 11, 12). A autofagia atua como uma faca de dois gumes no processo carcinogênico. Inicialmente com papel benéfico, contribuindo para a remoção de agregados proteicos, organelas danificadas e gotículas lipídicas, evitando a formação de células pré-tumorais (5, 8). No entanto, durante a promoção do tumor, a autofagia atua predominantemente no mecanismo adaptativo, contribuindo para a manutenção e crescimento tumoral por meio do fornecimento de substratos energéticos e adaptação metabólica, o que melhora sua capacidade de sobrevivência em ambientes com pouco oxigênio e nutrientes (5, 13). Nesse sentido, as terapias para o controle epigenético e da autofagia são alvos terapêuticos promissores (7, 13). Também estão envolvidos na carcinogênese hepática alterações em metaloproteinases, Aldolase-b e Tubulina-1C, que apresentam influência significativa na agressividade tumoral (14, 15, 16, 17).

Atualmente, não há terapia aprovada para esteato-hepatite não alcoólica (NASH) e vários estudos estão sendo conduzidos com diferentes alvos. Embora a microbiota desempenhe um papel importante na patogênese da DHGNA, não há evidência definitiva de um efeito positivo de sua modulação na NASH (18, 19, 20). A rifaximina (RIF) é um

antibiótico oral de amplo espectro, minimamente absorvido, que atua nos componentes da microbiota intestinal, exercendo influência no metabolismo energético e no armazenamento de gordura (19, 21, 22). Portanto, este estudo foi projetado para avaliar o efeito do tratamento com RIF nos mecanismos fisiopatológicos (alterações epigenéticas e de autofagia) que podem influenciar na hepatocarcinogênese.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Doença hepática gordurosa não alcoólica**

A DHGNA compreende um espectro de alterações hepáticas, variando de esteatose isolada a esteato-hepatite, caracterizada histologicamente por inflamação, necrose e balonização hepatocelular, que apresenta risco de progressão para fibrose, cirrose, insuficiência hepática e HCC (23, 24)

A DHGNA na grande maioria dos casos é assintomática, embora alguns pacientes possam apresentar sinais e sintomas inespecíficos, como fadiga, desconforto no quadrante superior direito e hepatomegalia (25). A principal característica histológica da DHGNA é o acúmulo de gordura em hepatócitos, particularmente triglicerídeos. A presença de mais de 5% de hepatócitos com esteatose num corte de fígado é atualmente aceito como o critério mínimo para o diagnóstico histológico da DHGNA, na ausência de outras etiologias e, com consumo alcoólico inferior a 30g/dia em homens e 20g/dia em mulheres (26).

A DHGNA é uma patologia que vem apresentando aumento em sua incidência e está presente em todo o mundo. No geral, a prevalência dessa patologia varia entre 6 e 35% (27). Estima-se que em indivíduos com peso normal e sem a presença de fatores de risco metabólicos, a prevalência da DHGNA seja de aproximadamente 16%, aumentando para 43-60% em pacientes com diabetes mellitus tipo 2 (DM-2) e 91% em pacientes obesos submetidos à cirurgia bariátrica (28,29,30).

Pacientes com DHGNA comumente consomem grandes quantidades de alimentos processados com altos níveis de frutose e/ou alto teor de gordura, além de adotar um estilo de vida sedentário (25). No entanto, além desses fatores ambientais ou exógenos, muitos outros determinam a progressão da doença e o desenvolvimento do processo de carcinogênese associado à DHGNA (31). Por exemplo, 42% dos pacientes com DHGNA desenvolvem estágios avançados de esteato-hepatite, porém, apenas 2,4 - 12,4% dos indivíduos com cirrose por NASH evoluem para HCC (31). Há previsão que a DHGNA se torne a principal causa de HCC em muitos países, com um aumento projetado de 137% em sua incidência entre os anos de 2015 a 2030 (32). Do ponto de vista clínico, é

importante entender quais pacientes apresentam maior risco de progressão e evolução com maior morbidade e mortalidade (33).

## **2.2 Carcinoma hepatocelular:**

O HCC é o tumor maligno primário mais comum do fígado e uma das neoplasias de maior incidência mundial (34). É o quinto câncer mais prevalente e a segunda maior causa de morte relacionada ao câncer no mundo (35, 36).

Países asiáticos apresentam maior incidência de HCC (37), contudo também há um aumento progressivo de casos no ocidente. Nos Estados Unidos, o número de pacientes com HCC triplicou nos últimos 25 anos (38, 39) e, somente na última década, a incidência aumentou quase cinco vezes (40).

No Brasil, dados sobre a incidência do HCC são escassos, visto que há poucos estudos acerca do tema (41). Estima-se que 10% dos transplantes hepáticos realizados no país sejam em decorrência de HCC (42). Já a incidência anual de HCC em cirróticos é estimada em torno de 2,9%, com uma taxa cumulativa de 14,3% e sobrevida de 50% em 5 anos (43). Estudo realizado com dados coletados entre 2005 e 2018 demonstrou que a média de hospitalizações por HCC aumentou 176%, que a prevalência do tumor é maior nos estados do sul e sudeste, embora a região nordeste apresente um crescimento mais acelerado, especialmente em áreas não metropolitanas. Também evidenciou que a taxa de hospitalização por HCC vem aumentando, especialmente em indivíduos com mais de 50 anos (44).

Atualmente, admite-se que a incidência do HCC cresce, fato que ocorre muito em razão do aumento da obesidade, do diabetes e da DHGNA (45, 46). Estudos observacionais mostram que a obesidade, diabetes, sobrecarga de ferro e consumo concomitante de álcool são fatores de risco para o desenvolvimento de HCC relacionado à DHGNA (47, 48). Portanto, o aumento na incidência de HCC é, em parte, causado pelo aumento do número de pacientes com DHGNA, altamente associado à obesidade e diabetes.

### **2.3 Carcinoma hepatocelular secundário à doença hepática gordurosa não alcoólica**

Na maioria dos casos, o HCC se desenvolve no contexto de cirrose, mas uma proporção de pacientes com DHGNA desenvolvem HCC mesmo na ausência desta (46). Atualmente, a NASH é a segunda etiologia mais frequente de pacientes listados para transplante relacionados ao HCC (49, 50).

A patogênese da DHGNA é complexa, e envolve diferentes mecanismos celulares e moleculares que promovem o desenvolvimento do carcinoma hepatocelular. O HCC se desenvolve num contexto de lesão hepática crônica, com dano mitocondrial, estresse oxidativo, inflamação, fibrose e cirrose, em um órgão já com função metabólica prejudicada, o que torna os doentes mais suscetíveis à toxicidade hepática e sistêmica (6, 9). Além disso, vários mecanismos de oncogênese, como defeitos genômicos estruturais, presença de polimorfismos genéticos, alterações epigenéticas, nos mecanismos de autofagia, na expressão do fenótipo glicolítico de marcadores metabólicos, especialmente GLUT1 e MCT4 e mudanças na imunidade adaptativa, promovem significativas alterações nas vias regulatórias e de sinalização, criando um microambiente favorável para a progressão da lesão hepática e desenvolvimento do HCC, inclusive levando, por vezes, a um fenótipo mais agressivo (7, 8, 9, 10, 51).

#### **2.3.1 Autofagia e carcinoma hepatocelular**

A autofagia é o processo biológico responsável pela degradação de proteínas, organelas e constituintes celulares danificados, gerenciando assim a homeostase celular e o balanço energético (52, 53). O processo de autofagia é considerado uma faca de dois gumes, já que inibe o crescimento e invasão de células tumorais nas fases iniciais do processo de carcinogênese, mas, nos estágios avançados do tumor, atua como controladora da morte celular nas células cancerígenas, preservando as neoplasias de condições desfavoráveis, como necrose, inflamação, hipóxia e deficiência de nutrientes (53). O primeiro passo no processo de autofagia é a indução da nucleação da membrana do fagóforo, que é formada por fragmentos da membrana do retículo endoplasmático, mitocôndrias e complexo de Golgi. A fase de conclusão do autofagossomo depende, além dos processos de nucleação e alongamento, do sequestro de carga e do fechamento da membrana. Após o fechamento do fagóforo, o autofagossomo resultante se funde com



um lisossomo para formar o autofagolisossomo, culminando com a degradação dos substratos autofágicos por hidrolases lisossômicas (52).

O processo de autofagia é regulado por diferentes marcadores, incluindo o autophagy-related factor (LC3AB/Map113b), p62/sequestosome-1 (p62/Sqtm-1) e Beclin-1 (Becn-1), que atuam em diferentes momentos. O fator relacionado à autofagia Map113b (LC3AB) atua na formação, alongamento e atividade do autofagossomo. O p62/sqtm-1, que faz parte do autofagossomo, é uma proteína adaptadora que se liga ao alvo que irá sofrer a autofagia. Já a Becn-1 exerce seu papel na nucleação e isolamento da membrana do fagóforo, atuando como supressor tumoral (encontra-se diminuída em determinadas neoplasias). Porém, em outras situações a diminuição de seus níveis está associada a maior angiogênese e a neoplasias indiferenciadas, demonstrando desta forma que o processo pode atuar na promoção e supressão tumoral, dependendo do estágio da neoplasia (52).

A epigenética está envolvida na ativação e inativação da autofagia ao longo do processo de carcinogênese, que ocorre através da atividade das metiltransferases como o enhancer of zeste homolog-2 (Ezh2) e a coactivator associated arginine methyltransferase-1 (Carm-1). O Ezh2 reprime a expressão de genes relacionados à via mamífera do alvo da rapamicina (mTOR) e a Carm-1 atua em fatores de transcrição como p53 e fator nuclear- $\kappa$ B (54-56). A inibição da atividade de Ezh2 induz a autofagia, através da formação de LC3B e conseqüentemente a formação do autofagossomo. A função do Carm-1, assim como outros controladores epigenéticos, é dependente do estágio de desenvolvimento da lesão, podendo atuar como supressor ou promotor tumoral. O aumento da glicólise aeróbica é uma característica do metabolismo do câncer. O Carm-1 sinaliza a disponibilidade de glicose para gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (GAPDH) e suprime a glicólise em células de HCC. A falta de glicose leva a regulação positiva de Carm-1, induzindo ainda mais a inibição de GAPDH. A inibição de Carm-1 aumenta o fluxo glicolítico e a glicólise. Portanto, a atuação do Carm-1 na regulação metabólica dos processos envolvendo o metabolismo da glicose no HCC, parece exercer papel de supressão tumoral nesse contexto (55).

A autofagia tende a desempenhar função importante na resistência ao tratamento do HCC, nesse sentido as terapias para o controle epigenético da autofagia são alvos promissores para o tratamento de lesões hepáticas (57).

### **2.3.2 Sinalização parácrina e carcinoma hepatocelular**

Estudos recentes têm avaliado o papel dos miRNAs no processo de hepatocarcinogênese (58, 59). miRNAs são pequenos RNAs não codificantes que modulam a transcrição e tradução de genes alvo e regulam diferentes funções biológicas no fígado humano. Além disso, os miRNAs estão envolvidos nas regulações pós-transcricionais associadas à proliferação, diferenciação, morte celular e carcinogênese. Os microRNAs, especialmente o miR-122 e miR-29a, parecem estar envolvidos no processo de carcinogênese da DHGNA (58, 59, 60, 61). Disfunções do metabolismo e apoptose via hipermetilação do DNA e desregulação do miR-21 também contribuem para a hepatocarcinogênese na DHGNA e EHNA. Alterações em miRNAs podem influenciar enzimas específicas, como a a frutose-bisfosfato aldolase B (Aldo-b) (8). Sua principal função é catalisar a conversão reversível de frutose-1,6-bisfosfato em dihidroxiacetona fosfato e gliceraldeído-3-fosfato. A Aldo-b é expressa principalmente no fígado. Mudanças anormais na Aldo-b se correlacionam com intolerância hereditária à frutose, hepatite, cirrose e HCC. Estudos descobriram que a expressão aberrante de Aldo-b tem uma relação estreita com carcinoma de células escamosas do pulmão, carcinoma de células escamosas oral e osteossarcoma. A Aldo-b parece ter sua expressão diminuída no HCC. Pesquisas recentes demonstraram uma redução óbvia de Aldo-b no HCC. Os miRNA também podem influenciar em oncogenes como a Tubulina-1C (Tuba-1c), cuja presença se correlaciona invasão tumoral e ocorrência de metástases, fazendo que o HCC tenha um comportamento mais agressivo (17). Portanto, a desregulação da Tuba-1c, associada ao miR-122 e a desregulação de Aldo-b causada pela hipermetilação e silenciamento do miR-21 podem predizer a agressividade tumoral e facilitar a ocorrência de metástases (8).

Além do miR-122 e miR-21, outros miRNAs parecem estar implicados na hepatocarcinogênese dos indivíduos com DHGNA.

Dentre eles, podemos destacar a família do miRNA-34, que atua como supressor tumoral, apresentando atividade antiproliferativa (através da metilação do DNA), promovendo a apoptose. Sua menor expressão está associada a maior lesão e fibrose hepática (62).

Também parece influenciar na hepatocarcinogênese o miR-155, que atua na regulação das respostas imunes, promove aumento da resposta inflamatória, e está envolvido nos processos de fibrose e carcinogênese hepática (58).

O miR-143 está associado a regulação da contratilidade das células musculares lisas vasculares (VSMCs) modulando a dinâmica do citoesqueleto e possibilitando a resposta das VSMCs. Estudos acerca da expressão do miR-143 e HCC são conflitantes. Sua menor expressão associa-se ao processo inflamatório, fibrogênese e progressão tumoral (63). O contrário também ocorre, ou seja, o aumento de sua expressão pode estar relacionado à supressão tumoral. Estudo realizado em 2017 encontrou aumento da expressão do miR-143 no soro de pacientes com carcinoma hepatocelular secundário ao vírus da hepatite C (64).

O miR-224 é um dos miRNAs mais comumente expressos em tecidos de HCC. A regulação positiva de miR-224 começa a partir do estágio pré-neoplásico e persiste durante todo o desenvolvimento do HCC. Exerce importante papel na proliferação celular, migração, invasão e bloqueio da apoptose, ligando-se diretamente aos seus alvos genéticos. Assim, o miR-224 pode ser um potencial biomarcador preditor de agressividade tumoral (65, 66).

A ativação anormal da via NF- $\kappa$ B está intimamente relacionada à carcinogênese. Os membros da família miR-26 parecem ter sua expressão diminuída no HCC. A expressão deste miRNA leva a supressão da sinalização de NF- $\kappa$ B induzida por TNF $\alpha$  no HCC, bem como está associada a inibição da autofagia nos estágios iniciais, fazendo com que o miR-26 seja um possível alvo terapêutico em tratamentos antitumorais (67, 68, 69).

Portanto, os microRNAs atuam na expressão ou supressão de genes responsáveis pelo agravamento do dano hepático, ou seja, têm potencial para servir como novos biomarcadores para o diagnóstico precoce da lesão também como alvos terapêuticos no HCC (58, 60, 61, 66).

### **2.3.3 Metaloproteinases de matriz e carcinoma hepatocelular**

Na rota carcinogênica do HCC, ocorre um processo de transformação, no qual as características das células epiteliais são perdidas em favor da adoção de traços

mesenquimais chamado de transição epitelial-mesenquimal (TEM). A TEM é considerada essencial para oncogênese, permitindo que os tumores adquiram características de maior agressividade, como a capacidade de invasão e potencial para gerar metástases (70).

As metaloproteinases de matriz (Mmps) são uma família de endoproteases zinco-dependentes responsáveis pela degradação da matriz extracelular (MEC). As Mmps promovem um amplo espectro de processos, incluindo proliferação e migração celular, além de desempenhar papel na apoptose, angiogênese e regeneração tecidual. Em doenças malignas, como no HCC, as Mmps funcionam dentro do microambiente tumoral induzindo mudanças durante a TEM, facilitando a ocorrência de invasão e metástases. As Mmps parecem desempenhar papel importante na complexa patologia gênese da TEM no HCC (70,71).

A degradação da membrana basal e, posteriormente, da MEC, é crítica para o processo de invasão e ocorrência de metástases, o que acarreta mau prognóstico no HCC. As Mmps são fatores-chave nesses fatores de agressividade do HCC. A migração de células tumorais depende do aumento da liberação e ativação de Mmps, bem como sua expressão na membrana celular, levando a um colapso da MEC e, desta forma, favorecendo a infiltração tumoral (72-74).

Dentre as Mmps associadas ao processo de carcinogênese no HCC estão as metaloproteinases de matriz 2 e 9 (Mmp-2 e Mmp-9) (72,73).

A Mmp-2 é uma colagenase que representa a principal enzima proteolítica entre as Mmps. Importante promotora de invasão de células tumorais e metástase através da quebra da membrana basal, favorece a infiltração local e disseminação à distância de células tumorais. A Mmp-2 normalmente não é encontrada em hepatócitos normais, mas é expressa em células de HCC, especialmente na variante fibrolamelar.

A Mmp-9, também conhecida como gelatinase B, é uma das Mmps mais estudadas na patogênese da TEM no HCC. Ela tem papel na degradação da MEC, ativando IL-1 $\beta$ , e clivando uma série de quimiocinas. Também parece ter papel na angiogênese tumoral, por meio de sua regulação da placa de crescimento e recrutamento de células-tronco endoteliais (72). A superexpressão da Mmp-9 no HCC está associada a um estágio TNM mais elevado, devido a maior invasão em linfonodos, doença metastática e menor grau

de diferenciação celular. A Mmp-9, ao lado da Mmp-2 é considerada um marcador de agressividade tumoral no HCC (70, 72, 74).

Além desses fatores previamente listados, novas linhas de evidência têm demonstrado que a microbiota intestinal também desempenha um papel importante na progressão da DHGNA e no desenvolvimento do HCC (75, 76).

#### **2.4 Microbiota intestinal na doença hepática gordurosa não alcoólica e no carcinoma hepatocelular**

Estudos recentes têm demonstrado que a microbiota intestinal é um fator importante na progressão da doença hepática. O microbioma de pacientes com hepatopatia é caracterizado pela redução de microrganismos benéficos e aumento daqueles potencialmente patogênicos, e, com a progressão da hepatopatia acentua-se ainda mais o quadro de disbiose. A disbiose intestinal é associada a inflamação sistêmica e está intimamente relacionada ao desenvolvimento de HCC (75, 76).

Também o aumento da permeabilidade intestinal favorece a translocação de bactérias e seus produtos para o fígado (processo conhecido como endotoxemia), contribuindo para a persistência de um microambiente inflamatório (77, 78). De fato, o aumento da translocação bacteriana é um sinal chave do HCC (79, 80). A microbiota intestinal, portanto, pode atuar como promotora, estando envolvida na origem e manutenção do quadro inflamatório que contribui para a progressão de doenças hepáticas e o desenvolvimento de HCC (81). Por isso, o microbioma intestinal é considerado alvo promissor para a prevenção simultânea da DHGNA e HCC (82).

#### **2.5 Microbiota como alvo de agentes terapêuticos**

Nos últimos dez anos, houve expressivo avanço no desenvolvimento de novos medicamentos para o tratamento do HCC, incluindo inibidores de quinases como sorafenibe, lenvatinibe, cabozantinibe, e regorafenibe, bem como anticorpos monoclonais como ramucirumabe, nivolumabe e pembrolizumabe, atezolizumabe e bevacizumabe (83, 84, 85). De modo geral, essas terapias demonstraram prolongar de forma significativa a sobrevida geral do paciente, e parecem ter um perfil de segurança razoável. Entretanto,

estes fármacos apresentam custos altos, além de toxicidade e efeitos adversos que podem afetar a qualidade de vida dos pacientes (86). A cirrose, importante fator de risco para o desenvolvimento de HCC, é um dos fatores associados à tolerância da terapia, posto que o uso desses agentes está autorizado apenas em pacientes com doença compensada. Além disso, os efeitos adversos destes medicamentos podem levar a consequências indesejáveis, como necessidade de redução da dose ou interrupção do uso dos antineoplásicos, o que pode diminuir a eficácia do tratamento.

A despeito do progresso no manejo do HCC, a mortalidade geral da doença ainda é elevada, com cerca de 66% dos casos evoluindo para óbito. Assim, a busca por novas formas de intervenção ainda se faz necessária, em especial em estágios iniciais da doença ou em populações de risco.

Sabendo que a microbiota desempenha papel no desenvolvimento da DHGNA e sua evolução para HCC, diversos autores sugerem que os antibióticos possam ser utilizados para a prevenção dessa neoplasia (87, 88). A modulação da microbiota intestinal por antibióticos, em especial a rifaximina, pode melhorar o quadro de disbiose e endotoxemia, representando uma estratégia terapêutica de prevenção ao HCC.

## **2.6 Rifaximina**

A rifaximina é um antibiótico com atividade de amplo espectro contra bactérias Gram positivas, Gram negativas e anaeróbias, utilizada para o tratamento de um vasto número de condições gastrointestinais e hepáticas (89, 90). Este medicamento apresenta baixa absorção pelo trato intestinal (menos de 1% da dose administrada) e, como tal, tem um perfil de segurança favorável, tanto do ponto de vista de efeitos adversos, quanto em relação à indução de resistência. Além das propriedades antimicrobianas esperadas, a rifaximina inibe a virulência bacteriana, regula negativamente a resposta inflamatória e tem o potencial de modular positivamente a composição da microbiota intestinal (91, 92).

Em um estudo previamente realizado, demonstrou-se que a microbiota intestinal exerce influência no desenvolvimento de HCC em um modelo experimental com ratos expostos à N-nitrosodietilamina (DEN) e tetracloreto de carbono (CCl<sub>4</sub>) (93). Após a indução do HCC com os carcinógenos, os ratos foram tratados com 50mg/kg/dia de rifaximina durante 16 semanas e foi observada uma redução significativa do número dos

tumores, o que sugere uma eficácia moderada do tratamento com rifaximina. Estudo realizado no Laboratório Experimental de Hepatologia e Gastroenterologia (LEHG) do CPC HCPA mostrou utilidade da rifaximina na diminuição da gravidade da DHGNA induzida por dieta hiperlipídica deficiente em colina e DEN, bem como exerceu efeito protetor no desenvolvimento de HCC (Ferrari et al, dados não publicados). Embora esses estudos iniciais tenham demonstrado o potencial da rifaximina na modulação da microbiota intestinal, diversos aspectos ainda precisam ser elucidados para que esta droga promissora possa ser considerada como estratégia terapêutica de prevenção ao HCC, dentre estes aspectos, que marcadores moleculares estão relacionados e são influenciados nesse processo.

## **2.7 Modelos experimentais de carcinoma hepatocelular**

As pesquisas experimentais são importantes para a compreensão dos mecanismos envolvidos na fisiopatologia das doenças, bem como para testes com possíveis tratamentos para essas patologias.

Os modelos experimentais para o desenvolvimento do HCC são divididos basicamente em três grupos: os que incluem a utilização de agentes hepatotóxicos diretos (indução química), os que utilizam tipos específicos de dieta, ou um modelo misto, com a combinação de ambos.

Os modelos de HCC por indução química se assemelham às etapas da carcinogênese humana, sendo utilizadas substâncias cancerígenas. Dentre os agentes utilizados, podemos citar o CCL4 (94) e a DEN (95). A DEN é um potente alquilante do DNA, que promove alterações genéticas profundas nos hepatócitos. No fígado, a DEN é metabolizada no citocromo P450 e gera lesão em proteínas e lipídios, afetando o desenvolvimento, crescimento e sobrevivência dos hepatócitos. No entanto, esses modelos não refletem o curso do HCC secundário à DHGNA (96, 97).

Dentre os modelos dietéticos, destacam-se a dieta rica em frutose (98), dieta hiperlipídica (99) e dieta hiperlipídica deficiente em colina (100). Este último modelo necessita de um período prolongado para que o tumor se desenvolva, levando cerca de 50 semanas até o surgimento do HCC (101). O modelo ideal de HCC secundário à DHGNA deve mimetizar o que ocorre na doença com os seres humanos, ou seja: excesso de

calorias na alimentação, desenvolvimento de obesidade, resistência à insulina e dislipidemia, como demonstrado por Asgharpour et al. (102). Na dieta hiperlipídica pura, há o consumo de 45% a 75% de calorias provenientes de lipídios ou colesterol. As dietas deficientes em nutrientes são desprovidas de certos nutrientes essenciais, como a metionina e/ou a colina. Esta abordagem resultou em vários tipos de dieta, como deficiente em colina, deficiente em metionina, deficiente em metionina-colina e dieta hiperlipídica deficiente em colina (DHDC). Todas essas dietas podem variar em teor de gordura e também podem ser enriquecidas em algum nutriente, como sacarose e frutose (103). A principal vantagem do uso de dietas deficientes em nutrientes é a indução de características histológicas da NASH, incluindo desenvolvimento de fibrose. No entanto, a evolução para HCC a partir dessas dietas ocorre de forma lenta, podendo levar 12 meses (98, 104). Buscando um modelo de HCC secundário à DHGNA em um período mais curto, um grupo de pesquisa da Universidade de São Paulo desenvolveu um modelo experimental de HCC adicionando DEN a uma dieta hiperlipídica deficiente em colina, chamado modelo misto de HCC secundário à DHGNA. Este modelo é interessante para avaliar a hepatocarcinogênese relacionada à DHGNA, visto que apresenta similaridade com o que ocorre seres humanos, especialmente com relação ao padrão de dieta, com desenvolvimento de esteatose simples, evolução para NASH, cirrose e progressão ao HCC, num período de 16 semanas (105, 106). Stefano et al, relataram que em 6 semanas de modelo com DHDC e DEN em ratos Sprague Dawley já há desenvolvimento de NASH com fibrose (107).



### 3. JUSTIFICATIVA

Devido à natureza complexa e multifatorial da DHGNA, é fundamental compreender as rotas e possíveis mecanismos envolvidos na sequência DHGNA-HCC, ainda não bem estabelecidos.

Além disso, considerando que o tratamento atual do HCC tem consideráveis limites, o estudo de novos alvos potenciais é essencial. Como microrganismos podem estar relacionados à progressão do HCC, a modulação da microbiota intestinal por antibióticos, em especial a rifaximina, pode representar uma estratégia de prevenção.

Assim, a importância dos marcadores de autofagia, sua regulação epigenética, a expressão e influência dos miRNAs, metaloproteinases, Tuba1-c e Aldo-b no processo de carcinogênese relacionado a DHGNA, e o efeito do uso da Rifaximina nesses marcadores, em um modelo de DHGNA que induz NASH e HCC, justificam a realização deste estudo.

#### **4. QUESTÃO DE PESQUISA**

4.1 Em animais com NASH e carcinoma hepatocelular, o processo de hepatocarcinogênese, avaliado através de marcadores de autofagia, fatores epigenéticos e marcadores de agressividade tumoral, pode sofrer influência pelo uso da Rifaximina?

4.2. Há correlação entre os marcadores de hepatocarcinogênese, epigenéticos e de autofagia em animais com NASH e carcinoma hepatocelular?

## **5. HIPÓTESE**

O uso de agente antimicrobiano não-absorvível de largo espectro rifaximina é capaz de alterar a expressão marcadores de autofagia, fatores epigenéticos e de agressividade tumoral em modelo animal de HCC secundário à DHGNA, influenciando no processo de carcinogênese.

## **6. OBJETIVOS**

### **6.1 Objetivo Principal**

Avaliar marcadores de hepatocarcinogênese e sua relação com o uso de rifaximina em animais com doença hepática gordurosa não-alcoólica e carcinoma hepatocelular.

### **6.2 Objetivos específicos**

1. Avaliar a expressão gênica de Aldo-b, Tuba-1c, Afp, Mmp2 e Mmp9 em tecido hepático de modelo experimental de HCC secundário à DHGNA, com ou sem uso de rifaximina e comparado com controles.
2. Avaliar a expressão de miR-21, miR-122, miR-143, miR-155, miR-34a, miR-224 e miR-26b circulante em amostras biológicas coletadas de modelo experimental de HCC secundário à DHGNA, com ou sem uso de rifaximina e comparado com controles.
3. Avaliar a expressão gênica de LC3A/B (map113b), P62/sqtm-1, Becn-1, Ezh2 e Carm-1 em tecido hepático de modelo experimental de HCC secundário à DHGNA, com ou sem o uso de rifaximina e comparado com controles.
4. Comparar o comportamento dos marcadores avaliados nos animais que desenvolveram e não desenvolveram HCC.
5. Correlacionar os resultados obtidos entre marcadores de hepatocarcinogênese, epigenéticos e de autofagia.

## 7. CONCLUSÕES

O presente estudo teve como objetivo principal avaliar marcadores de hepatocarcinogênese e sua relação com o uso de rifaximina em animais com doença hepática gordurosa não-alcoólica e carcinoma hepatocelular. Observamos que ocorreram diferenças entre os grupos, confirmando em parte a hipótese principal desta tese.

Como objetivos específicos, avaliamos a expressão gênica de Aldo-b, Tuba-1c, Afp, Mmp2 e Mmp9 em tecido hepático entre os grupos e encontramos níveis significativamente maiores de Mmp-9 no grupo HCC em comparação aos grupos RIF e CONT, o que pode evidenciar o papel dessa Mmp na rota de hepatocarcinogênese relacionada à DHGNA.

Também avaliamos a expressão de miR-21, miR-122, miR-143, miR-155, miR-34a, miR-224 e miR-26b circulante entre os grupos e demonstramos que o miR-122 apresentou níveis maiores no HCC em relação ao controle e RIF, o que pode evidenciar a influência deste miRNA no processo de hepatocarcinogênese relacionado à DHGNA. O miR-34a apresentou níveis mais elevados no grupo RIF em relação ao controle. O miR-26b apresentou níveis mais elevados no grupo RIF em relação HCC, ao contrário, o miR-224 apresentou níveis mais elevados no grupo HCC em relação ao RIF, achados que sugerem efeito protetor da RIF.

Ainda avaliamos a expressão gênica dos marcadores de autofagia LC3A/B (map11c3b), p62/sqstm-1, Becn-1, Ezh2 e Carm-1 em tecido hepático entre os grupos, e concluímos que o grupo HCC demonstrou níveis diminuídos de p62/Sqstm-1 em relação ao controle. Os marcadores Map113b, Becn-1 e Ezh2 apresentaram níveis diminuídos no HCC e RIF em relação ao controle, o que parece demonstrar o papel desses marcadores no mecanismo de hepatocarcinogênese relacionado à DHGNA, sem sofrer influência pela RIF. O marcador Carm-1 mostrou níveis reduzidos no grupo HCC em comparação com o grupo RIF.

Também comparamos os marcadores estudados entre os animais que desenvolveram HCC ou não e concluímos que os níveis de miR122, miR34a, Tuba-1c, Mmp2, Mmp9 foram significativamente mais elevados no grupo HCC. O contrário ocorreu com os marcadores Becn-1, Carm-1, Ezh2, p62/Sqstm-1 e Map11c3b demonstrando a provável influência destes marcadores no processo de carcinogênese associado a DHGNA.

Também correlacionamos os resultados obtidos entre marcadores de hepatocarcinogênese, epigenéticos e de autofagia, e concluímos que ocorreu correlação negativa entre os marcadores de autofagia Map11c3b, Becn-1 e P62/Sqstm1, EZH2 e os miR-122 e miR34a (relacionados a gravidade de lesão hepática). Observamos correlação positiva entre os marcadores de autofagia entre si. Não observamos correlação entre EZH2 e Carm-1, demonstrando que essas enzimas fazem o controle epigenético da autofagia por rotas diferentes. Encontramos correlação positiva entre os marcadores de hepatocarcinogênese Aldo-B, Mmp-2, Afp e Tuba-1c, bem como Mmp2, Afp e Tuba-1c. A correlação entre estes marcadores de carcinogênese demonstra sua provável influência no processo tumoral associado a DHGNA.

Em suma, o presente estudo demonstra um possível efeito benéfico da RIF na prevenção ou retardo do processo carcinogênico hepático secundário à NASH, como evidenciado pela avaliação dos marcadores epigenéticos, de autofagia e de agressividade tumoral aqui estudados.

## 8. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

O HCC é uma neoplasia prevalente em nosso meio, que em grande parte das vezes é diagnosticada tardiamente, o que diminui as possibilidades de tratamento efetivo, contribuindo para sua alta taxa de morbimortalidade. Também é de amplo conhecimento que as opções terapêuticas são ainda limitadas, tanto em número como em eficácia, e apresentam efeitos adversos importantes, traduzidas pelo fato de que, hoje, a incidência de HCC é igual à sua mortalidade. O desenvolvimento da DHGNA e sua evolução para HCC é complexa, o que torna difícil o desenvolvimento de alvos para o diagnóstico e tratamento desta neoplasia. Portanto, é de fundamental importância a avaliação de biomarcadores que possam ser utilizados para o diagnóstico precoce, e também como alvos terapêuticos.

Neste experimento, demonstramos o possível papel de marcadores tumorais, epigenéticos e de autofagia no processo de hepatocarcinogênese associado à DHGNA em modelo animal, e também a provável influência da rifaximina como fator de proteção para o desenvolvimento do HCC, dados que merecem ser aprofundados em futuros estudos.

Nosso grupo de pesquisa está envolvido em estudos para melhor avaliação e consolidação dos resultados obtidos, tanto em modelo experimental quanto em humanos. Do ponto de vista experimental, iniciaremos experimento sobre o uso de rifaximina desde o início da exposição dos animais à dieta e ao agente cancerígeno, associada ou não à estatina, simulando o que vem sendo testado em humanos na prevenção de complicações da cirrose, em estudos como o Liverhope. Ao mesmo tempo, testaremos *in vitro* o efeito dessa associação sobre o HCC. Em humanos, há estudo em andamento sobre a influência de autofagia e epigenética em material de ressecção de carcinoma hepatocelular. Ainda,

há outro projeto com o objetivo de avaliar o papel da lipofagia em animais com DHGNA, bem como em tecido hepático de humanos, obtido no momento da realização de cirurgia bariátrica e um ano após.

Também é interessante ressaltar o papel da microbiota intestinal no desenvolvimento de doenças hepáticas, como DHGNA e HCC. Nesse interim, é necessário aprofundar o estudo das características da população de bactérias e outros microorganismos, como fungos, que podem influenciar nesse risco, bem como a modulação da mesma com objetivos terapêuticos, através do uso de dietas específicas e / ou fármacos. Estudos com estes objetivos estão em desenvolvimento em nosso grupo de pesquisa.



## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Eslam M, Sanyal AJ, George J, Panel IC. MAFLD: A Consensus-Driven Proposed Nomenclature for Metabolic Associated Fatty Liver Disease. *Gastroenterology*. 2020;158(7):1999-2014.e1.
2. Eslam M, Newsome PN, Sarin SK, Anstee QM, Targher G, Romero-Gomez M, et al. A new definition for metabolic dysfunction-associated fatty liver disease: An international expert consensus statement. *J Hepatol*. 2020.
3. Kuchay MS, Choudhary NS, Mishra SK. Pathophysiological mechanisms underlying MAFLD. *Diabetes Metab Syndr*. 2020;14(6):1875-87.
4. Guo F, Estévez-Vázquez O, Benedé-Ubieto R, Maya-Miles D, Zheng K, Gallego-Durán R, et al. A Shortcut from Metabolic-Associated Fatty Liver Disease (MAFLD) to Hepatocellular Carcinoma (HCC): c-MYC a Promising Target for Preventative Strategies and Individualized Therapy. *Cancers (Basel)*. 2021;14(1).
5. Wu Y, Zhang J, Li Q. Autophagy, an accomplice, or antagonist of drug resistance in HCC? *Cell Death Dis*. 2021;12(3):266.
6. Campisano S, La Colla A, Echarte SM, Chisari AN. Interplay between early-life malnutrition, epigenetic modulation of the immune function and liver diseases. *Nutr Res Rev*. 2019;32(1):128-45.
7. Fernández-Barrena MG, Arechederra M, Colyn L, Berasain C, Avila MA. Epigenetics in hepatocellular carcinoma development and therapy: The tip of the iceberg. *JHEP Rep*. 2020;2(6):100167.
8. Anstee QM, Reeves HL, Kotsiliti E, Govaere O, Heikenwalder M. From NASH to HCC: current concepts and future challenges. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2019;16(7):411-28.
9. Han TS, Ban HS, Hur K, Cho HS. The Epigenetic Regulation of HCC Metastasis. *Int J Mol Sci*. 2018;19(12).
10. Pinyol R, Torrecilla S, Wang H, Montironi C, Piqué-Gili M, Torres-Martin M, et al. Molecular characterisation of hepatocellular carcinoma in patients with non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol*. 2021;75(4):865-78.
11. Al-Shenawy HA. Expression of Beclin-1, an autophagy-related marker, in chronic hepatitis and hepatocellular carcinoma and its relation with apoptotic markers. *APMIS*. 2016;124(3):229-37.

12. Parizadeh SM, Jafarzadeh-Esfehani R, Ghandehari M, Goldani F, Parizadeh SMR, Hassanian SM, et al. MicroRNAs as Potential Diagnostic and Prognostic Biomarkers in Hepatocellular Carcinoma. *Curr Drug Targets*. 2019;20(11):1129-40.
13. Allaire M, Rautou PE, Codogno P, Lotersztajn S. Autophagy in liver diseases: Time for translation? *J Hepatol*. 2019;70(5):985-98.
14. Li X, Jiang F, Ge Z, Chen B, Yu J, Xin M, et al. Fructose-Bisphosphate Aldolase A Regulates Hypoxic Adaptation in Hepatocellular Carcinoma and Involved with Tumor Malignancy. *Dig Dis Sci*. 2019;64(11):3215-27.
15. Ashraf TS, Obaid A, Saeed TM, Naz A, Shahid F, Ahmad J, et al. Formal model of the interplay between TGF $\beta$ 1 and MMP-9 and their dynamics in hepatocellular carcinoma. *Math Biosci Eng*. 2019;16(5):3285-310.
16. Scheau C, Badarau IA, Costache R, Caruntu C, Mihai GL, Didilescu AC, et al. The Role of Matrix Metalloproteinases in the Epithelial-Mesenchymal Transition of Hepatocellular Carcinoma. *Anal Cell Pathol (Amst)*. 2019; 2019:9423907.
17. Wang J, et al. Oncogene TUBA1C promotes migration and proliferation in hepatocellular carcinoma and predicts a poor prognosis. *Oncotarget*. 2017 Nov 10; 8(56): 96215–96224.
18. Abdel-Razik A, Mousa N, Shabana W, Refaey M, Elzehery R, Elhelaly R, et al. Rifaximin in nonalcoholic fatty liver disease: hit multiple targets with a single shot. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2018;30(10):1237-46.
19. Cobbold JFL, Atkinson S, Marchesi JR, Smith A, Wai SN, Stove J, et al. Rifaximin in non-alcoholic steatohepatitis: An open-label pilot study. *Hepatol Res*. 2018;48(1):69-77.
20. Barcelos STA, Silva-Sperb AS, Moraes HA, Longo L, de Moura BC, Michalczuk MT, et al. Oral 24-week probiotics supplementation did not decrease cardiovascular risk markers in patients with biopsy proven NASH: A double-blind placebo-controlled randomized study. *Ann Hepatol*. 2023;28(1):100769.
21. Leone P, Mincheva G, Balzano T, Malaguarnera M, Felipo V, Llansola M. Rifaximin Improves Spatial Learning and Memory Impairment in Rats with Liver Damage-Associated Neuroinflammation. *Biomedicines*. 2022;10(6).
22. Gangarapu V, Ince AT, Baysal B, Kayar Y, Kılıç U, Gök Ö, et al. Efficacy of rifaximin on circulating endotoxins and cytokines in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2015;27(7):840-5.

23. Massoud O, Charlton M. Nonalcoholic fatty liver disease/Nonalcoholic steatohepatitis and hepatocellular carcinoma. *Clin Liver Dis* 2018; 22(1):201-11.
24. Sanyal AJ. Past, present and future perspectives in nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2019; 16(6):377-86.
25. Benedict M, Zhang X. Non-alcoholic fatty liver disease: An expanded review. *World J Hepatol* 2017; 9(16):715-32.
26. Takahashi Y, Fukusato T. Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *World J Gastroenterol* 2014; 20(42):15539-48.
27. Younossi ZM, Marchesini G, Pinto-Cortez H, Petta S. Epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis: Implications for liver transplantation. *Transplantation* 2019; 103(1):22-27.
28. Bellentani S. The epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int* 2017; 37(Suppl 1):81-4.
29. Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, Fazel Y, Henry L, Wymer M. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology* 2016; 64(1):73-84.
30. Perumpail BJ, Khan MA, Yoo ER, Cholankeril G, Kim D, Ahmed A. Clinical epidemiology and disease burden of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol*. 2017; 23(47):8263-76.
31. White DL, Kanwal F, El-Serag HB. Association between nonalcoholic fatty liver disease and risk for hepatocellular cancer, based on systematic review. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2012;10(12):1342-59.e2.
32. Estes C, Razavi H, Loomba R, Younossi Z, Sanyal AJ. Modeling the epidemic of nonalcoholic fatty liver disease demonstrates an exponential increase in burden of disease. *Hepatology*. 2018;67(1):123-33.
33. Stefan N, Häring HU, Cusi K. Non-alcoholic fatty liver disease: causes, diagnosis, cardiometabolic consequences, and treatment strategies. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2019; 7(4):313-24.
34. Villanueva A. Hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 2019; 380:1450-62.
35. Kulik L, El-Serag HB. Epidemiology and management of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2019; 156(2):477-91.
36. Yang JD, Hainaut P, Gores GJ, Amadou A, Plymoth A, Roberts LR. A global view of hepatocellular carcinoma: trends, risk, prevention and management. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2019.

37. Zhu RX, Seto WK, Lai CL, Yuen MF. Epidemiology of hepatocellular carcinoma in the Asia-Pacific region. *Gut Liver* 2016; 10(3):332-9.
38. El-Serag HB, Kanwal F. Epidemiology of hepatocellular carcinoma in the United States: Where are we? Where do we go? *Hepatology* 2014; 60(5):1767-75.
39. Kim HS, El-Serag HB. The epidemiology of hepatocellular carcinoma in the USA. *Curr Gastroenterol Rep* 2019; 21(4):17.
40. White DL, Thrift AP, Kanwal F, Davila J, El-Serag HB. Incidence of hepatocellular carcinoma in all 50 United States, from 2000 through 2012. *Gastroenterology* 2017; 152(4):812-20.
41. Kikuchi L, Chagas AL, Alencar RS, Paranaguá-Vezozzo DC, Carrilho FJ. Clinical and epidemiological aspects of hepatocellular carcinoma in Brazil. *Antivir Ther* 2013; 18(3):445 9.
42. Bittencourt PL, Farias AQ, Couto CA. Liver transplantation in Brazil. *Liver Transpl* 2016; 22(9):1254-58.
43. Paranaguá-Vezozzo DC, Ono SK, Alvarado-Mora MV, Farias AQ, Cunha-Silva M, França JI, Alves VA, Sherman M, Carrilho FJ. Epidemiology of HCC in Brazil: Incidence and risk factors in a ten-year cohort. *Ann Hepatol* 2014; 13(4):386-93.
44. Balbi E, Moreira JPL, Luiz RR, Perez RM, de Souza HSP. Time trends and geographic distribution of hepatocellular carcinoma in Brazil: An ecological study. *Medicine (Baltimore)*. 2022 Sep 23;101(38):e30614.
45. Ghouri YA, Mian I, Rowe JH. Review of hepatocellular carcinoma: Epidemiology, etiology, and carcinogenesis. *J Carcinog* 2017; 16:1.
46. Desai A, Sandhu S, Lai JP, Sandhu DS. Hepatocellular carcinoma in non-cirrhotic liver: A comprehensive review. *World J Hepatol* 2019; 11(1):1-18.
47. Klein S, Dufour JF. Nonalcoholic fatty liver disease and hepatocellular carcinoma. *Hepat Oncol* 2017; 4(3):83-98.
48. Baecker A, Liu X, La Vecchia C, Zhang ZF. Worldwide incidence of hepatocellular carcinoma cases attributable to major risk factors. *Eur J Cancer Prev* 2018; 27(3):205-212.
49. Wong RJ, Cheung R, Ahmed A. Nonalcoholic steatohepatitis is the most rapidly growing indication for liver transplantation in patients with hepatocellular carcinoma in the U.S. *Hepatology* 2014; 59(6):2188-95.

50. Younossi ZM. Non-alcoholic fatty liver disease - A global public health perspective. *J Hepatol* 2019; 70(3):531-44.
51. Granja SC, Longatto-Filho A, de Campos PB, Oliveira CP, Stefano JT, Martins-Filho SN, Chagas AL, Herman P, D'Albuquerque LC, Reis Alvares-da-Silva M, Carrilho FJ, Baltazar F, Alves VAF. Non-Alcoholic Fatty Liver Disease-Related Hepatocellular Carcinoma: Immunohistochemical Assessment of Markers of Cancer Cell Metabolism. *Pathobiology*. 2022;89(3):157-165.
52. Qian H, Chao X, Williams J, Fulte S, Li T, Yang L, et al. Autophagy in liver diseases: A review. *Mol Aspects Med*. 2021.
53. Shen S, Wang R, Qiu H, Li C, Wang J, Xue J, et al. Development of an Autophagy-Based and Stemness-Correlated Prognostic Model for Hepatocellular Carcinoma Using Bulk and Single-Cell RNA-Sequencing. *Front Cell Dev Biol*. 2021.
54. Xiao G, Jin LL, Liu CQ, Wang YC, Meng YM, Zhou ZG, et al. EZH2 negatively regulates PD-L1 expression in hepatocellular carcinoma. *J Immunother Cancer*. 2019;7(1):300.
55. Du P, Luo K, Li G, Zhu J, Xiao Q, Li Y, et al. PRMT4 promotes hepatocellular carcinoma progression by activating AKT/mTOR signaling and indicates poor prognosis. *Int J Med Sci*. 2021;18(15):3588-98.
56. Baek SH, Kim KI. Epigenetic Control of Autophagy: Nuclear Events Gain More Attention. *Mol Cell*. 2017;65(5):781-5.
57. Zhang DG, Zheng JN, Pei DS. P53/microRNA-34-induced metabolic regulation: new opportunities in anticancer therapy. *Mol Cancer*. 2014; 13:115.
58. Wang X, Mackowiak B, Gao B. MicroRNAs as regulators, biomarkers and therapeutic targets in liver diseases. *Gut* 2021; 70:784–795.
59. Amr KS, Elmawgoud Atia HA, Elazeem Elbnhawy RA, Ezzat WM. Early diagnostic evaluation of miR-122 and miR-224 as biomarkers for hepatocellular carcinoma. *Genes Dis*. 2017;4(4):215-21.
60. Gumilas NSA, Widodo I, Ratnasari N, Heriyanto DS. Potential relative quantities of miR-122 and miR-150 to differentiate hepatocellular carcinoma from liver cirrhosis. *Noncoding RNA Res*. 2022;7(1):34-9.
61. Chun KH. Molecular Targets and Signaling Pathways of microRNA-122 in Hepatocellular Carcinoma. *Pharmaceutics*. 2022;14(7).

62. Zhang DG, Zheng JN, Pei DS. P53/microRNA-34-induced metabolic regulation: new opportunities in anticancer therapy. *Mol Cancer*. 2014; 13:115.
63. Wang Y et al. miR-143 inhibits proliferation and invasion of hepatocellular carcinoma cells via down-regulation of TLR2 expression. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi*. 2014.
64. Mamdouh S et al. Evaluation of Mir-224, Mir-215 and Mir-143 as Serum Biomarkers for HCV Associated Hepatocellular Carcinoma. *Asian Pac J Cancer Prev* 2017; 18 (11), 3167-3171.
65. Samah Mamdouh, Fatma Khorshed, Tarek Aboushousha, Hussam Hamdy, Ayman Diab, Mohamed Seleem, Mohamed Saber. Evaluation of Mir-224, Mir-215 and Mir-143 as Serum Biomarkers for HCV Associated Hepatocellular Carcinoma. *Asian Pac J Cancer Prev*, 18 (11), 3167-3171.
66. Li-ping Zhuang, Zhi-qiang Meng. Serum miR-224 Reflects Stage of Hepatocellular Carcinoma and Predicts Survival. *BioMed Research International* Volume 2015, Article ID 731781, 2015.
67. Yin J, Zhao X, Chen X, Shen G. Emodin suppresses hepatocellular carcinoma growth by regulating macrophage polarization via microRNA-26a/transforming growth factor beta 1/protein kinase B. *Bioengineered*. 2022;13(4):9548-63.
68. Wang Y, Sun B, Sun H, Zhao X, Wang X, Zhao N, et al. Regulation of proliferation, angiogenesis and apoptosis in hepatocellular carcinoma by miR-26b-5p. *Tumour Biol*. 2016;37(8):10965-79.
69. Na Zhao, et al. MicroRNA-26b suppresses the NF- $\kappa$ B signaling and enhances the chemosensitivity of hepatocellular carcinoma cells by targeting TAK1 and TAB3. *Molecular Cancer*, 2014; 13: 35.
70. Pallabi Debnath, Rohit Singh Huirem, Paloma Dutta, Santanu Palchoudhuri. Epithelial-mesenchymal transition and its transcription factors. *Biosci Rep*. 2022 Jan 28;42(1)
71. Huang Z, Zhang Z, Zhou C, Liu L, Huang C. Epithelial-mesenchymal transition: The history, regulatory mechanism, and cancer therapeutic opportunities. *MedComm* (2020). 2022 May 18;3(2):e144.
72. Scheau C, Badarau I, Costache R, Caruntu C, Mihai G, Didilescu A, Constantin C, Neagu M. The Role of Matrix Metalloproteinases in the Epithelial-Mesenchymal Transition of Hepatocellular Carcinoma. *Anal Cell Pathol (Amst)*. 2019 Nov 26;2019.
73. Ashraf TS, Obaid A, Saeed TM, Naz A, Shahid F, Ahmad J, et al. Formal model

of the interplay between TGF $\beta$ 1 and MMP-9 and their dynamics in hepatocellular carcinoma. *Math Biosci Eng.* 2019;16(5):3285-310.

74. Scheau C, Badarau IA, Costache R, Caruntu C, Mihai GL, Didilescu AC, et al. The Role of Matrix Metalloproteinases in the Epithelial-Mesenchymal Transition of Hepatocellular Carcinoma. *Anal Cell Pathol (Amst)*. 2019; 2019:9423907.

75. Jiang JW, Chen XH, Ren Z, Zheng SS. Gut microbial dysbiosis associates hepatocellular carcinoma via the gut-liver axis. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2019; 18(1):19-27.

76. Ponziani FR, Bhoori S, Castelli C, Putignani L, Rivoltini L, Del Chierico F, Sanguinetti M, Morelli D, Paroni Sterbini F, Petito V, Reddel S, Calvani R, Camisaschi C, Picca A, Tuccitto A, Gasbarrini A, Pompili M, Mazzaferro V. Hepatocellular carcinoma is associated with gut microbiota profile and inflammation in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2019 a; 69(1):107-20.

77. Tao X, Wang N, Qin W. Gut microbiota and hepatocellular carcinoma. *Gastrointest Tumors* 2015; 2(1):33-40.

78. Chu H, Williams B, Schnabl B. Gut microbiota, fatty liver disease, and hepatocellular carcinoma. *Liver Res* 2018; 2(1):43-51.

79. Tripathi A, Debelius J, Brenner DA, Karin M, Loomba R, Schnabl B, Knight R. The gut-liver axis and the intersection with the microbiome. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2018; 15(7):397-411.

80. Gupta H, Youn GS, Shin MJ, Suk KT. Role of gut microbiota in hepatocarcinogenesis. *Microorganisms* 2019; 7(5): E121.

81. Roderburg C, Luedde T. The role of the gut microbiome in the development and progression of liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Gut Microbes* 2014; 5(4):441-5.

82. Yu LX, Schwabe RF. The gut microbiome and liver cancer: mechanisms and clinical translation. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2017; 14(9):527-39.

83. Forner A, Reig M, Bruix J, Hepatocellular carcinoma. *The Lancet* 2018; 391(10127):1301-14.

84. Bteich F, Di Bisceglie AM. Current and future systemic therapies for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterol Hepatol* 2019; 15(5):266-72.

85. Li D, Sedano S, Allen R, Gong J, Cho M, Sharma S. Current treatment landscape for advanced hepatocellular carcinoma: Patient outcomes and the impact on quality of life. *Cancers* 2019; 11(6): E841. doi: 10.3390/cancers11060841.

86. Zhou K, Fountzilas C. Outcomes and quality of life of systemic therapy in advanced hepatocellular carcinoma. *Cancers* 2019; 11(6):861.
87. Darnaud M, Faivre J, Moniaux N. Targeting gut flora to prevent progression of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2013; 58(2):385-7.
88. Ponziani FR, Bhoori S, Castelli C, Putignani L, Rivoltini L, Del Chierico F, Sanguinetti M, Morelli D, Paroni Sterbini F, Petito V, Reddel S, Calvani R, Camisaschi C, Picca A, Tuccitto A, Gasbarrini A, Pompili M, Mazzaferro V. Hepatocellular carcinoma is associated with gut microbiota profile and inflammation in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2019 a; 69(1):107-20.
89. Ponziani FR, Gerardi V, Pecere S, D'Aversa F, Lopetuso L, Zocco MA, Pompili M, Gasbarrini A. Effect of rifaximin on gut microbiota composition in advanced liver disease and its complications. *World J Gastroenterol* 2015; 21:12322-33.
90. Flamm SL, Mullen KD, Heimanson Z, Sanyal AJ. Rifaximin has the potential to prevent complications of cirrhosis. *Therap Adv Gastroenterol* 2018 doi: 10.1177/1756284818800307.
91. Ponziani FR, Scaldaferri F, Petito V, Paroni Sterbini F, Pecere S, Lopetuso LR, Palladini A, Gerardi V, Masucci L, Pompili M, Cammarota G, Sanguinetti M, Gasbarrini A. The role of antibiotics in gut microbiota modulation: The eubiotic effects of rifaximin. *Dig Dis* 2016; 34(3):269-78.
92. Ponziani FR, Zocco MA, D'Aversa F, Pompili M, Gasbarrini A. Eubiotic properties of rifaximin: Disruption of the traditional concepts in gut microbiota modulation. *World J Gastroenterol* 2017; 23(25):4491-99.
93. Dapito DH, Mencin A, Gwak GY, Pradere JP, Jang MK, Mederacke I, Caviglia JM, Khiabani H, Adeyemi A, Bataller R, Lefkowitz JH, Bower M, Friedman R, Sartor RB, Rabadan R, Schwabe RF. Promotion of hepatocellular carcinoma by the intestinal microbiota and TLR4. *Cancer Cell* 2012; 21(4):504-16.
94. Uehara T, Pogribny IP, Rusyn I. The DEN and CCl<sub>4</sub> -Induced Mouse Model of Fibrosis and Inflammation-Associated Hepatocellular Carcinoma. *Curr Protoc Pharmacol* [Internet]. 2014 Sep 2;2014(1):14.30.1-14.30.10.
95. Travis C. Diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis in rats: A theoretical study\*1. *Toxicol Appl Pharmacol* [Internet]. 1991 Jun;109(2):289–304.
96. Wu J. Utilization of animal models to investigate nonalcoholic steatohepatitis-associated hepatocellular carcinoma. *Oncotarget* [Internet]. 2016 Jul 5;7(27):42762- 76.



97. Santos NP, Colaço AA, Oliveira PA. Animal models as a tool in hepatocellular carcinoma research: A Review. *Tumor Biol* [Internet]. 2017 Mar 28;39(3):101042831769592.
98. Ozawa T, Maehara N, Kai T, Arai S, Miyazaki T. Dietary fructose-induced hepatocellular carcinoma development manifested in mice lacking apoptosis inhibitor of macrophage (AIM). *Genes to Cells* [Internet]. 2016 Dec;21(12):1320–32.
99. Hill-Baskin AE, Markiewski MM, Buchner DA, Shao H, Desantis D, Hsiao G, et al. Diet-induced hepatocellular carcinoma in genetically predisposed mice. *Hum Mol Genet* [Internet]. 2009 Aug 15;18(16):2975–88.
100. Kishida N, Matsuda S, Itano O, Shinoda M, Kitago M, Yagi H, et al. Development of a novel mouse model of hepatocellular carcinoma with nonalcoholic steatohepatitis using a high-fat, choline-deficient diet and intraperitoneal injection of diethylnitrosamine. *BMC Gastroenterol* [Internet]. 2016 Dec 13;16(1):61.
101. Raubenheimer PJ, Nyirenda MJ, Walker BR. A Choline-Deficient Diet Exacerbates Fatty Liver but Attenuates Insulin Resistance and Glucose Intolerance in Mice Fed a High-Fat Diet. *Diabetes* [Internet]. 2006 Jul 1;55(7):2015–20.
102. Asgharpour A, Cazanave SC, Pacana T, Seneshaw M, Vincent R, Banini BA, et al. A diet-induced animal model of non-alcoholic fatty liver disease and hepatocellular cancer. *J Hepatol* [Internet]. 2016 Sep;65(3):579–88.
103. Jahn D, Kircher S, Hermanns HM, Geier A. Animal models of NAFLD from a hepatologists point of view. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis*. 2019 May;1865(5):943–53.
104. Heindryckx F, Colle I, Van Vlierberghe H. Experimental mouse models for hepatocellular carcinoma research. *Int J Exp Pathol* [Internet]. 2009 Aug;90(4):367–86.
105. de Lima VMR, Oliveira CPMS, Alves VAF, Chammas MC, Oliveira EP, Stefano JT, et al. A rodent model of NASH with cirrhosis, oval cell proliferation and hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* [Internet]. 2008 Dec;49(6):1055–61.
106. Levy CDS, De Barros Costa FG, Faria DDP, Stefano JT, Cogliati B, Oliveira CP. 18F-FDG PET/CT as an assessment tool of hepatocellular carcinoma secondary to non-alcoholic fatty liver disease development in experimental model. *Arq Gastroenterol*. 2019 Mar;56(1):45–50.
107. Stefano JT, Pereira IVA, Torres MM, Bida PM, Coelho AMM, Xerfan MP, et al. Sorafenib prevents liver fibrosis in a non-alcoholic steatohepatitis (NASH) rodent model. *Brazilian J Med Biol Res* [Internet]. 2015 May;48(5):408–14.