



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS MÉDICAS
FACULDADE DE MEDICINA**

EDNEIDE QUINTINO SALES

LUCAS BRELAZ E SILVA

**ESTUDOS DE POLIMORFISMOS FUNCIONAIS NOS GENES ABCC2 E GGH EM
PACIENTES COM DOENÇA HEPÁTICA CRÔNICA E CARCINOMA
HEPATOCELULAR.**

BELÉM - PA

2023

EDNEIDE QUINTINO SALES

LUCAS BRELAZ E SILVA

**ESTUDOS DE POLIMORFISMOS FUNCIONAIS NOS GENES ABCC2 E GGH EM
PACIENTES COM DOENÇA HEPÁTICA CRÔNICA E CARCINOMA
HEPATOCELULAR.**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado para obtenção de grau em
Medicina pela Universidade Federal do
Pará.

Orientadora: Professora Dra. Samia
Demachki

Co-orientadora: Dra. Ana Karyssa
Mendes Anaissi

BELÉM - PA

2023

EDNEIDE QUINTINO SALES

LUCAS BRELAZ E SILVA

**ESTUDOS DE POLIMORFISMOS FUNCIONAIS NOS GENES ABCC2 E GGH EM
PACIENTES COM DOENÇA HEPÁTICA CRÔNICA E CARCINOMA
HEPATOCELULAR.**

**Trabalho de Conclusão de Curso apresentado para obtenção do grau em Medicina pela
Universidade Federal do Pará**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado para obtenção do grau em Medicina pela
Universidade Federal do Pará.

Banca examinadora:

Samia Demachki
Orientadora

Ana Karyssa Mendes Anaissi
Co-orientadora

Lizomar Mória/ Universidade Federal do Pará

Ney Santos /Universidade Federal do Pará

Aprovado em: ____/____/____

Conceito: _____

AGRADECIMENTOS

Aos meus queridos pais, Ivoneide Quintino Sales e José Edvaldo Pereira Sales, pelo apoio, incentivo e amor incondicional que sempre me dedicaram. Por acreditarem em mim e não medirem esforços para que eu chegasse até aqui.

À querida orientadora Dra. Samia Demachki, por ser dedicada, paciente e incansável. Pelo conhecimento, tempo e apoio concedidos como professora, orientadora e profissional, durante a minha trajetória acadêmica.

À querida Dra. Ana Karyssa, pelo acolhimento, pelos conselhos sobre a vida e pelos conhecimentos compartilhados, permitindo o meu crescimento profissional.

Ao meu amigo, Lucas Brelaz, por compartilhar junto comigo jornadas acadêmicas e desafios da vida. Por ser um irmão.

À Beatriz MacDowell, por todo amor recebido. Pela parceria, cumplicidade, incentivo e dedicação mútua.

À minha psicóloga, Carolina Ventura, pela dedicação, empatia e profissionalismo ao me disponibilizar ferramentas de autoconhecimento e de aprendizado.

Às professoras, Rayssa Miranda e Sílvia Nascimento, por me inspirarem e me ensinarem a forma mais bela de exercer a medicina.

A todos os funcionários do Laboratório de Anatomia Patológica pelo carinho e apoio estrutural para que esse trabalho lograsse.

Ao Prof. Ney Santos e Prof. Sidney Santos do Núcleo de Pesquisa em Oncologia (NPO) pela contribuição na cessão do painel de polimorfismo utilizado neste estudo.

Edneide Quintino Sales

A Deus por toda honra e glória e por ter me permitido chegar onde estou.

À minha querida mãe, Rosenilda Brelaz, por ter se sacrificado de diversas formas para que eu pudesse chegar aqui. Por todas as orações e conselhos a fim de que eu caminhasse pelos caminhos certos. Por todos os abraços e por ter dividido comigo essa jornada até aqui.

À excelentíssima orientadora Dra. Samia Demachki, por toda paciência, por ter me acolhido como filho em seu laboratório, por me estimular a crescer e buscar mais conhecimento, por me estimular a conquistar grandes projetos e sonhos, além de me ensinar a respeitar o passado.

À atenciosa e graciosa Dra. Ana Karyssa, por todos os ensinamentos, conselhos e orientações a fim de que possa me tornar um excelente profissional.

À minha caríssima companheira, Edneide Sales, por ter aceitado estar comigo em diversas missões e projetos ao longo da faculdade. Por ter sido uma irmã de coração ao longo da faculdade.

Às minhas tias Renilda Brelaz, Carmen Brelaz e Rosa Brelaz, ao meu tio Reinivaldo Brelaz e ao meu namorado Fernando por todo apoio estrutural e financeiro para com meus estudos.

A todos os funcionários do Laboratório de Anatomia Patológica pelo carinho e apoio estrutural para que esse trabalho lograsse.

Ao Prof. Ney Santos e Prof. Sidney Santos do Núcleo de Pesquisa em Oncologia (NPO) pela contribuição na cessão do painel de polimorfismo utilizado neste estudo.

Lucas Brelaz e Silva

Cuidado é singular. Como as pessoas também são.

- Júlia Rocha, *Pacientes que curam*

A informação em nossos genes é muito antiga - a maior parte tem milhões de anos, uma parte, bilhões de anos de idade. Em contraste, a informação em nossos livros têm no máximo alguns milhares de anos, e a que está em nosso cérebro, no máximo algumas décadas.

- Carl Sagan, *Cosmos*

Resumo

INTRODUÇÃO: O câncer hepatocelular ou carcinoma hepato celular (CHC), em homens, é o 5º câncer mais comum e, em mulheres, é o 7º, sendo 4-8 vezes mais comum em homens do que em mulheres, apresentando um pico de incidência de 70 anos. O fator de risco mais importante para o desenvolvimento do CHC é a cirrose, sendo que os vírus das hepatites B e C são os principais agentes etiológicos envolvidos no desenvolvimento do CHC, em cerca de 70 a 80% dos casos. **OBJETIVO:** Investigar o papel de polimorfismos nos genes *ABCC2* e *GGH* em pacientes com hepatite crônica pelos vírus B e C e com carcinoma hepatocelular (CHC). **METODOLOGIA:** Foi realizado um estudo transversal, observacional e descritivo, no período de julho de 2022 a julho de 2023, a partir da pesquisa de dados ainda não descritos no repositório de dados experimentais, depositados no sistema RedCap. **RESULTADOS:** Participaram deste estudo 59 pacientes, onde 69,49% eram do sexo masculino, foram identificados 2 casos (5,71%) de CHC no grupo do gene *ABCC2* (rs717620) e 1 caso (4,16%) no grupo *GGH* (rs3758149). Quanto à caracterização genotípica dos polimorfismos dos genes, foi observado uma frequência de 80% do perfil C/C no grupo do gene *ABCC2* e uma frequência de 58,3% dos perfis A/A e A/G no grupo do gene *GGH*. **CONCLUSÃO:** Maior prevalência de indivíduos com diagnóstico de infecção pelos vírus das hepatites B e C em comparação às outras causas de hepatopatias crônicas, maioria dos do gênero masculino com idade superior a 60 anos. Quanto aos polimorfismos identificados, foi identificado maior prevalência do perfil genotípico C/C nos pacientes com hepatopatias crônicas por diversas causas, no gene *ABCC2* (rs717620), e prevalência do perfil genotípico A/A, no gene *GGH* (1801133) e com perda de peso, dor abdominal, dor óssea e icterícia.

PALAVRAS-CHAVE: CARCINOMA HEPATOCELULAR. HEPATITES VIRAIS. GENE *GGH*, GENE *ABCC2*.

Abstract

INTRODUCTION: Hepatocellular cancer or hepatocellular carcinoma (CHC) is the 5th most common cancer in men and the 7th in women, being 4-8 times more common in men than in women, with a peak incidence of 70 years. The most important risk factor for the development of CHC is cirrhosis, with hepatitis B and C viruses being the main etiological agents involved in the development of CHC, in about 70 to 80% of cases. **OBJECTIVE:** To investigate the role of polymorphisms in the *ABCC2* and *GGH* genes in patients with chronic hepatitis B and C viruses and hepatocellular carcinoma (CHC). **METHODOLOGY:** A cross-sectional, observational and descriptive study was carried out from July 2022 to July 2023 using the RedCap system. **RESULTS:** 59 patients participated in this study, 69.49% were male, 2 cases (5.71%) of hepatocellular carcinoma were identified in the *ABCC2* gene group (rs717620) and 1 case (4.16%) in the *GGH* group (rs3758149). As for the genotypic characterization of gene polymorphisms, a frequency of 80% of the C/C profile was observed in the *ABCC2* gene group and a frequency of 58.3% of the A/A and A/G profiles in the *GGH* gene group. **CONCLUSION:** There was a higher prevalence of individuals diagnosed with infection by the hepatitis B and C viruses compared to other causes of chronic liver disease, most of whom were males aged over 60 years. As for the identified polymorphisms, a higher prevalence of the C/C genotypic profile was identified in patients with chronic liver diseases due to various causes, in the *ABCC2* gene (rs717620), and a higher prevalence of the A/A genotypic profile, in the *GGH* gene (1801133) and with loss of weight, abdominal pain, bone pain and jaundice.

KEYWORDS: HEPATOCELLULAR CARCINOMA. VIRAL HEPATITIS. GENE *GGH*, GENE *ABCC2*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Incidência mundial de CHC em homens, em 2020

Figura 2 – Incidência mundial de CHC em mulheres, em 2020

Figura 3 - Eventos moleculares no desenvolvimento das etapas do CHC

Figura 4 - Distribuição geográfica dos principais genótipos do vírus da hepatite B e frequência mundial da infecção crônica pelo vírus da hepatite B

Figura 5 - Distribuição geográfica paralela entre a incidência da infecção crônica pelo vírus da hepatite B e a do carcinoma hepatocelular

Figura 6 – Taxa de incidência de hepatite A e taxa de detecção de hepatite B e C por ano de diagnóstico. Brasil, 2010 a 2020

Figura 7 – Organização genômica e proteica do HCV

Figura 8 - Localização do gene ABCC2 no braço curto do cromossomo 24

Figura 9 - Localização do gene GGH no braço curto do cromossomo 8

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Questionário CAGE

Tabela 2 - Critérios morfológicos para o estadiamento da fibrose pela classificação METAVIR

Tabela 3 - Classificação de Child-Pugh

Tabela 4 - Perfil clínico dos pacientes com hepatopatias crônicas com os polimorfismos dos genes GGH (rs3758149) e ABCC2 (rs717620) pesquisados

Tabela 5 - Perfil genotípico dos pacientes com hepatopatias crônicas com os polimorfismos dos genes GGH (rs3758149) e ABCC2 (rs717620) pesquisados

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Distribuição dos pacientes em relação aos genes, de acordo com o gênero

Gráfico 2 - Distribuição dos pacientes em relação aos genes, de acordo com as comorbidades (Diabetes Mellitus)

Gráfico 3 - Distribuição dos pacientes em relação aos genes, de acordo com os diagnósticos clínicos

Gráfico 4 – Média das idades dos pacientes no grupo do gene ABCC2 (rs717620)

Gráfico 5 – Média das idades dos pacientes no grupo do gene GGH (rs3758149)

Gráfico 6 - Perfil genotípico do polimorfismo do gene ABCC2 (rs717620)

Gráfico 7 - Perfil genotípico do polimorfismo do gene GGH (rs3758149)

Gráfico 8 - Frequência genotípica dos genes ABCC2 (rs717620) e GGH (rs3758149) em pacientes portadores de infecção pelo HCV

Gráfico 9 - Frequência genotípica dos genes ABCC2 (rs717620) e GGH (1801133) em pacientes com infecção pelo vírus HBV

LISTA DE ABREVIATURAS

AASLD - Associação Americana Para o Estudo de Doenças Hepáticas

ACR - Colégio Americano de Radiologistas

ADH - Enzima álcool desidrogenase

ADH 2 - Enzima álcool desidrogenase 2

ALDH2 - Enzima aldeído desidrogenase 2

AFP - Alfafetoproteína

ALT - Alanino Aminotransferase

AST - Asparto Aminotransferase

cDNA - DNA complementar

cccDNA - DNA circular fechado covalentemente

CEUS - Ultrassonografia com Contraste de Microbolhas

CH - Cirrose Hepática

CHC - Carcinoma Hepatocelular

DHA - Doença Hepática Alcoólica

DHGNA - Doença Hepática Gordurosa não Alcoólica

DM - Diabetes Mellitus

DM2 - Diabetes Mellitus 2

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

EHNA - Esteatose hepática não alcoólica

EROS - Espécies reativas de oxigênio

FAN - Fator antinúcleo

GGH - Gama-Glutamil Hidrolase

IGF-1 - Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1

IL-6 - Interleucina 6

IMC - Índice de massa corpórea

HAV - Vírus da Hepatite A

HBcAg - Antígeno core da Hepatite B

HBeAg - Antígeno E da Hepatite B

HBsAg - Antígeno de superfície da Hepatite B

HBV - Vírus da Hepatite B

HCV - Vírus da Hepatite C

HIV - Vírus da Imunodeficiência Humana

INR - Índice Normalizado Internacional

IRES - Sítios internos de entrada ribossômica

LI-RADS - Liver Imaging Reporting and Data System

MELD - Model for End-Stage Liver Disease

MS - Ministério da Saúde

NANBH - Hepatite “não-A, não-B”

NTCP - Co-transportador sódio-taurocolato

NTR - Regiões não-codificantes

OMS - Organização Mundial da Saúde

ORF - Região de uma única fase de leitura aberta

PNPLA3 - Proteína 3 domínios fosfolipase semelhante a patatina

PT - Protrombina

rcDNA - DNA viral circular relaxado

RNA - Ácido Ribonucleico

RNM - Ressonância Nuclear Magnética

SBH - Sociedade Brasileira de Hepatologia

SINAN - Sistema de Informação de Agravos de Notificação

SOP - Síndrome dos Ovários Policísticos

SNC - Sistema Nervoso Central

SVS - Secretaria de Vigilância em Saúde

TC - Tomografia Computadorizada

TNF ALFA - Fator de necrose tumoral alfa

UICC - União Internacional contra o Câncer

USG - Ultrassonografia

VLDL - Lipoproteínas de muito baixa densidade

SUMÁRIO

| | |
|--|--------------------------------------|
| AGRADECIMENTOS | Erro! Indicador não definido. |
| Resumo | Erro! Indicador não definido. |
| Abstract | Erro! Indicador não definido. |
| LISTA DE FIGURAS | Erro! Indicador não definido. |
| LISTA DE TABELAS | Erro! Indicador não definido. |
| LISTA DE GRÁFICOS | Erro! Indicador não definido. |
| LISTA DE ABREVIATURAS | Erro! Indicador não definido. |
| 1. INTRODUÇÃO | Erro! Indicador não definido. |
| 2. OBJETIVOS | Erro! Indicador não definido. |
| 2.1. OBJETIVO GERAL | Erro! Indicador não definido. |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | Erro! Indicador não definido. |
| 3. REVISÃO DE LITERATURA | Erro! Indicador não definido. |
| 3.1 EPIDEMIOLOGIA | Erro! Indicador não definido. |
| 3.2 FATORES DE RISCO | Erro! Indicador não definido. |
| 3.2.1 HEPATITE B | Erro! Indicador não definido. |
| 3.2.2 HEPATITE C | Erro! Indicador não definido. |

| | |
|---|--------------------------------------|
| 3.2.3 DOENÇA HEPÁTICA ALCOÓLICA (DHA) | Erro! Indicador não definido. |
| 3.2.4 DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO ALCOÓLICA (DHGNA) | Erro! |
| Indicador não definido. | |
| 3.2.6 CIRROSE HEPÁTICA (CH) | Erro! Indicador não definido. |
| 3.3 DIAGNÓSTICO..... | Erro! Indicador não definido. |
| 3.3.1 ALFAFETOPROTEÍNA..... | Erro! Indicador não definido. |
| 3.3.2 EXAMES DE IMAGEM | Erro! Indicador não definido. |
| 3.3.3 BIÓPSIA E DIAGNÓSTICO HISTOPATOLÓGICO | Erro! Indicador não definido. |
| 3.4 POLIMORFISMOS DOS GENES ABCC2 E GGH..... | 43 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS..... | Erro! Indicador não definido. |
| 4.1 TIPO DE ESTUDO | Erro! Indicador não definido. |
| 4.2 POPULAÇÃO DE ESTUDO | Erro! Indicador não definido. |
| 4.3 PERÍODO DA PESQUISA..... | Erro! Indicador não definido. |
| 5. RESULTADOS..... | Erro! Indicador não definido. |
| 6. DISCUSSÃO..... | Erro! Indicador não definido. |
| 7. CONCLUSÃO | Erro! Indicador não definido. |
| REFERÊNCIAS..... | Erro! Indicador não definido. |

1. INTRODUÇÃO

O câncer de fígado compreende um conjunto de tumores malignos que acomete este órgão, dentre eles, os mais comuns são o câncer hepatocelular ou carcinoma hepatocelular (CHC), o colangiocarcinoma (tumor que acomete as células biliares) e o hemangiocarcinoma (tumor que envolve as células dos vasos sanguíneos do fígado, sendo mais comum em crianças) (Carrilho, 2019; Nader, 2014). Em homens, é o 5º câncer mais comum e, em mulheres, é o 7º mais comum, sendo 4-8 vezes mais comum em homens do que em mulheres, apresentando um pico de incidência de 70 anos (El-serag, 2007; Villanueva, 2019). O fator de risco mais importante para o desenvolvimento do CHC é a cirrose, sendo que os vírus das hepatites B e C são os principais agentes etiológicos envolvidos no desenvolvimento do CHC, em cerca de 70 a 80% dos casos, embora hoje a doença hepática gordurosa não alcoólica, obesidade e o diabetes mellitus tenham uma contribuição considerável (Carrilho, 2019).

A diversidade genética pode ser evidenciada através das diferenças na organização do genoma, como nas alterações de nucleotídeos na sequência genômica, nas variações no número de cópias de grandes segmentos de DNA genômico, nas alterações na estrutura ou na quantidade de proteínas encontradas em vários tecidos, ou em qualquer um dos contextos de doenças clínicas (Thompson, 2007).

A Hepatite C é uma condição em que o fígado fica inflamado devido à infecção pelo vírus da hepatite C (HCV). Essa infecção pode ser transmitida por meio de contato com sangue contaminado, relação sexual ou pelo compartilhamento de agulhas e seringas entre usuários de drogas injetáveis. Além disso, também é possível ocorrer transmissão vertical. Estima-se que cerca de 185 milhões de pessoas em todo o mundo estejam infectadas com o vírus da hepatite C, e aproximadamente 657 mil pessoas convivam com a infecção de forma crônica (Nascimento, 2020).

A infecção causada pelo vírus da hepatite B (HBV) é uma das infecções mais frequentes e representa um problema de saúde pública no Brasil e em todo o mundo, devido ao alto índice de doenças graves e mortes associadas a ela. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), aproximadamente 257 milhões de pessoas, cerca de 3,5% da população global, estavam vivendo com infecção crônica pelo HBV em 2015 e, no mesmo ano, foram registradas cerca de 900 mil mortes relacionadas ao HBV em todo o mundo. As causas principais dos óbitos associados ao HBV são a cirrose e o CHC (Brasil, 2022).

A Cirrose Hepática (CH) é caracterizada como o estágio terminal de doenças hepáticas crônicas e é definida como um processo difuso caracterizado pelo estágio final da fibrose hepática avançada. Possui diferentes causas, dentre elas a infecção crônica pelo HCV e pelo HBV. A CH está presente em cerca de 90% dos pacientes com CHC, visto que é um fator de risco para o seu desenvolvimento (Agren, 2017).

Os polimorfismos genéticos são alterações genéticas frequentes encontradas em regiões dos cromossomos homólogos (*loci*) que são encontrados em uma frequência superior a 1% da população, caracterizadas por variações nas sequências de DNA, com a capacidade de alterar a função de proteínas e de enzimas, e, na maioria dos casos, parecem estar associados a apenas uma base, sendo que em alguns casos o polimorfismo pode até mesmo aumentar a susceptibilidade a alguns tipos de câncer (Lima, 2006). Um tipo de polimorfismo genético conhecido é o polimorfismo de nucleotídeo único (SNP), que consiste na mudança de um único nucleotídeo por outro, em uma região do DNA. Os SNPs podem ter efeito neutro, benigno ou maligno sobre a função dos genes, estando até mesmo relacionados à susceptibilidade dos indivíduos a alguns tipos de cânceres. No genoma humano é frequente o polimorfismo genético, correspondendo a aproximadamente 90% das variações interindividuais, algumas das quais podem estar relacionadas com respostas diferenciadas aos medicamentos (Benzaquem, 2009).

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Investigar e analisar os polimorfismos dos genes ABCC2 (rs717620) e GGH (rs3758149) de pacientes portadores de doença hepática crônica e de carcinoma hepatocelular.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

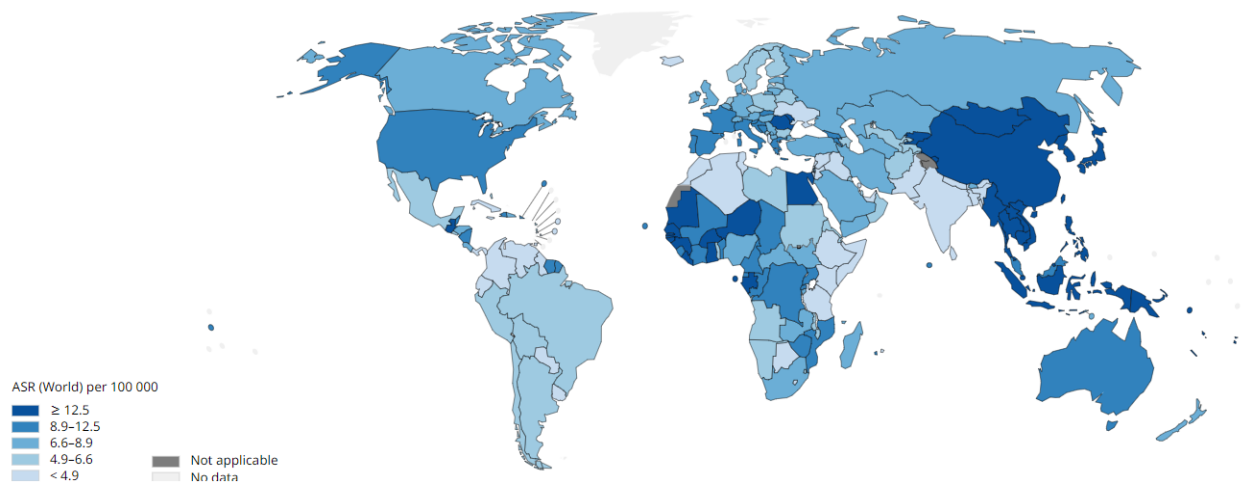
- Descrever o perfil epidemiológico dos pacientes com hepatopatia crônica e carcinoma hepatocelular da população estudada;
- Determinar e comparar a frequência de polimorfismos de nucleotídeos nos genes ABCC2 (rs717620) e GGH (rs3758149) entre pacientes com hepatites crônicas e carcinoma hepatocelular;
- Associar o polimorfismo nos genes ABCC2 (rs717620) e GGH (rs3758149) com os perfis epidemiológico e clínico dos pacientes com hepatite crônica e carcinoma hepatocelular.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 EPIDEMIOLOGIA

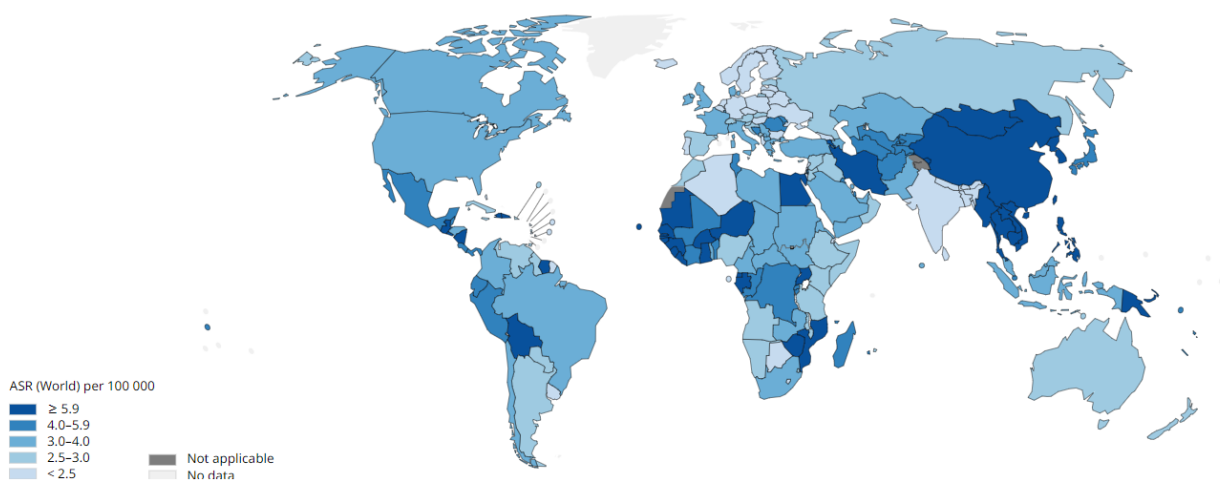
O câncer de fígado compreende um conjunto de tumores malignos que acomete este órgão, os quais podem ser divididos em primários, quando a lesão surge no parênquima hepático, e em secundários, quando se trata de lesões metastáticas provenientes de outros órgãos. Dentre os cânceres de fígado, os mais comuns são o câncer hepatocelular ou carcinoma hepatocelular (CHC), o colangiocarcinoma (tumor que acomete as células biliares) e o hemangiocarcinoma (tumor que envolve as células dos vasos sanguíneos do fígado, sendo mais comum em crianças). Globalmente, o câncer de fígado é o câncer que mais mata no mundo, depois do câncer de pulmão e do câncer de estômago, com um prognóstico ainda ruim, com uma taxa de sobrevivência em 5 anos de 18%. No Brasil, os tumores do fígado correspondem à oitava causa de morte em pacientes hospitalizados e o tumor tem uma incidência intermediária no país (Carrilho, 2019; Nader, 2014). Em homens, é o quinto câncer mais comum e, em mulheres, é o sétimo mais comum, sendo 4-8 vezes mais comum em homens do que em mulheres, apresentando um pico de incidência de 70 anos (El-serag, 2007; Villanueva, 2019). Uma explicação para a alta prevalência de CHC no sexo masculino reside no maior número de fatores de risco, como alcoolismo, tabagismo e hepatite viral, os quais são fatores de risco conhecidos para CHC, nesse gênero (Ganne-carrié, 2019). Ademais, o CHC tem maior prevalência em países em desenvolvimento, como os da Ásia e da América Latina.

Figura 1 – Incidência mundial de CHC em homens, em 2020



Fonte: GLOBOCAN, 2020

Figura 2 – Incidência mundial de CHC em mulheres, em 2020



Fonte: GLOBOCAN, 2020

A prevalência das etiologias da cirrose varia ao redor do mundo. Na África Subsaariana e no Sudeste Asiático, áreas tradicionais de alta incidência para CHC, a infecção pelo VHB representa a principal causa, enquanto que na Europa, no Japão, nos Estados Unidos e na América Latina, regiões com baixa incidência desse câncer, o vírus da hepatite C, em contraste, é o principal fator de risco (Gurtsevitch, 2008). A incidência de CHC vem aumentando nos últimos anos, especialmente na Europa e nos Estados Unidos, e a incidência de casos de CHC associado aos vírus das hepatites B e C vem aumentando nas últimas décadas (Hashim, 2016). Embora a incidência venha aumentando nos últimos anos e as novas modalidades de tratamento venham surgindo, a maioria dos pacientes têm baixa sobrevida (Siegel, 2023).

O fator de risco mais importante para o desenvolvimento do CHC é a cirrose, sendo que os vírus das hepatites B e C são os principais agentes etiológicos envolvidos no desenvolvimento do CHC, em cerca de 70 a 80% dos casos (Carrilho, 2019). O álcool também é um importante fator predisponente à cirrose hepática e ao CHC. Outros fatores de risco associados incluem a obesidade (IMC > 30 kg/m²), devido sua associação à esteatose hepática não alcoólica (EHNA), que é mais prevalente nesse grupo e é um fator de risco para cirrose hepática e CHC; as aflatoxinas e as doenças hepáticas metabólicas, como hemocromatose, deficiência de alfa-1-antitripsina, doença de Wilson e as porfirias. Especula-se que a diabetes mellitus seja um fator de risco para doença. Alguns acreditam que o tabagismo com carga tabágica > 20 maços-ano. O consumo de café tem sido associado como

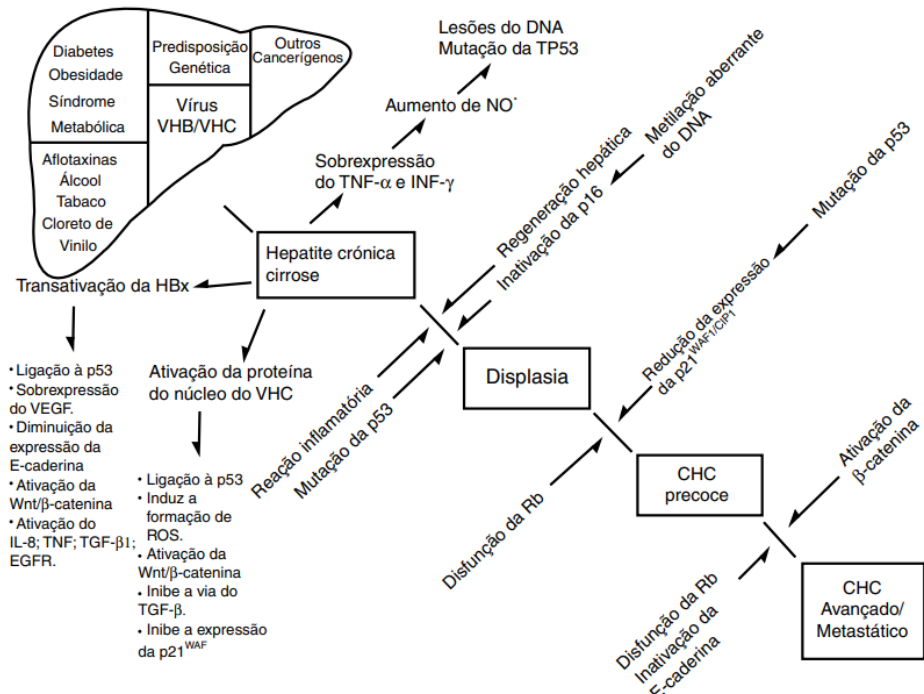
um protetor para o desenvolvimento de CHC, segundo um estudo prospectivo japonês envolvendo adultos japoneses de meia-idade (n = 90.452) mostrou maior risco para CHC em pacientes que nunca bebiam café em comparação aos que bebiam diariamente ou mais de três ou quatro vezes ao dia (Tamura, 2019).

O CHC pode se apresentar como um tumor unifocal, multifocal ou difusamente infiltrativo, sendo que todas essas apresentações apresentam potencial de invasão vascular. À medida que o tumor vai crescendo, ele vai perdendo sua diferenciação com as células hepáticas e começa a apresentar capacidade de invasão vascular, podendo gerar metástases.

3.2 FATORES DE RISCO

Vários são os fatores de risco associados ao CHC, sendo que uma característica comum a eles é o desenvolvimento de cirrose. Estima-se que a cirrose seja o fator mais importante para o CHC, haja vista que um terço dos pacientes com cirrose desenvolverão CHC durante a sua vida, baseado em estudos longitudinais (Ioannou, 2007; Sangiovanni, 2006). De todos os fatores de risco para o CHC, as infecções pelos vírus das hepatites B e C cobrem muito desses casos, sendo que o risco aumenta quando ocorre coinfeção com o vírus HIV (Massarweh, 2017). Além das hepatites virais, a doença hepática alcoólica e a doença hepática gordurosa não alcoólica contribuem substancialmente com a prevalência desse tumor. No mundo, com o aumento da prevalência da obesidade e do diabetes mellitus do tipo 2, tem-se observado que tais condições estão associadas com o aumento do risco de desenvolvimento de CHC, especialmente em países ocidentais, sendo considerados fatores de risco independentes. Além dos fatores de risco supracitados, existem doenças autoimunes e genéticas menos comuns envolvidas com o CHC, como a deficiência de alfa-1 antitripsina, a hemocromatose hereditária, doença de Wilson e a cirrose biliar primária (Heidelbaugh, 2006).

Figura 3 - Eventos moleculares no desenvolvimento das etapas do CHC



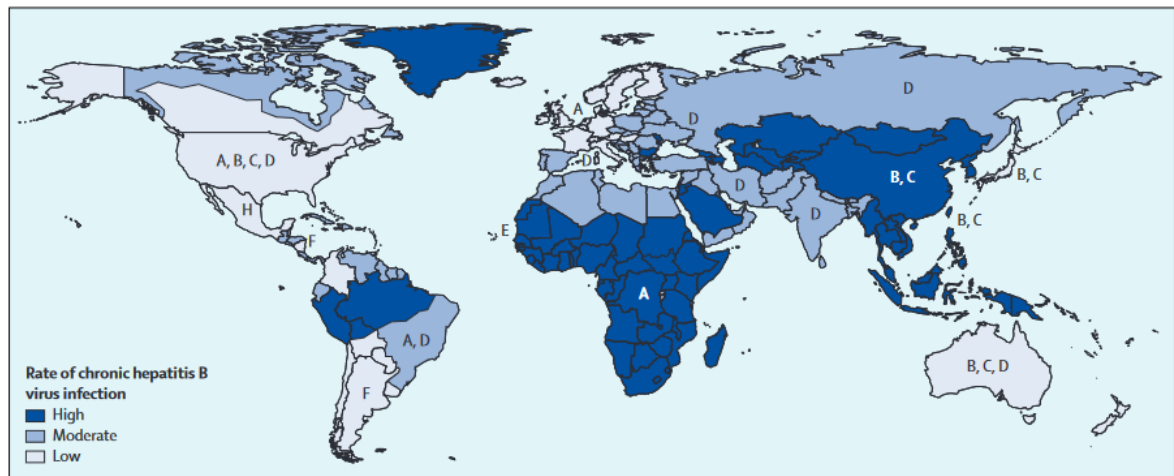
Fonte: GOMES, 2013

3.2.1 HEPATITE B

O vírus da hepatite é um vírus com tropismo pelo fígado e que constitui um problema de saúde pública no mundo. Trata-se de vírus pertencente à família Hepadnaviridae, a qual é composta por vírus envelopados que contém DNA de dupla-hélice circular de peso aproximado de 3.2 kbp, que infecta apenas humanos e, em menor extensão, chimpanzés. Dez genótipos do vírus são atualmente reconhecidos, nomeados de A a J, variando entre si quanto ao número de nucleotídeos. A distribuição geográfica dos genótipos varia ao redor do mundo, com o genótipo A mais prevalente no nordeste da Europa, América do Norte e África, enquanto os genótipos B e C são mais prevalentes na Ásia (Liu, Z. *et al.*, 2021), como mostrado na Figura 4. A importância do conhecimento do genótipo do vírus está envolvida com o risco de progressão para hepatite crônica e a resposta ao tratamento antiviral (Sunbul, M., 2014). O genoma é composto por quatro genes, os quais resultam em diferentes RNAs com um sítio de poli-A em comum, os quais codificam sete diferentes proteínas, a

saber: proteínas estruturais (HBsAg) e as proteínas do core (HbcAg, HbeAg, a polimerase e a proteína HbV X).

Figura 4 - Distribuição geográfica dos principais genótipos do HBV e frequência mundial da infecção crônica pelo HBV



Fonte: adaptado de US Centers for Disease Control and Infection (CDC), 2021

Segundo a OMS, quase um terço da população mundial já foi infectada pelo vírus da hepatite B, sendo que a maioria dos infectados desenvolvem episódios de infecção viral aguda pelo vírus. A maioria das infecções adquiridas na infância tornam-se crônicas, o que justifica a vacinação contra esse vírus nas primeiras horas após o nascimento. Há cerca de 296 milhões de infectados cronicamente pelo vírus pelo mundo, sendo que anualmente 1 milhão de pessoas morrem pelo mundo por complicações da infecção crônica pelo VHB (Who, 2023). Apesar da existência de vacina e tratamentos, a infecção pelo VHB é responsável por cerca de 1 milhão de mortes a cada ano por doenças hepáticas. Aproximadamente 95% dos adultos infectados se recuperam espontaneamente da infecção viral aguda, a qual se resolve dentro de alguns meses com a negativação do HbsAg (Liaw, Y.-F.; CHU, C.-M.; 2009).

A infecção pelo vírus é geralmente adquirida por via sexual, especialmente do sexo entre homens, do compartilhamento de agulhas em usuários de drogas intravenosas, bem como do risco ocupacional em profissionais de saúde durante os cuidados de saúde por meio da perfuração por objetos perfurocortantes, como agulhas. No sudeste asiático e na China, regiões de alta endemicidade, a transmissão perinatal é um meio mais importante de infecção, enquanto nos EUA, na Europa e na América Latina, regiões de menor endemicidade, a transmissão sexual e por perfuração por objetos perfurocortantes são mais importantes (Liaw,

Y.-F.; CHU, C.-M.; 2009). Outras fontes menos comuns de infecção por VHB incluem instrumentos odontológicos contaminados e doação de órgãos de indivíduos HbsAg reagentes, uma vez que o vírus consegue sobreviver fora do organismo humano por longo período (Nelson, P. *et al.*, 2011).

As partículas virais têm como alvo os hepatócitos, que são as principais células que constituem o parênquima hepático. Inicialmente, a proteína HbeAg do vírus interage com os proteoglicanos de sulfato heparano, presentes no espaço de Disse. Em seguida, os vírus se ligam através da porção N-terminal do domínio pré-S1 da forma larga da proteína HbsAg ao receptor-alvo chamado polipeptídeo co-transportador sódio taurocolato (NTCP), o qual é expresso na superfície dos hepatócitos (Ioannou, 2007). NTCP é um transportador específico dos hepatócitos de ácidos biliares. Este receptor encontra-se na membrana basolateral da célula, a qual é voltado para o lúmen do sinusóide hepático. Após o processo de fusão da membrana do vírus à membrana da célula hospedeira, ocorre o desnudamento da partícula viral com a liberação do DNA viral circular relaxado (rcDNA) dentro do citoplasma, o qual é transportado ao núcleo da célula que contém as enzimas necessárias para o processo de transcrição. No núcleo, a molécula de rcDNA do vírus é convertida na forma circular covalentemente fechada do DNA (cccDNA), que é a forma estável para o processo de transcrição celular (Trépo, C.; Chan, H. L. Y.; Lok, A., 2014).

O espectro de manifestação clínica da doença varia desde casos assintomáticos até hepatite fulminante. A ocorrência dos sintomas da fase aguda está envolvida com a idade do paciente, sendo que as crianças são geralmente assintomáticas, enquanto 70% dos adultos têm infecção subclínica ou clínica anictérica (Liaw, Y.-F.; CHU, C.-M.; 2009). O período de incubação dura de 45 a 180 dias, sendo os sintomas da infecção aguda mais comuns a fadiga, dor no quadrante superior do abdome, anorexia, náuseas e icterícia, levando cerca de três semanas para resolução do quadro. Nessa fase, observa-se aumento dos níveis séricos das enzimas hepáticas AST e ALT, com essas alcançando níveis de 1.000 a 2.000 UI/L, com predominância da ALT sobre a AST. A infecção pelo vírus da hepatite B pode também cursar com manifestações extra-hepáticas, como glomerulonefrite e vasculite, como resultado de disfunção da resposta imune humoral com a geração e deposição de complexos imunes (Cacoub, P.; Asselah, T., 2021).

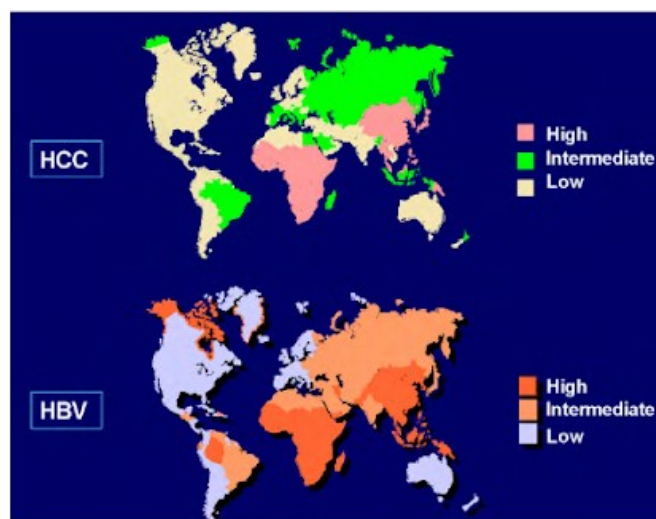
O curso clínico da doença varia de indivíduo para indivíduo e é determinado pela relação da infecção viral com a resposta imune do hospedeiro. Outros fatores incluindo idade, consumo de álcool e coinfeção por outros vírus têm papel no curso da doença. Com o aumento da incidência da obesidade no mundo e com o maior número de casos detectados da

DHGNA, muitos estudos apontam que essas condições podem interferir na progressão da doença, com maior risco de pior prognóstico (Chen, C.L. et al., 2008; Cholankeril, G. et al., 2017).

Após a fase aguda da infecção viral, a persistência da infecção pelo VHB é observada através da detecção do DNA viral nos hepatócitos e pela persistência de células T específicas contra o vírus, décadas após a resolução da doença. A erradicação total do vírus é difícil de conseguir devido a peculiaridades da replicação do VHB, como a formação de cccDNA do vírus que se integram ao genoma da célula hospedeira. A alta estabilidade do cccDNA é responsável pela persistência a longo prazo do vírus no organismo (Zoulim, F.; Testoni, B., 2023).

A progressão da infecção aguda da hepatite B para hepatite crônica depende de diversos fatores, como doença hepática prévia e idade. Observa-se que o risco de progressão para hepatite crônica é cerca de 90% em neonatos, com redução dessa taxa com a idade, sendo menor de 5% em adultos. Vários são os fatores do hospedeiro que influenciam a transformação maligna do tumor em indivíduos cronicamente infectados pelo vírus, incluindo idade, sexo masculino e presença de cirrose. A relação entre a infecção crônica pelo vírus VHB e o CHC foi primeiro descrito em 1975 (Blumberg, B.S., 1975). Em regiões onde o vírus é endêmico ou hiperendêmico, a taxa de incidência do tumor é elevada. A Figura 5 mostra a distribuição geográfica do CHC pelo mundo e sua relação com regiões com altas taxas de infecção pelo vírus VHB (Nguyen, V.T.T., Law, M.G.; Dore, G.J., 2009). Existe um sinergismo entre infecção crônica pelo vírus VHB e fatores metabólicos, como síndrome metabólica e hipertensão crônica, com aumento do risco de evolução para CHC em indivíduos cronicamente infectados pelo vírus sendo portadores de DM e/ou de síndrome metabólica, como visto em um estudo taiwanês (Chen, C.L. et al., 2008).

Figura 5 - Distribuição geográfica paralela entre a incidência da infecção crônica pelo VHB e a do CHC



Fonte: Nguyen, V.T.T.; Law, M.G.; Dore, G., 2009.

3.2.2 HEPATITE C

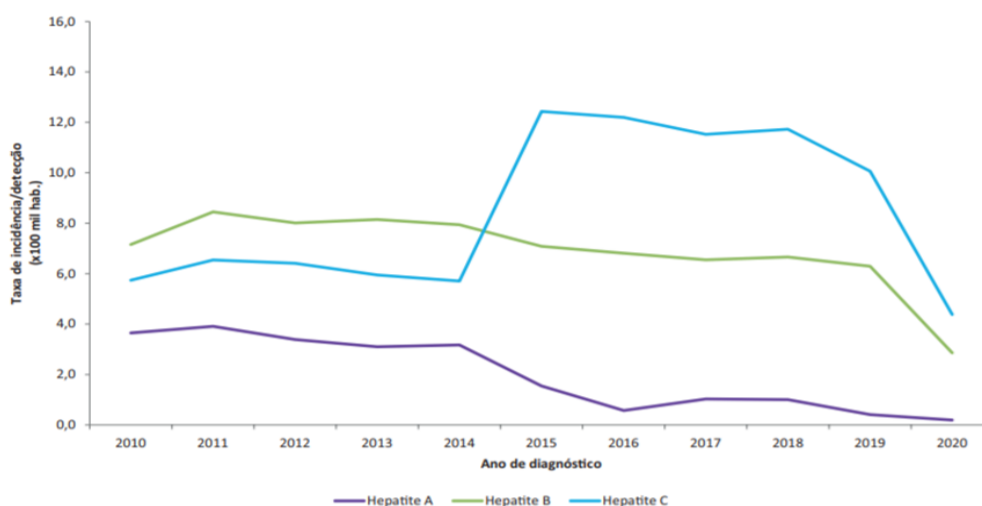
O vírus da hepatite C (VHC) é um vírus de RNA, da família Flaviviridae, que faz parte do grupo dos vírus das hepatites. A infecção pelo vírus da hepatite C é atualmente a principal responsável pelo desenvolvimento de doença hepática crônica em todo o mundo. Estima-se que a prevalência global seja em torno de 2% a 3%, em torno de 170 milhões de pessoas infectadas pelo HCV em todo o mundo. Este elevado grau de distribuição geográfica, permite que a patologia seja considerada endemia mundial (Martins, 2011).

No período de 1999 a 2020, a quantidade de casos de hepatite C notificados, no Brasil, atingiu 262.815 casos, cerca de 38,1% de todas as hepatites virais e a região norte apresentou 3,5% dos casos notificados. Já no período de 2010 a 2020, a taxa de incidência de hepatite C no Brasil sofreu muitas alterações, em um primeiro momento, de 2010 a 2014, a taxa se manteve constante e menor que a taxa de hepatite B, em um segundo momento, entre 2014 e 2015, houve um crescimento rápido, ultrapassando a taxa de incidência de hepatite B, se mantendo constante até 2020, quando começa um decréscimo mais acentuado (Brasil, 2021).

O VHC foi identificado pela primeira vez em 1975 quando Feinstone et al. estavam investigando a coinfeção pelos vírus da hepatite A (VHA) e B (VHB), porém em muitos dos casos analisados havia uma infecção existente, relacionadas à transfusão sanguínea, mas não relacionada a nenhum dos vírus já conhecidos, por isso, foi, inicialmente, chamado de vírus da hepatite “não-A, não-B” (NANBH). Em 1989, Choo et al. caracterizou a sequência do genoma viral, nomeando-o de HCV (Lopes, 2015).

O VHC possui mecanismos de escape do sistema imunológico do hospedeiro, favorecendo a infecção crônica na maioria dos pacientes, devido a uma atenuação e evasão dos mecanismos de resposta ao vírus. Dessa forma, cerca de 75 a 85% dos infectados pelo vírus irão desenvolver hepatite C crônica, cerca de 60 – 70% irão desenvolver esteatose ou fibrose hepática e cerca de 5 – 20% irão desenvolver o quadro de cirrose (Garcia, 2016).

Figura 6 – Taxa de incidência de hepatite A e taxa de detecção de hepatite B e C por ano de diagnóstico. Brasil, 2010 a 2020



Fonte: Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) /Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS)/Ministério da Saúde (MS).

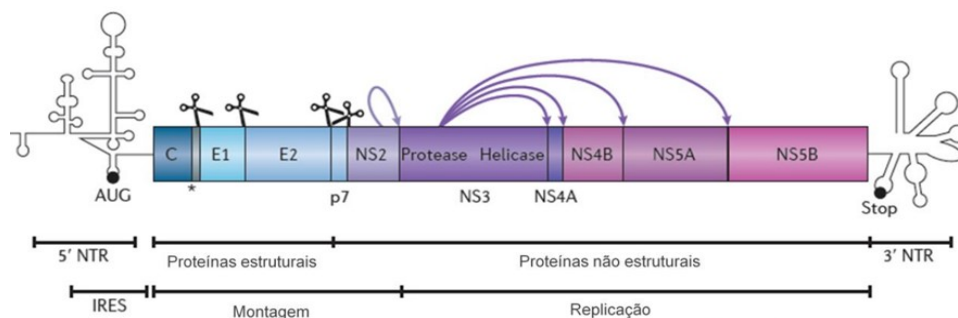
O causador da hepatite C é um vírus de RNA positivo de cadeia simples, envelopado, que pertence ao gênero Hepacivirus e à família Flaviviridae, cuja entrada viral na célula ocorre por meio das glicoproteínas estruturais de envelope E1 e E2. As partículas envelopadas do HCV possuem diâmetro icosaédrico de aproximadamente 56-65 nm e o núcleo menor com cerca de 45 nm (Preciado, 2014).

O genoma viral contém 9.400 nucleotídeos e pode ser dividido em uma região de uma única fase de leitura aberta (ORF), cercado por duas regiões não-codificantes (NTR) nas extremidades 5' e 3'. O 5'-UTR contém um local interno de entrada ribossômica (IRES) que é

essencial para a replicação viral. A poliproteína é processada em 3 proteínas estruturais (C, E1, E2) e 7 proteínas não estruturais (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B) (Preciado, 2014). As proteínas estruturais estão localizadas na porção aminoterminal, compõem o nucleocapsídeo (proteína Core) e o envelope viral (E1 e E2). As proteínas não-estruturais estão localizadas na porção carboxiterminal e não são expressas nas células infectadas e não são incorporadas na partícula viral, atuando apenas na coordenação da replicação viral, a exemplo da síntese de RNA, modulação dos mecanismos de defesa do sistema imune do hospedeiro e montagem viral, estabelecendo uma infecção crônica e, conseqüentemente, o possível aparecimento de complicações, como fibrose, cirrose, além de CHC (Araújo, 2018).

A tradução da região ORF do vírus é mediada pela região 5' NC NTR, visto que essa região carrega o sítio de entrada para o ribossomo IRES (Internal ribosomal entry site), formada por 4 domínios, porém apenas os domínios II, III e IV utilizado para a atividade da IRES. O domínio I é fundamental para a replicação do RNA do HCV (FREITAS, 2014). A região 3' NC é composta de algumas regiões, dentre elas, a cauda X, composta por 98 nucleotídeos, que inclui uma pequena porção de 25 bases da cauda poli-U, e é essencial para a replicação do HCV em cultura de células e in vivo (Silva, 2014).

Figura 7 – Organização genômica e proteica do HCV



Fonte: Freitas, 2014.

A poliproteína viral possui 3000 aminoácidos e sofre clivagem por proteases virais e celulares, dando origem às proteínas estruturais (C, E1, E2 e p7) e não-estruturais do vírus (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B). As proteínas C, E1, E2, p7 e NS2 compõem o processo de montagem da partícula viral, já as proteínas NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B compõem o processo de replicação viral (Silva, 2014).

O vírus da hepatite C possui transmissão parenteral, pela transfusão de sangue e de hemoderivados, pelo transplante de órgãos de doadores infectados e por contato sanguíneo, o que envolve como fatores de risco, principalmente o transplante de órgãos de doadores

infectados e o uso de drogas injetáveis com materiais contaminados. Além disso, as transmissões iatrogênica, nosocomial, sexual e vertical podem ocorrer (Brasil, 2018).

O período de incubação do VHC ocorre entre 4 e 24 semanas, porém o tempo médio é entre 7 e 8 semanas e a primeira fase, aguda, manifesta-se como assintomática ou oligossintomática inespecífica, dificultando o diagnóstico nesta fase. Quando o quadro é crônico, cujo tempo de duração da doença se estende por tempo ≥ 6 meses, pode iniciar com manifestação leve e ao evoluir para a cronicidade, após algumas décadas, há alterações histológicas com risco de desenvolvimento de cirrose e insuficiência hepática (Silva, 2012). A hepatite C evolui para sua forma crônica em cerca de 50% a 85% dos infectados, visto que o vírus possui mecanismos celulares que favorecem sua entrada na célula, replicação e infecção, de maneira majoritariamente assintomática. A agressão contínua aos hepatócitos ao longo de décadas favorece a transformação dos hepatócitos saudáveis em tecido fibroso, favorecendo o aparecimento de cirrose e o carcinoma hepatocelular com diminuição da função hepática por perda celular (Alves, 2013).

3.2.3 DOENÇA HEPÁTICA ALCOÓLICA (DHA)

O álcool é uma molécula pequena, altamente solúvel e de absorção rápida pela mucosa do trato gastrointestinal, por estes motivos, é uma droga depressora do Sistema Nervoso Central (SNC), podendo causar intoxicação e dependência (Santos, 2016). No ano de 2012 ocorreram cerca de 3,3 milhões de mortes no mundo em decorrência do consumo abusivo de álcool. Os números representam 5,9% de todas as causas de mortes, sendo maiores que à mortalidade ligada ao HIV (2,8%), à tuberculose (1,7%) e à violência (0,99%) (Oms, 2014).

O álcool constitui um dos fatores de risco mais conhecidos para a cirrose hepática e pode ser considerado como um agente direto ou indireto de CHC tendo em vista em seu efeito citotóxico aos hepatócitos. Ademais, o álcool potencializa o risco de desenvolvimento de CHC associado a outros fatores de risco, como infecção pelo HBV e diabetes. Uma metanálise de 16 estudos com 13.706 pacientes com infecção crônica pelo HCV mostrou risco aumentado para CHC em indivíduos alcoólatras (Turati, 2014).

A hepatopatia alcoólica é provocada pelo uso abusivo e prolongado de etanol e relacionada a outros fatores predisponentes, como a influência genética e ambiental, esta última inclui infecções virais pelos vírus das hepatites B e C (Sbh, 2019). O álcool é totalmente absorvido no tubo digestivo, 65% no duodeno, 30% no estômago e 5% no cólon e após a absorção, ocorre a metabolização hepática. Os hepatócitos apresentam a enzima álcool

desidrogenase (ADH), responsável pela via oxidativa de metabolização do etanol. A ADH está localizada no citosol, é o principal sistema responsável pelo metabolismo do álcool em baixas concentrações e inicia a metabolização oxidando o álcool em acetaldeído, que é convertido em acetil-CoA pela acetaldeído-desidrogenase. O estresse oxidativo corresponde ao desequilíbrio entre a quantidade de pró-oxidantes ou geradores de radicais livres e antioxidantes ou removedores de radicais livres e os mecanismos de agressão hepática são induzidos diretamente por este estresse.

Nesse sentido, a DHA surge como um espectro de distúrbios e alterações histopatológicas em indivíduos com consumo agudo e crônico de álcool, que varia de esteatose hepática, esteatose hepatite alcoólica (EHA), cirrose e carcinoma hepatocelular (CHC) (Werner, 2020). A EHA é o primeiro estágio da doença hepática alcoólica, caracterizada pelo acúmulo de triglicerídeos nos hepatócitos e pode levar ao desenvolvimento de lesões mais graves como esteato-hepatite alcoólica, caracteriza por hepatócitos lesionados devido à degeneração em balão, necrose irregular e infiltrado de polimorfonucleares, resultando na formação de nódulos de regeneração e no desenvolvimento de fibrose (Rocha, 2018). O diagnóstico da DHA pode ser estabelecido pelo questionário CAGE, que corresponde a quatro perguntas *Cut down, Annoyed by criticism, Guilty e Eye-opener* cujas respostas são sim – marcando 1 ponto – e não – marcando 0 pontos –. Duas respostas afirmativas no questionário CAGE significam uma forte probabilidade de abuso de álcool com 93% de sensibilidade e 76% de especificidade (Jesus, 2022).

Tabela 1 – Questionário CAGE

| Questionário CAGE para pesquisa de dependência alcoólica |
|--|
| 1. Você já pensou em largar a bebida (<i>Cut-down</i>)? |
| 2. Ficou aborrecido (<i>annoyed</i>) quando outras pessoas criticam o seu hábito de beber? |
| 3. Se sentiu mal ou culpado (<i>guilty</i>) pelo fato de beber? |
| 4. Bebeu pela manhã para ficar mais calmo, acordar (<i>eye-opener</i>) ou para melhorar a ressaca? |

FONTE: REIS, 2016.

3.2.4 DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO ALCOÓLICA (DHGNA)

A doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) corresponde a uma alteração patológica na qual ocorre excessivo acúmulo de triglicerídeos no fígado, podendo evoluir para outro quadro, a esteato-hepatite não alcoólica (EHNA), ou seja, representa a forma

inflamatória que pode levar à fibrose avançada, cirrose e CHC. A DHGNA é um problema de saúde pública, acometendo 20-40% dos indivíduos ocidentais e 5-18% dos indivíduos asiáticos. Em decorrência desse percentual, corresponde a segunda causa mais frequente de necessidade de transplante hepático (Silva, 2022).

A DHGNA é uma doença poligênica e multifatorial complexa que envolve uma série de fatores genéticos, metabólicos e ambientais, porém é considerada uma manifestação da doença metabólica e sua prevalência eleva-se juntamente com o aumento do índice de massa corporal (IMC) e com a presença de Diabetes Mellitus (DM). Assim, $IMC > 35 \text{ kg/m}^2$ e DM são considerados fatores de risco da evolução de esteato-hepatite para a cirrose. Nos quadros clínicos de obesidade, Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) e DHGNA ocorre disfunção do tecido adiposo, resultando em um prejuízo no metabolismo da glicose e dos lipídios. Na obesidade há acúmulo de triglicerídeos no tecido adiposo e quando este atinge o seu limite de expansão começa a ocorrer acúmulo ectópico de gorduras, o que inclui o fígado, resultando em obesidade visceral. Na DM2, ocorre aumento da resistência à insulina, de citocinas circulantes e do estresse oxidativo, alterando os mecanismos hepáticos de produção e armazenamento de glicogênio, da gliconeogênese e da degradação de insulina (Sbh, 2019).

O diabetes mellitus do tipo 2 (DM2) configura atualmente um fator de risco independente para o CHC e para DHGNA, sendo que risco de CHC é de 2,5 a 4 vezes maior em diabéticos do que em não diabéticos, segundo alguns estudos (Davila, 2005; El-Serag, 2006). Esse achado é reforçado por estudos de base populacional que revelam que a incidência de CHC é maior em pacientes com diabetes do que sem a doença (Davila, 2005). Ademais, a RI leva a ativação no organismo de cascatas celulares de inflamação, com consequente liberação de TNF-alfa e IL-6, os quais causam inflamação e fibrose hepática e de estresse oxidativo, além de estimular vias celulares que regulam o crescimento celular e inibem a apoptose (Jaffe, 2021). Por último, a RI direciona o excesso de glicose para as células tumorais hepáticas, tornando-se substrato para o crescimento e desenvolvimento dessas células, uma vez que elas não desenvolvem resistência à ação da insulina (Wang, 2012).

A DHGNA pode ser dividida em simples esteatose hepática sem o componente inflamatório e EHNA onde exista a associação da esteatose com inflamação hepática sendo indistinguível de esteatohepatite alcoólica. Porém, na prática clínica, o diagnóstico inicial de

DHGNA é estabelecido com exames de imagem radiológicos, na ausência de outra causa reconhecida de como álcool, infecções virais, drogas e autoimunidade (Souto, 2017).

A deposição de lipídios na DHGNA ocorre em pequenos ou grandes vacúolos nos hepatócitos, prejudicando a composição celular e a remoção dos lipídios metabolizados nesta célula. Após a deposição de lipídios nos hepatócitos ocorre um aumento da liberação das lipoproteínas VLDL, que serão acumuladas no interior dos hepatócitos e ocorrerá ativação de mecanismos de recrutamento de citocinas pró-inflamatórias e de células de defesa, gerando um processo inflamatório que pode evoluir para a fibrose, cirrose, câncer ou a morte celular (Barbosa, 2019).

Na DHGNA, a função mitocondrial está diminuída, devido a alterações ultraestruturais, que resultam em uma oxidação-fosforilação defeituosa e uma disfunção na cadeia respiratória mitocondrial, gerando um excesso de espécies reativas de oxigênio (EROS). O acúmulo e a produção excessiva de EROS podem ocasionar peroxidação lipídica, cujos produtos intermediários são agentes pró-inflamatórios e parecem ativar fibroblastos, favorecendo a fibrogênese. Além disso, fatores genéticos como a presença de alguns polimorfismos em genes que codificam enzimas antioxidantes podem predispor o indivíduo a ter uma reduzida capacidade antioxidante e com isso desenvolver formas mais graves. Nesse sentido, o estresse oxidativo induz necroinflamação e fibrose no fígado gorduroso (Henriques, 2016).

O fígado, o músculo esquelético e o tecido adiposo exibem sensibilidade à insulina, através de receptores da superfície das células e outras vias de sinalização de pós-receptor, regulando o fluxo de glicose, o metabolismo e a glicemia. Logo, a resistência hepática à insulina irá resultar em hiperinsulinemia compensatória e, conseqüentemente, em disfunção da célula β e desenvolvimento de DM2. Quando DHGNA, obesidade e resistência à insulina ocorrem juntos no mesmo paciente, há aumento significativo do risco de desenvolver DM2 (Souto, 2017).

3.2.6 CIRROSE HEPÁTICA (CH)

A cirrose hepática é uma condição médica crônica caracterizada pela substituição do parênquima hepático normal por fibrose cicatricial e nódulos de regeneração após processos contínuos e a longo prazo de inflamação do tecido hepático. Nos Estados Unidos, a doença é

tida como a 12^a causa de morte no país, além de ser reconhecida como um fator de risco para o CHC (Ganne-Carrié, 2019). No mundo, a doença tem como principais etiologias as infecções crônicas pelos vírus da hepatite B e C, a doença hepática alcoólica e a doença hepática gordurosa não alcoólica. Os principais fatores de risco para a progressão da doença hepática para cirrose são sexo masculino, idade avançada e comorbidades médicas (Smith, 2019). Especula-se que a agressão de diversos agentes, incluindo vírus e medicações hepatóxicas, leva a inflamação do parênquima, com ativação das células inflamatórias locais, como as células de Ito e de Kupffer, com liberação de citocinas pró-inflamatórias, resultando na fibrose regenerativa. A formação dessas traves fibróticas e nódulos de regeneração distorce a microarquitetura hepática, com alteração dos elementos da tríade portal e da vasculatura do fígado.

A fibrose hepática ainda leva a alteração da fisiologia hepática, comprometendo as funções desse órgão, incluindo diminuição na produção de fatores de coagulação, metabolização de fármacos, toxinas e substâncias, além de causar aumento nos níveis circulantes de bilirrubina. Uma vez que a doença está estabelecida, o paciente pode se encontrar em um estado compensado ou descompensado, a depender da presença de manifestações de disfunção hepática, incluindo ascite, encefalopatia hepática, hemorragias e icterícia. A evolução do estado de cirrose compensada a descompensada depende de diversos fatores, incluindo idade, existência de outras doenças, tratamento para a doença subjacente. Em média, os pacientes com cirrose compensada são assintomáticos ou oligossintomáticos. Dentre os sintomas principais estão fraqueza, perda de apetite, perda de peso, ginecomastia, eritema palmar, unhas de Terry, telangiectasias pelo corpo, dentre outros sintomas inespecíficos (WANG, 2012). Em geral, os pacientes compensados têm uma sobrevida melhor, em torno de 12 anos, em relação aos pacientes com descompensação hepática (Smith, 2019).

Laboratorialmente, a doença é marcada por alterações incluindo aumento dos níveis de bilirrubina, aumento da relação do tempo de protrombina (PT) e o valor internacional normatizado (INR), aumento dos níveis de alanina-glutamil transferase (ALT) e aspartato-glutamil transferase (AST) e plaquetopenia. Outros achados podem ser encontrados, a depender da causa subjacente da cirrose e da presença de outras comorbidades concomitantes, como anemia, marcadores sorológicos de hepatites virais, marcadores reumatológicos, como o fator antinuclear (FAN) e fator anti-músculo liso, dentre outros. A biópsia hepática permanece sendo o método padrão-ouro para o diagnóstico de fibrose hepática, contudo existem hoje outros métodos não invasivos de diagnóstico. Dos principais métodos não invasivos a

ultrassonografia abdominal é a mais largamente utilizada, devido a sua acessibilidade e baixo custo, permitindo diagnosticar cirrose e avaliar suas complicações, como esplenomegalia e ascite, porém carecendo de especialidade e sensibilidade para avaliar nódulos hepáticos (Bonekamp, 2009). O outro método consiste na elastografia, mais conhecido como Fibroscan, o qual apresenta sensibilidade e especificidade superior ao ultrassom. O grau de fibrose hepática é medido pela elastografia com base em escore conhecido como Metavir (Tabela 1), o qual varia de F0 (sem fibrose) a F4 (cirrose). Em geral, os métodos não invasivos são mais úteis nos estágios mais precoces e nos mais avançados de fibrose, gerando resultados inconclusivos em estágios intermediários de fibrose (Lurie, 2015). Após o diagnóstico, todo paciente deve ser estratificado de acordo com o grau da doença por meio de escores, sendo os dois mais utilizados o Child-Pugh (Tabela 2) e Model for End-Stage Liver Disease (MELD), sendo que a partir do estágio B de Child-Pugh configura estágio avançado da doença, enquanto que no MELD, uma pontuação maior ou igual a 12 equivale a risco aumentado de complicações da cirrose.

Tabela 2 - Critérios morfológicos para o estadiamento da fibrose pela classificação METAVIR

| Alteração histopatológica | Escore |
|--|--------|
| Ausência de fibrose | F0 |
| Expansão fibrosa portal sem septos | F1 |
| Expansão fibrosa com raros septos | F2 |
| Expansão fibrosa com numerosos septos, sem cirrose | F3 |
| Cirrose | F4 |

Fonte: SILVA, 2020

Tabela 3 - Classificação de Child-Pugh

| Parâmetro | pontuação numérica | | |
|---|--------------------|-----------------|------------------|
| | 1 | 2 | 3 |
| Ascite | Nenhum | Pouco | Moderado a grave |
| Encefalopatia | Nenhum | Leve a moderado | Moderado a grave |
| Bilirrubina (mg/dL) | < 2,0 | 2-3 | > 3,0 |
| Albumina (g/dL) | > 3,5 | 2,8-3,5 | < 2,8 |
| Tempo de protrombina (prolongado em segundos) | 1-3 segundos | 4-6 segundos | > 6,0 |

Child's Pugh Classe A = 5-6 pontos; Child's Pugh Classe B = 7-9 pontos; Child's Pugh Classe C = 10-15 pontos.

Fonte: Adaptado de Zuberi, 2009.

3.3 DIAGNÓSTICO

O espectro clínico do CHC varia de casos assintomáticos até de insuficiência hepática, o qual cursa com sintomas de icterícia, perda ponderal, astenia, *flapping*, asterix, rebaixamento do nível de consciência e até coma, sendo que a maior parte dos pacientes diagnosticados se encontram nessa fase avançada da doença (El-serag, 2008). Infelizmente a maioria dos pacientes com esse tipo de câncer é assintomático, o que torna difícil o diagnóstico de CHC nesse grupo de indivíduos. Em razão disso, nos últimos anos vem ocorrendo um aumento da detecção de indivíduos assintomáticos com o tumor graças a instituição do rastreamento nos atendimentos a grupos de risco, o qual consiste no conjunto de métodos sensíveis e específicos que tem como objetivo a detecção de lesões suspeitas de câncer em populações de risco para o desenvolvimento de tumores que não manifestam sinais e sintomas da doença. A Associação Americana de Estudo de Doenças Hepáticas (AASLD) recomenda que todo indivíduo cirrótico realize a cada 6 meses rastreamento com US abdominal sem contraste. No que se refere ao CHC, as principais ferramentas de rastreamento mais utilizadas consistem na dosagem de alfa-fetoproteína (AFP) e na ultrassonografia de abdome sem contraste, os quais devem ser preferencialmente solicitados a cada 6 meses em pacientes cirróticos com lesões hepáticas suspeitas, como os nódulos hepáticos, sendo essa uma recomendação dos guidelines da AASLD (Somi, 2005).

3.3.1 ALFAFETOPROTEÍNA

A AFP constitui-se em um marcador sérico mais largamente utilizado para o CHC. A AFP consiste em uma glicoproteína produzida em grandes concentrações pelo fígado fetal e

possui três variantes diferentes conhecidas como AFP-L1, AFP-L2 e AFP-L3, sendo que AFP-L3 demonstra ser mais específica para CHC que as outras variantes (Force, 2022). O valor de corte mais utilizado desse biomarcador é 20 ng/ml (Kanwal, 2019), sendo que esse valor apresenta uma sensibilidade de 60% e uma especificidade de 80% para o diagnóstico de CHC (Marrero, 2009). Entretanto, os níveis de AFP podem se elevar em outras condições além do CHC, como em outras hepatopatias crônicas, gestação e outros cânceres, mas pode estar normal em uma variante do CHC conhecida como carcinoma fibrolamelar (Collier, 1998; Sterling, 2012). Logo, por ser um marcador não específico e de baixa sensibilidade para CHC, a AFP não é recomendada isoladamente para rastreamento e/ou diagnóstico do CHC celular, embora ela possa ser utilizada junto com outras ferramentas, como os exames de imagem, para guiar o manejo diagnóstico de pacientes com suspeita clínica de CHC (Collier, 1998).

3.3.2 EXAMES DE IMAGEM

Os exames de imagem constituem ferramentas que auxiliam no diagnóstico de CHC em pacientes de alto risco para CHC, como pacientes cirróticos e aqueles com infecção crônica por HBV ou HCV. As principais modalidades de exames de imagem disponíveis são a tomografia computadorizada com contraste (TC), a ressonância nuclear magnética (RNM) e a ultrassonografia (USG) abdominal com e sem contraste. A USG abdominal geralmente é o primeiro exame de imagem utilizado em rastreamento de CHC e de outros nódulos hepáticos em pacientes de alto risco, sendo realizado a cada 6 meses durante 1 a 2 anos (Marrero, 2018), possuindo uma sensibilidade e especificidade de 60-80% e 90%, respectivamente (Singal, 2009).

Os outros exames são realizados como complemento durante a investigação a fim de descartar outros possíveis diagnósticos, como hemangioma, bem como para o estadiamento do tumor. As principais características da lesão a serem avaliadas incluem o tamanho da lesão e o padrão de realce pelo contraste. Uma lesão com diâmetro maior do que 1 cm e que demonstra realce na fase arterial do contraste é tida como suspeita para CHC, podendo necessitar ou não de estudo com outros exames, a depender de outras informações clínicas (Van der pol, 2022). Além disso, um aumento superior ou igual a 50% no tamanho da lesão em 6 meses ou menos durante o seguimento observacional do paciente aponta para forte suspeita de CHC. Além do USG convencional sem contraste, há ainda a USG abdominal com

contraste (CEUS), um método de imagem não invasivo que utiliza em geral o hexafluoreto de enxofre como contraste e tem sensibilidade de 78% e especificidade de 94% para detecção de lesão de qualquer tamanho previamente suspeitada por outros métodos, segundo alguns estudos (Fraquelli, 2022). Tal método deve ser usado apenas para lesões que são visualizadas com o USG sem contraste.. Quanto aos outros exames, alguns estudos sugerem que a RNM apresenta uma acurácia superior no diagnóstico de CHC em relação a TC com contraste (Wang, 2019). Contudo, a RNM é um exame pouco disponível na maioria dos serviços, além de fazer uso de contraste com gadolínio, o qual exige cautela em seu uso em pacientes com taxa de filtração glomerular $< 30 \text{ ml/min/1,73m}^2$.

Com o objetivo de padronizar os laudos entre os radiologistas de nódulos hepáticos, o Colégio Americano de Radiologistas (ACR) criou em 2008 um sistema de laudos conhecido como Liver Imaging Reporting and Data System (LI-RADS) com o objetivo de facilitar a comunicação entre os profissionais (Acr, 2017). Esse sistema estima a probabilidade de CHC de acordo com o estágio da lesão e orienta o manejo do paciente de acordo com seu estágio baseado em uma revisão sistemática de 14 estudos envolvendo 2.708 pacientes através de TC com contraste ou RNM (Lee, 2020). Contudo, esse sistema deve ser utilizado exclusivamente em pacientes de alto risco para CHC. O LI-RADS não deve ser aplicado em pacientes menores de 18 anos, cirrose secundária a desordens vasculares e sem fator de risco para CHC. Por fim, todos os dados de imagem devem ser correlacionados com outras informações clínicas do paciente para o manejo ótimo do paciente.

3.3.3 BIÓPSIA E DIAGNÓSTICO HISTOPATOLÓGICO

A biópsia percutânea consiste em um método invasivo de diagnóstico, o qual consiste em coleta por meio de uma agulha guiada por ultrassonografia de amostras de lesões hepáticas suspeitas, como os nódulos. As amostras são encaminhadas a avaliação histopatológica, onde são avaliadas certas características, como citoarquitetura, atipia celular, mitose, diferenciação celular e invasão vascular, por exemplo. Por ser um método invasivo, a biópsia deve ser evitada a todo custo devido ao risco de disseminação tumoral no trajeto percutâneo da agulha, além do risco de hemoperitônio. No entanto, esse exame é importante para elucidação em casos suspeitos de nódulos hepáticos em indivíduos não cirróticos (Tommaso, 2017; Blechacz, 2015). Contudo, em muitas situações, quando o achado radiológico for muito sugestivo, a biópsia hepática torna-se desnecessária para o diagnóstico.

A sensibilidade da biópsia hepática varia de 70% a 90%, dependendo do tamanho da lesão, da localização e da experiência do patologista (Blechacz, 2015). Ademais, a sensibilidade da biópsia hepática é menor, em torno de 60%, para lesões menores que 2 cm. A avaliação da biópsia sozinha pode não ser suficiente para diferenciar lesões displásicas de alto grau de lesões tumorais do CHC. Assim, nesse contexto, a imunohistoquímica pode auxiliar na distinção dessas lesões, especialmente para elucidar na distinção entre nódulos displásicos e lesões de CHC moderada a bem diferenciada. Os principais marcadores imunohistoquímicos avaliados são o glicopan 3, glutamina sintetase, HSP-70, CD34, ceratina 19 e clatrina (Tommaso, 2017).

A análise histopatológica é uma ferramenta crucial para o diagnóstico definitivo do CHC, além de ajudar a determinar o prognóstico da doença. Quando uma amostra do tumor é obtida por meio da biópsia, as principais características avaliadas são a morfologia da lesão, características citológicas das células tumorais, grau de diferenciação do tumor e existência de invasão vascular. Quanto às características citológicas, procura-se avaliar a presença de atipia celular, atipia nuclear, atividade mitótica, presença de células de Kupffer, presença de bile no interior dos hepatócitos, inclusões citoplasmáticas de corpos hialinos (i.e., corpúsculos de Mallory), presença do padrão acinar, perda da rede de reticulina e invasão vascular, que sinaliza doença mais avançada e, portanto, de pior prognóstico. No entanto, é digno ressaltar que as características histomorfológicas do CHC podem variar de paciente para paciente e até mesmo em um mesmo indivíduo (Kojiro, 1998).

No que se refere aos padrões histológicos, os mais comuns são o padrão trabecular, pseudoglandular, sólido e indiferenciado. A maioria dos tumores hepáticos apresenta mistura de mais de um padrão, sendo o padrão trabecular o mais presente em mais da metade dos casos. Existem cerca de 8 tipos de variantes histológicas de CHC, sendo que elas variam em termos morfológicos e de imunohistoquímica. As principais variantes histológicas do tumor incluem o CHC fibrolamelar, sarcomatoso, de células-clara, esteatótico e cirrótico. Com exceção do subtipo fibrolamelar, o qual é mais descrito em fígados não cirróticos, todas as outras são descritas em fígados cirróticos e não cirróticos. É digno de nota que o subtipo fibrolamelar, embora seja o mais raro de todos os subtipos, apresenta melhor prognóstico em relação ao CHC clássico (Rastogi, 2021; Torbenson, 2017).

Existem 3 sistemas de graduação do CHC, a saber: classificação de Edmondson e Steiner, que é a mais utilizada internacionalmente, classificação de Nzelako *et al.* e União Internacional contra o Câncer (UICC). Pela classificação de Edmondson e Steiner, o grau I

consiste em células tumorais pequenas organizadas em trabéculas, com abundante citoplasma e com pouca irregularidade nuclear, o grau II consiste em células tumorais com nucléolo proeminente e irregularidade nuclear, o grau III se diferencia do grau anterior por ter mais nucléolo, enquanto o grau IV apresenta com frequência células gigantes anaplásicas.

A OMS classifica os tumores em um sistema de 3 estágios, sendo o estágio G1 como estágio bem diferenciado, G2 como moderadamente diferenciado e G3 pobremente diferenciado. Em alguns casos pode haver a sobreposição desses graus, predominando o grau mais avançado para o diagnóstico final. Além disso, CHC avançado pode ser classificado em 3 grupos macroscópicos, a saber: nodular, maciço e difuso. O tipo nodular pode consistir em um único nódulo e múltiplos nódulos. O tipo difuso é descrito como tendo múltiplos nódulos pequenos em um lobo hepático ou em todo órgão (Bosman, 2010).

3.4 POLIMORFISMO GENÉTICO

A sequência de DNA de uma determinada região do genoma é semelhante entre os cromossomos da maioria dos indivíduos em todo o mundo. Porém, em todas as populações humanas, têm sido identificados e catalogados milhões de diferenças de um único nucleotídeo e mais de um milhão de outras variantes mais complexas (Thompson, 2007). O polimorfismo genético corresponde a variações nas sequências de nucleotídeos de DNA, que podem gerar alterações na síntese de enzimas e de proteínas, como aquelas envolvidas no processamento de fármacos. Um tipo de polimorfismo conhecido é o polimorfismo de nucleotídeo único (SNP), que consiste na substituição de um nucleotídeo por outro. A maioria dos SNPs ocorrem em regiões não codificantes do material genético humano, o que não resulta em alteração das proteínas e, portanto, tem efeito neutro. Contudo, nas últimas décadas tem-se procurado conhecer mais os SNPs que ocorrem em regiões promotoras e codificantes do DNA humano, que podem gerar repercussões benignas ou negativas no organismo, incluindo o processamento de fármacos por indivíduos e a susceptibilidade a certos tipos de cânceres. Por este motivo, alguns casos o polimorfismo genético pode aumentar a suscetibilidade ao câncer. No genoma humano a ocorrência de polimorfismo genético é uma das alterações mais frequentes e corresponde a cerca de 90% das variações interindividuais (Lima, 2006; Shastri, B.S., 2007).

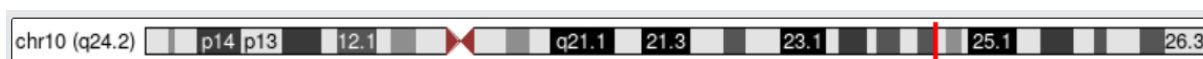
3.4.1 POLIMORFISMO DO GENE ABCC2

O gene ABCC2 faz parte da superfamília de genes dos transportadores ABC (ATP-binding cassette) presentes na membrana dos hepatócitos, o qual inclui 49 genes divididos em 7 subfamílias (ABCA, ABCB, ABCC, ABCD, ABCE, ABCF e ABCG), que codificam proteínas as quais obtêm energia da hidrólise do ATP e agem como bombas de transporte, transportando uma variedade de substâncias, incluindo íons, peptídeos, lipídios, pequenas proteínas e até mesmo drogas anticancerígenas, como os inibidores da tirosina quinase (ITKs), agentes importantes na farmacoterapia contra o CHC (Dean, M.; Hamon, Y.; Chimini, G., 2001; Martins, 2011). O gene compreende 32 éxons, está localizado cromossomo 10q24 e compreende cerca de 62 quilobase de pares de nucleotídeos, como visto na Figura 8 (Tsujii, H. et al., 1999). A proteína do ABCC2 é encontrado na superfície apical das membranas dos hepatócitos canaliculares, tendo um papel crucial na eliminação de substâncias conjugadas, como drogas, e compostos endógenos pelas vias biliares. No entanto, a proteína codificada pelo gene ABCC2 não está presente exclusivamente nas membranas celulares dos hepatócitos, sendo encontrada também nas membranas celulares das células com membrana polarizada, como as células epiteliais do túbulo proximal renal, nos enterócitos dos intestinos e no sinciciotrofoblasto da placenta (Toh et al. 1999;). A proteína do ABCC2 também é encontrada em células tumorais, como em alguns cânceres de ovário, de células renais claras, em certos tipos de câncer de pulmão e no CHC.

Certas mutações, como deleções, no gene ABCC2 têm sido observadas na síndrome genética hereditária recessiva descrita por Dubin e Johnson em 1954, devido a um prejuízo ao funcionamento dos canais da proteína desse gene, que ocasiona em um aumento dos níveis séricos de bilirrubina conjugada e cursa com uma síndrome icterica, como descrito pelos autores (Dubin, I.N.; Johnson, F.B., 1954). É digno de nota que a perda funcional desse gene é geralmente compensada pelo funcionamento e *up-regulation* de outros da mesma família, como o ABCC3 e o ABCC1. O gene ABCC2 provê instruções para a produção de uma proteína envolvida na resistência a várias drogas, chamada MRP2. É visto que no CHC ocorre uma *up-regulation* do gene ABCC2, o que está implicado com vias envolvidas na ativação e sobrevivência das células tumorais e, com isso, na resistência à quimioterapia. O sorafenib, um dos agentes de primeira linha utilizados no tratamento do CHC, causa uma regulação para baixo (*down-regulation*) dos genes ABCC1 e ABCC2 (Hoffmann, K. et al., 2010). Quanto aos polimorfismos do gene ABCC2, um dos mais estudados é a variante -24C>T da região

promotora do gene. É observado por pesquisadores que esta variante confere uma redução da função da região promotora do gene, o que resulta em aumento dos níveis séricos de algumas drogas que são substratos a proteína do ABCC2, como o metotrexato e o telmisartan (Miura et al, 2009; Rau et al., 2009).

Figura 8 - Localização do gene ABCC2 no braço curto do cromossomo 24



Fonte: OMIM, 2023.

3.4.2 POLIMORFISMO DO GENE GGH

O gene Gama-glutamil hidrolase (GGH) é uma glicoproteína lisossômica (Yao, 1996) amplamente distribuída na natureza e que faz parte dos tecidos de mamíferos, como soro, bile, suco pancreático e intestino (Chave, 2013). O gene possui 9 éxons, abrange 24 kb e está localizado no cromossomo 8q12.23-13.1. É controlado epigeneticamente e participa do metabolismo do ácido fólico e da farmacologia dos antifolatos (Yin, 1999; Yao, 1996). A enzima GGH é essencial para determinar a disponibilidade intracelular de folato para as vias do metabolismo de um carbono (OCM), removendo os grupos glutamil, permitindo que os metabólitos do folato saiam da célula (Oppeneer, 2011). Os folatos alimentares naturais são hidrolisados a membrana da borda em escova do jejuno antes que a absorção possa ocorrer e uma vez dentro das células intestinais, as coenzimas do folato sofrem vários estados de oxidação e precisa ser hidrolisados pela GGH antes que possam ser liberados na corrente sanguínea (Devos, 2008).

A GGH catalisa a degradação dos poliglutamatos ativos dos folatos naturais e do metotrexato antifolato (MTX), sendo uma enzima chave na manutenção das concentrações celulares de folilpoliglutamato (Shubbar, 2013), ou seja, atua como uma endo e/ou exopeptidase (Schneider, 2006). Os folatos intracelulares são essenciais para o funcionamento normal da proliferação, da replicação celular e como cofatores na síntese e no reparo do DNA. Os antifolatos funcionam como inibidores de enzimas dependentes de folato, sendo comumente usados no tratamento de diversos tipos de câncer, incluindo leucemia linfoblástica aguda, linfoma, câncer de mama e câncer de cabeça e pescoço (Shubbar, 2013). A poliglutamilação dos antifolatos, como o MTX, contribui à sua citotoxicidade e a eficácia dos antifolatos está relacionada à concentração e persistência celular do GGH. Dessa forma, o

aumento da atividade de GGH ou diminuição da atividade da enzima FPGS possui associação à resistência *in vitro* aos antifolatos, como o MTX (Chen et al., 2012).

As células tumorais que apresentam níveis elevados de GGH são resistentes aos antifolatos clássicos, além disso, uma resistência adicional pode ser adquirida por elevações no GGH após a exposição a esta classe de agentes antitumorais (Galiavn, 2000). Os níveis mais altos de mRNA da glutamil hidrolase em humanos são encontrados no fígado e nos rins (Galivan, 1999). Assim, quando painéis de tumores são comparados com tecidos normais, a expressão de GGH é elevada em tecidos cancerosos hepáticos e mamários (Galiavn, 2000).

No processo de poliglutamação, os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) no GGH houve a identificação de regiões promotoras que provavelmente aumentarão GGH expressão e afetam a poliglutamação do MTX. No polimorfismo GGH foi demonstrado que o polimorfismo 452C>T está associado à atividade diminuída, resultando no acúmulo de MTX-PG intracelular de cadeia longa e, conseqüentemente, diminuindo a taxa de liberação de glutamato de MTX (Van der Straaten et al., 2007).

Ainda em relação ao polimorfismo do gene GGH, o GGH-401 C>T SNP é um de seus polimorfismos mais comuns, que leva à superexpressão de GGH, além de ser um polimorfismo promotor que ocasiona a perda de um sítio de ligação do fator de transcrição inibitório. Devido à sua influência no metabolismo de um carbono e na sobrevivência celular, seu papel na carcinogênese cervical e na resposta ao tratamento é biologicamente plausível (Silva et al., 2013).

Figura 9 - Localização do gene GGH no braço curto do cromossomo 8



Fonte: OMIM, 2023.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 TIPO DE ESTUDO

Foi realizado um estudo transversal, observacional e descritivo.

4.2 POPULAÇÃO DE ESTUDO

A pesquisa foi realizada a partir de um banco de dados catalogado no sistema Research Electronic Data Capture (RedCap), cujos pacientes apresentavam hepatopatias crônicas: infecção por hepatite B, infecção por hepatite C, cirrose de diferentes etiologias, esteatohepatite e diagnóstico de carcinoma hepatocelular. Os dados foram obtidos por meio da coleta de dados em prontuários, no ano de 2015, a partir de pacientes regularmente

matriculados no Programa de Hepatopatias Crônicas da Fundação Santa Casa de Misericórdia do Pará (FSCMPA) e do Hospital Universitário João de Barros Barreto (HUJBB), assim como através da entrevista de pacientes por acadêmicos da área da saúde e por profissionais da área da saúde, nesses dois programas. Os dados estavam inicialmente organizados em um banco de dados na plataforma Access, depois migrando para o RedCap, no início de 2023. Os dados dos pacientes disponíveis no banco eram referentes a informações clínicas, epidemiológicas, de imagem, de anatomia patológica e do perfil genotípico de genes envolvidos com o processamento de fármacos e com inflamação.

Os dados epidemiológicos e clínicos foram reunidos no sistema RedCap, de acordo com cada gene estudado, em número absoluto e percentual. Os dados foram analisados e comparados de acordo com o perfil genotípico, a fim de estabelecer proporção entre as manifestações clínicas e o genótipo mais frequente de cada gene.

4.3 PERÍODO DA PESQUISA

Os dados foram transferidos para o sistema RedCap a partir do Access em janeiro de 2023 e analisados no período de junho a julho de 2023.

4.4 DEFINIÇÃO DE CASOS

Dentro dos parâmetros de apresentação clínica e de exames complementares, os pacientes foram definidos como:

Hepatite C Crônica: foram considerados pacientes com infecção crônica pelo HCV, aqueles que apresentaram anti-HCV reagente e HCV-RNA por PCR detectável por mais de seis meses desde a detecção da infecção, sintomático ou não, com ou sem diagnóstico histopatológico de hepatite crônica.

Hepatite B Crônica: foram considerados pacientes com infecção crônica pelo HBV, aqueles que apresentaram HBsAg reagente e HBV-DNA por PCR detectável por mais de seis meses desde a detecção da infecção. Sintomático ou não, com ou sem diagnóstico histopatológico de hepatite crônica.

Carcinoma Hepatocelular (CHC): pacientes que apresentaram sinais e sintomas sugestivos com diagnóstico por 2 exames de imagem (USG, TC ou RNM) ou 1 exame de imagem sugestivo de CHC e alfafetoproteína ≥ 400 ng/ml ou com elevações progressivas acima dos valores superiores da normalidade.

Cirrose hepática: pacientes com exames complementares (laboratoriais, endoscópicos e imagenológicos) sugestivos de cirrose, na presença ou não de sinais e sintomas de insuficiência hepática e/ou hipertensão portal, e/ou exame histopatológico comprobatório.

4.5 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E DE EXCLUSÃO

A amostra foi constituída por pacientes que preencheram os critérios de inclusão e exclusão.

Critérios de inclusão: pacientes de ambos os gêneros, idade superior a 18 anos, que atendam a definição de infecção crônica pelo HCV, pelo HBV e diagnóstico de CHC.

Critérios de exclusão: pacientes portadores de outras doenças hepáticas, como: deficiência de α -1-antitripsina, hepatite autoimune, hemocromatose, doença de Wilson, doença de Gaucher, hepatopatias virais agudas; pacientes coinfectados com HIV e grávidas.

4.6 COLETA DE DADOS EPIDEMIOLÓGICOS, CLÍNICOS E LABORATORIAIS

Foram coletados e avaliados dados epidemiológicos, clínicos, imagenológicos e laboratoriais, por meio de protocolos adaptados do *International Liver Cancer Study*, que foram aplicados no momento da consulta.

4.7 TESTES IMUNOLÓGICOS E MOLECULARES

Os testes sorológicos e moleculares qualitativos foram realizados no Laboratório de Sorologia e de Biologia Molecular da Seção de Hepatologia do Instituto Evandro Chagas (IEV)

4.7 COLETA DE SANGUE

Os pacientes que consentiram foram submetidos a coleta de 10 ml de sangue periférico no momento da consulta de rotina.

4.8 ASPECTOS ÉTICOS

Todos os pacientes foram informados acerca do desenvolvimento, dos objetivos e da relevância da pesquisa, e foram incluídos no projeto após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), redigido segundo normas da Resolução nº 466/12 do Conselho Nacional de Saúde. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HUIBB (CAAE: 30499714.9.0000.0017/nº do parecer: 637.230).

4.9 EXTRAÇÃO DE DNA

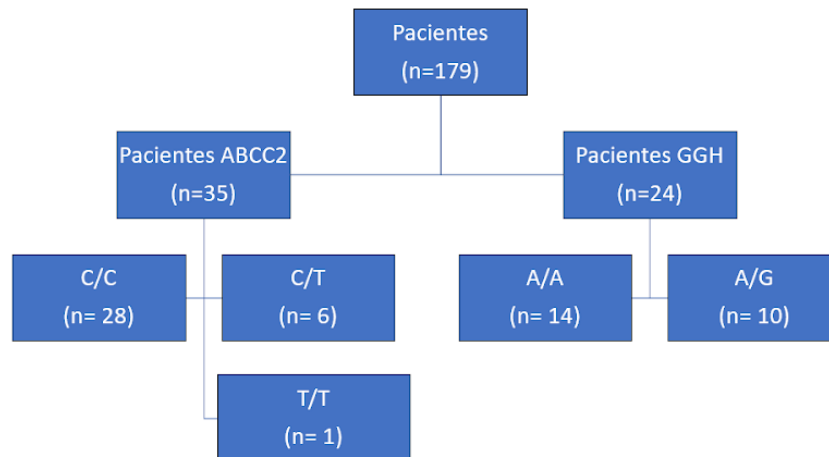
A extração do DNA foi realizada a partir de 200µL de sangue periférico pelo kit comercial de DNA BIOPUR KIT EXTRAÇÃO MINI SPIN PLUS (Biopur©, Reinach, Suíça). A concentração do DNA será estimada, empregando o espectrofotômetro NanoDrop™ ND-1000 (Thermo Scientific). Posteriormente, o DNA foi armazenado no freezer -80°C no Laboratório de Biologia Molecular do Núcleo de Pesquisas em Oncologia da UFPA.

4.10 GENOTIPAGEM DOS POLIMORFISMOS

A amplificação dos polimorfismos dos genes *GGH* e *ABCC2* foi realizada em um termociclador ABI Verity (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). O sistema de genotipagem por PCR utilizou o kit QIAGEN Multiplex PCR (QIAGEN, Germany): 5.0 µL de QIAGEN Multiplex PCR Master Mix, 1.0 µL de Q-solution, 1.0 µL de Mix dos primers, 2.0 µL de água, e 1.0 µL de DNA. As amostras foram incubadas a 95°C por 15', seguindo de 35 ciclos de 94°C por 45", 60°C por 90" e 72°C por 1', com a extensão final de 70°C por 30'. Para análise de eletroforese capilar (análise de fragmento), 1.0 µL do produto da PCR será adicionado a 8.5 µL de formamida deionizada HI-DI (Applied Biosystems, Foster City, CA) e 0.5 µL de GeneScan 500 LIZ tamanho padrão (Applied Biosystems, CA, USA). Os fragmentos de DNA foram separados utilizando-se o analisador genético ABI PRISM 3130

(Applied Biosystems, CA, USA) e analisados com o programa GeneMapper ID v.3.2 (Applied Biosystems, CA, USA).

4.11 SELEÇÃO DOS DADOS



Fonte: Elaborado pelos autores, 2023.

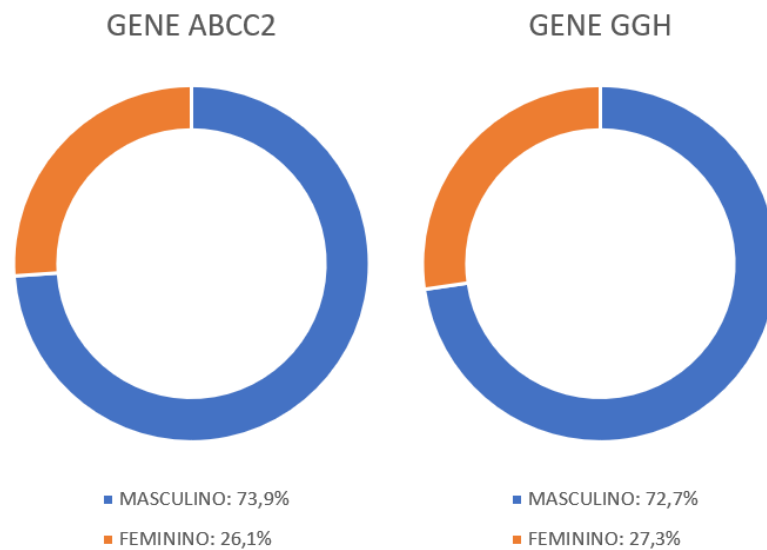
4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as análises estatísticas foram realizadas empregando o Programa Estatístico SPSS v.20.0 (SPSS, Chicago, IL, EUA). Comparações de grupos para as variáveis categóricas serão testadas dois a dois pelo teste Qui-quadrado de Pearson, enquanto que o teste t de Student foi utilizado para a análise de variáveis contínuas. Para a comparação do índice de ancestralidade entre as amostras foi utilizado o teste de Mann-Whitney. Odds ratio (OR) e intervalos de confiança (IC=95%) também foram calculados. Todos os testes estatísticos foram baseados em uma probabilidade bicaudal e um p valor $\leq 0,05$ será considerado significativo.

5. RESULTADOS

Participaram no total desse estudo 59 pacientes, dos quais 41 eram do gênero masculino (69,49%) e 15 eram do gênero feminino (25,42%). Com relação aos genes pesquisados, foram obtidas 24 amostras do gene GGH (rs3758149) e 35 amostras do gene ABCC2 (rs717620). Com relação à faixa etária para os dois genes estudados, a idade máxima encontrada foi de 76 anos e a idade mínima foi de 28 anos. A média da idade para o gene GGH (rs3758149) foi de 56,26 anos e para o gene ABCC2 (rs717620) de 57,65 anos.

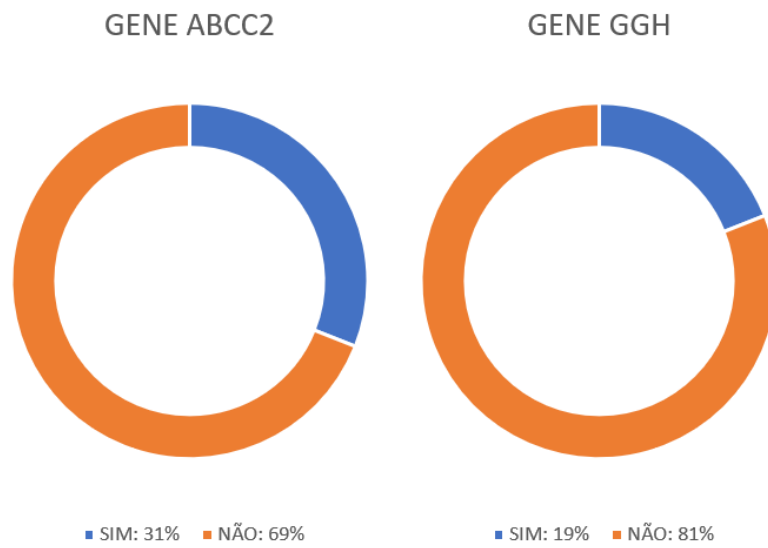
Gráfico 1 - Distribuição dos pacientes em relação aos genes, de acordo com o gênero



Fonte: Elaborado pelos autores, 2023.

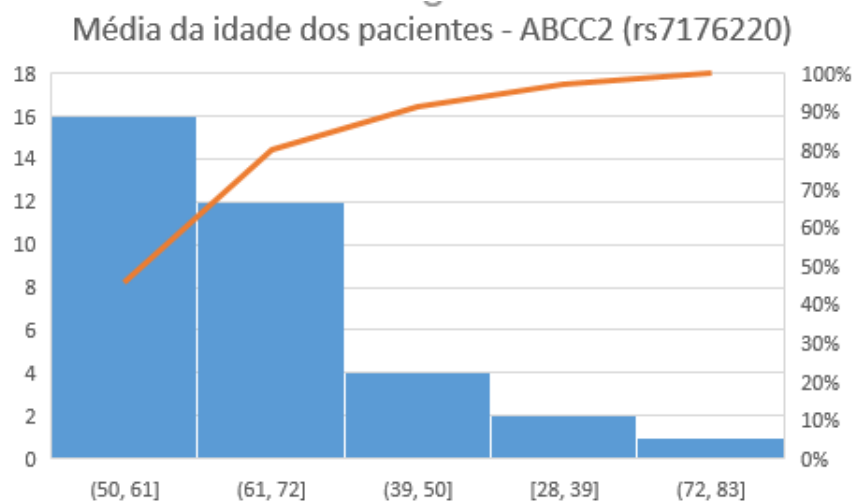
Com relação aos hábitos de vida, como não foi possível avaliar quantitativamente e de forma acurada o consumo de bebida alcoólica e a carga tabágica dos pacientes da pesquisa, teve-se que considerar o relato dos pacientes. Quatro (13,3%) pacientes relataram consumir álcool no grupo que teve o gene ABCC2 pesquisado, enquanto que 3 (13,6%) pacientes relataram fazer uso no grupo GGH. Em relação ao hábito de fumar, 19 (57,6%) pacientes declararam que fazem uso de cigarro no grupo do ABCC2 e 15 (65,2%) no grupo do gene GGH. No que tange as comorbidades avaliadas, 9 (31%) pacientes no grupo do gene ABCC2 declararam serem diabéticos, enquanto que 4 (19%) eram diabéticos no grupo GGH.

Gráfico 2 - Distribuição dos pacientes em relação aos genes, de acordo com as comorbidades (Diabetes Mellitus)



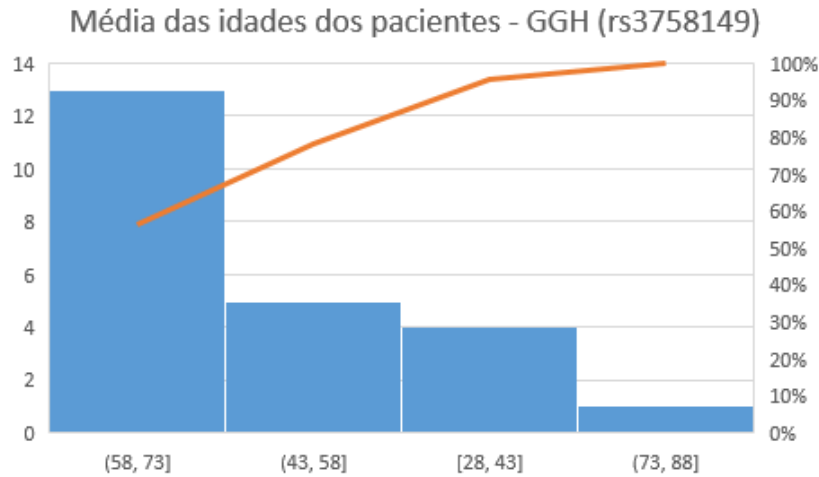
Fonte: Elaborado pelos autores, 2023.

Gráfico 3 – Média das idades dos pacientes no grupo do gene ABCC2 (rs717620)



Fonte: Elaborado pelos autores, 2023.

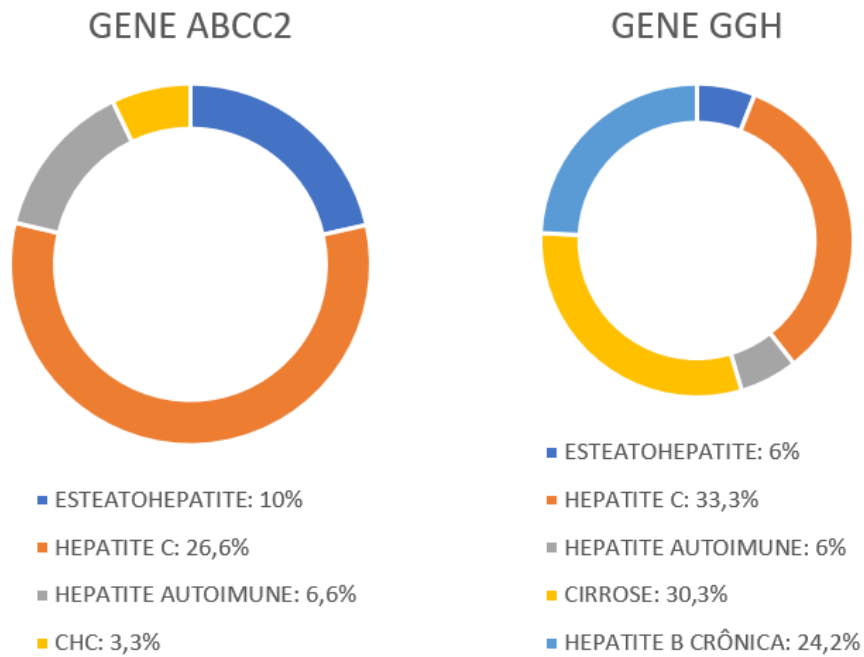
Gráfico 4 – Média das idades dos pacientes no grupo do gene ABCC2 (rs717620)



Fonte: Elaborado pelos autores, 2023.

Quanto ao diagnóstico clínico dos pacientes dos grupos dos genes pesquisados, foram identificados 2 casos (5,71%) de CHC no grupo do gene ABBC2 e 1 caso (4,16%) no grupo GGH. Dos outros diagnósticos clínicos, foram encontrados maior quantidade de casos de cirrose hepática, principalmente de etiologia alcoólica e por hepatite viral, e hepatite C crônica, sendo 21 casos de cirrose (35,59%) e 19 casos de hepatite C crônica (32,20%). Em alguns casos, o mesmo paciente recebeu mais de um diagnóstico clínico (ex., cirrose alcoólica e hepatite B crônica). Por fim, em menor extensão, foram identificados 5 casos de esteato-hepatite alcoólica (8,47%) e 4 casos de hepatite autoimune (6,77%).

Gráfico 3 - Distribuição dos pacientes em relação aos genes, de acordo com os diagnósticos clínicos



Fonte: Elaborado pelos autores, 2023.

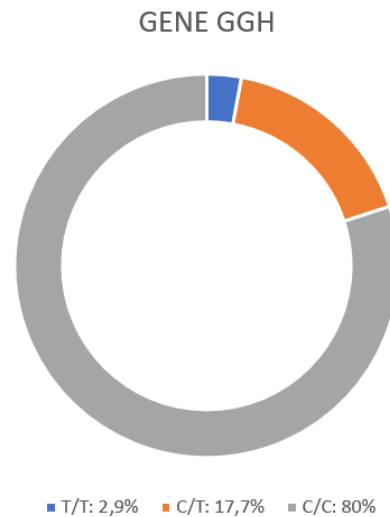
Quanto a caracterização genotípica dos polimorfismos dos genes ABCC2 e GGH nos pacientes com hepatopatias crônicas, foi observado uma frequência aumentada do perfil genotípico C/C (28 casos - 80%) no grupo do gene ABCC2 (rs717620), seguido do perfil C/T (6 casos - 17,1%) e T/T (1 caso - 2,9%); referente ao gene GGH (rs3758149), houve uma frequência maior dos perfis genotípicos A/A e A/G, com 14 casos (58,3%) e 10 casos (41,7%).

Gráfico 4 - Perfil genotípico do polimorfismo do gene ABCC2 (rs717620)



Fonte: Elaborado pelos autores, 2023.

Gráfico 5 - Perfil genotípico do polimorfismo do gene GGH (rs3758149)



Fonte: Elaborado pelos autores, 2023.

Dentre todas as hepatopatias analisadas em nosso estudo, foi verificada uma prevalência maior das hepatites virais crônicas (VHC e VHB), correspondendo a 55,9% das hepatopatias na amostra de pacientes do estudo. Dentre as hepatites virais, a hepatite C crônica foi a mais comum, com uma prevalência de 33,89%, seguido da hepatite B crônica (22%). Os pacientes que tinham o diagnóstico clínico de infecção pelo vírus da hepatite C e B eram majoritariamente do gênero masculino, nos dois grupos de genes estudados. Na amostra de pacientes do estudo, nenhum paciente do gênero feminino tinha o diagnóstico de infecção pelo vírus VHB, sendo que todos indivíduos que tinham o diagnóstico clínico de infecção por esse vírus pertenciam ao gênero masculino - 5 no total-. A idade média dos indivíduos do gênero masculino que tinham o diagnóstico de infecção pelo vírus VHC no grupo do gene ABCC2 (rs717620) foi de 63,3 anos, enquanto que quanto ao gênero feminino foi de 53,5 anos, um pouco similar a encontrada no grupo do gene GGH (rs3758149) que foram de 61 anos para o gênero masculino e feminino. Quanto ao vírus VHB, a idade média para o gênero masculino encontrada foi de 52,5 anos no grupo do gene ABCC2. Não havia registro da idade da única paciente do gênero feminino com esse diagnóstico no grupo do gene ABCC2. Para o gene GGH (rs3758149), a idade média foi de 50,8 anos para o gênero masculino.

Em relação ao perfil genotípico dos polimorfismos dos genes ABCC2 (rs717620) e GGH (rs3758149) dos pacientes com hepatite C crônica os mais comuns foram C/C para o

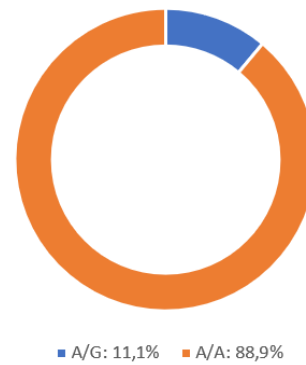
gene ABCC2 (rs717620), e A/A e A/G para o gene GGH (rs3758149); enquanto que os polimorfismos mais encontrados para os respectivos genes nos pacientes com hepatite B crônica foram C/C e A/A (Gráficos 6 e 7).

Gráfico 6 - Frequência genotípica dos genes ABCC2 (rs717620) e GGH (rs3758149) em pacientes portadores de infecção pelo vírus da hepatite C

Frequência genotípica ABCC2 (rs717620)



Frequência genotípica GGH (rs1801133)



Fonte: Elaborado pelos autores, 2023.

Gráfico 7 - Frequência genotípica dos genes ABCC2 (rs717620) e GGH (1801133) em pacientes com infecção pelo vírus HBV

Frequência genotípica ABCC2 (rs717620)



Frequência genotípica GGH (rs1801133)



Fonte: Elaborado pelos autores, 2023.

Tabela 4 - Perfil clínico dos pacientes com hepatopatias crônicas com os polimorfismos dos genes GGH (rs3758149) e ABCC2 (rs717620) pesquisados.

| Sintomas | Perfil genotípico | GGH (rs1801133) | | ABCC2 (rs717620) | | |
|-------------------------|-------------------|-----------------|------------|------------------|------------|-------------|
| | | A/A | A/G | C/C | C/G | C/T |
| Encefalopatia | Não | 92,9% (13/14) | 80% (8/10) | 82,1% (23/28) | 100% (1/1) | 83,3% (5/6) |
| | Sim | 7,1% (1/14) | 20% (2/10) | 10,7% (3/28) | 0% (0/1) | 0% (0/6) |
| Dor óssea | Não | 50% (7/14) | 70% (7/10) | 57,1% (16/28) | 100% (1/1) | 50% (3/6) |
| | Sim | 50% (7/14) | 30% (3/10) | 39,3% (11/28) | 0% (0/1) | 33,3% (2/6) |
| Mal estar geral | Não | 85,7% (12/14) | 80% (8/10) | 85,7% (24/28) | 100% (1/1) | 66,7% (4/6) |
| | Sim | 14,3% (2/14) | 20% (2/10) | 10,7% (3/28) | 0% (0/1) | 16,7% (1/6) |
| Dor abdominal | Não | 50% (7/14) | 40% (4/10) | 64,3% (18/28) | 100% (1/1) | 33,3% (2/6) |
| | Sim | 50% (7/14) | 60% (6/10) | 32,1% (9/28) | 0% (0/1) | 50% (3/6) |
| Plenitude pós refeições | Não | 78,6% (11/14) | 50% (5/10) | 75% (21/28) | 100% (1/1) | 66,7% (4/6) |
| | Sim | 21,4% (3/14) | 50% (5/10) | 21,4% (6/28) | 0% (0/1) | 16,7% (1/6) |
| Anorexia | Não | 64,3% (9/14) | 70% (7/10) | 75% (21/28) | 100% (1/1) | 66,7% (4/6) |
| | Sim | 35,7% (5/14) | 30% (3/10) | 21,4% (6/28) | 0% (0/1) | 16,7% (1/6) |
| Náuseas | Não | 64,3% (9/14) | 70% (7/10) | 64,3% (18/28) | 100% (1/1) | 50% (3/6) |
| | Sim | 35,7% (5/14) | 30% (3/10) | 32,1% (9/28) | 0% (0/1) | 33,3% (2/6) |
| Vômitos | Não | 64,3% (9/14) | 70% (7/10) | 64,3% (18/28) | 100% (1/1) | 66,7% (4/6) |
| | Sim | 35,7% (5/14) | 20% (2/10) | 32,1% (9/28) | 0% (0/1) | 16,7% (1/6) |
| Perda de peso | Não | 35,7% (5/14) | 20% (2/10) | 42,9% (12/28) | 100% (1/1) | 50% (3/6) |
| | Sim | 64,3% (9/14) | 70% (7/10) | 53,6% (15/28) | 0% (0/1) | 33,3% (2/6) |
| Icterícia | Não | 42,9% (6/14) | 40% (4/10) | 57,1% (16/28) | 100% (1/1) | 50% (3/6) |
| | Sim | 57,1% (8/14) | 50% (5/10) | 39,3% (11/28) | 0% (0/1) | 33,3% (2/6) |
| Prurido | Não | 64,3% (9/14) | 70% (7/10) | 71,4% (20/28) | 100% (1/1) | 50% (3/6) |
| | Sim | 35,7% (5/14) | 20% (2/10) | 25% (7/28) | 0% (0/1) | 33,3% (2/6) |

| | | | | | | |
|--------------------------------|-----------------|------------------|------------|------------------|---------------|-------------|
| <i>Urina escura</i> | <i>Não</i> | 71,4% (10/14) | 70% (7/10) | 67,9% (19/28) | 100% (1/1) | 66,7% (4/6) |
| | <i>Sim</i> | 28,6% (4/14) | 20% (2/10) | 28,6% (8/28) | 0% (0/1) | 16,7% (1/6) |
| <i>História de sangramento</i> | <i>Não</i> | 92,9% (13/14) | 90% (9/10) | 92,9% (26/28) | 100% (1/1) | 83,3% (5/6) |
| | <i>Sim</i> | 7,1% (1/14) | 10% (1/10) | 3,6% (1/28) | 0% (0/1) | 0% (0/6) |
| <i>Distensão abdominal</i> | <i>Não</i> | 57,1% (8/14) | 70% (7/10) | 78,6% (22/28) | 100% (1/1) | 50% (3/6) |
| | <i>Sim</i> | 42,9% (6/14) | 30% (3/10) | 17,9% (5/28) | 0% (0/1) | 33,3% (2/6) |
| <i>Ascite</i> | <i>Não</i> | 50% (7/14) | 70% (7/10) | 75% (21/28) | 100% (1/1) | 50% (3/6) |
| | <i>Sim</i> | 50% (7/14) | 30% (3/10) | 21,4% (6/28) | 0% (0/1) | 33,3% (2/6) |
| <i>Febre</i> | <i>Não</i> | 78,6% (11/14) | 80% (8/10) | 82,1% (23/28) | 100% (1/1) | 66,7% (4/6) |
| | <i>Sim</i> | 21,4% (3/10) | 20% (2/10) | 14,3% (4/28) | 0% (0/1) | 16,7% (1/6) |
| <i>Sangramento</i> | <i>Não</i> | 78,6% (11/14) | 70% (7/10) | 75% (21/28) | 100% (1/1) | 50% (3/6) |
| | <i>Sim</i> | 21,4% (3/10) | 30% (3/10) | 21,4% (6/28) | 0% (0/1) | 33,3% (2/6) |
| <i>Caquexia</i> | <i>Não</i> | 78,6% (11/14) | 70% (7/10) | 82,1% (23/28) | 100% (1/1) | 66,7% (4/6) |
| | <i>Sim</i> | 21,4% (3/10) | 30% (3/10) | 14,3% (4/28) | 0% (0/1) | 16,7% (1/6) |
| <i>Circulação colateral</i> | <i>Não</i> | 50% (7/14) | 70% (7/10) | 53,6% (15/28) | 0% (0/1) | 66,7% (4/6) |
| | <i>Sim</i> | 7,1% (1/14) | 10% (1/10) | 7,1% (2/28) | 0% (0/1) | 16,7% (1/6) |
| | <i>Não sabe</i> | 42,9% (6/14) | 20% (2/10) | 35,7% (10/28) | 100% (1/1) | 0% (0/6) |
| <i>Hepatomegalia</i> | <i>Não</i> | 71,4% (10/14) | 70% (7/10) | 67,9% (19/28) | 100% (1/1) | 66,7% (4/6) |
| | <i>Sim</i> | 28,6% (4/14) | 10% (1/10) | 17,9% (5/28) | 0% (0/1) | 0% (0/6) |
| | <i>Não sabe</i> | 0 | 20% (2/10) | 10,7% (3/28) | 0% (0/1) | 16,7% (0/6) |
| <i>Esplenomegalia</i> | <i>Não</i> | 64,3% (9/14) | 70% (7/10) | 67,9% (19/28) | 100% (1/1) | 50% (3/6) |
| | <i>Sim</i> | 35,7% (5/14) | 10% (1/10) | 17,9% (5/28) | 0% (0/1) | 16,7% (1/6) |
| | <i>Não sabe</i> | 0 | 20% (2/10) | 10,7% (3/28) | 0% (0/1) | 16,7% (1/6) |
| <i>Telangiectasia</i> | <i>Não</i> | 50% (7/14) | 70% (7/10) | 57,1% (16/28) | 0% (0/1) | 83,3% (5/6) |
| | <i>Sim</i> | 7,1% (1/14) | 10% (1/10) | 7,1% (2/28) | 0% (0/1) | 0% (0/6) |

| | | | | | | |
|------------------------|-----------------|---------------|------------|---------------|------------|-------------|
| | <i>Não sabe</i> | 42,9% (6/14) | 20% (2/10) | 32,1% (9/28) | 100% (1/1) | 0% (0/6) |
| | <i>Não</i> | 42,9% (6/14) | 30% (3/10) | 42,9% (12/28) | 0% (0/1) | 50% (3/6) |
| <i>Onda de fluido</i> | <i>Sim</i> | 0 | 10% (1/10) | 3,6% (1/28) | 0% (0/1) | 0% (0/6) |
| | <i>Não sabe</i> | 57,1% (8/14) | 60% (6/10) | 50% (14/28) | 100% (1/1) | 33,3% (2/6) |
| | <i>Não</i> | 85,7% (12/14) | 70% (7/10) | 71,4% (20/28) | 100% (1/1) | 66,7% (4/6) |
| | <i>Sim</i> | 7,1% (1/14) | 10% (1/10) | 10,7% (3/28) | 0% (0/1) | 0% (0/6) |
| | <i>Não sabe</i> | 7,1% (1/14) | 20% (2/10) | 14,3% (4/28) | 0% (0/1) | 16,7% (1/6) |
| | <i>Não</i> | 35,7% (5/14) | 40% (4/10) | 42,9% (12/28) | 0% (0/1) | 66,7% (4/6) |
| <i>Sopro hepático</i> | <i>Sim</i> | 0 | 10% (1/10) | 3,6% (1/28) | 0% (0/1) | 0% (0/6) |
| | <i>Não sabe</i> | 64,3% (9/14) | 50% (5/10) | 50% (14/28) | 100% (1/1) | 16,7% (1/6) |
| | <i>Não</i> | 50% (7/14) | 70% (7/10) | 57,1% (16/28) | 0% (0/1) | 83,3% (5/6) |
| <i>Eritema palmar</i> | <i>Sim</i> | 21,4% (3/14) | 10% (1/10) | 7,1% (2/28) | 0% (0/1) | 0% (0/6) |
| | <i>Não sabe</i> | 28,6% (4/14) | 20% (2/10) | 32,1% (9/28) | 100% (1/1) | 0% (0/6) |
| | <i>Não</i> | 28,6% (4/14) | 40% (4/10) | 39,3% (11/28) | 0% (0/1) | 66,7% (4/6) |
| <i>Nódulo hepático</i> | <i>Sim</i> | 14,3% (2/14) | 10% (1/10) | 10,7% (3/28) | 0% (0/1) | 0% (0/6) |
| | <i>Não sabe</i> | 57,1% (8/14) | 50% (5/10) | 46,4% (13/28) | 100% (1/1) | 16,7% (1/6) |

Fonte: Elaborado pelos autores, 2023.

6. DISCUSSÃO

A partir da distribuição amostral, o gênero masculino apresentou-se mais prevalente com 69,49%, enquanto o feminino representou 35,42% da totalidade estudada, com média de idade de 56,26 anos, resultado semelhante ao encontrado por Rodrigues et al (2019), no qual 32% eram do gênero feminino. Segundo Timóteo et al (2020), entre os anos de 2014 a 2018

foram notificados pelo Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde (DATASUS) 216.397 casos de hepatites virais no Brasil, dos quais 56% dos acometidos eram do gênero masculino e 44% do gênero feminino.

As hepatites virais constituem doenças de alta prevalência e incidência em nosso meio e são consideradas problemas de saúde pública nacional, especialmente na região amazônica, onde a infecção pelo vírus HBV apresenta alta endemicidade, chegando a 15% (Tanno, H.; Fay, O., 2005). Dos 59 pacientes com hepatopatias avaliados neste estudo, 33 pacientes (55,9%) tinham o diagnóstico clínico de hepatites virais B ou C. O número de casos de hepatite C foi maior em indivíduos do gênero masculino (85%) em comparação ao gênero feminino (15%), consoante ao perfil encontrando em um estudo em uma cidade do Paraná (Rodrigues et al., 2012). Contudo, tais resultados não concordam com os encontrados em um estudo de perfil epidemiológico conduzido em 2009 no Hospital Municipal dos Servidores de São Paulo, onde, embora a prevalência de hepatite B tenha sido maior no gênero masculino (62,5%), houve uma ligeira predominância de casos de hepatite C no gênero feminino (51,5%) (Cruz et al., 2009). Embora o gênero masculino constitua um grupo de risco de infecção de hepatite B e C devido aos hábitos de vida e do comportamento sexual, deve-se levar em consideração que a amostra de pacientes nesse estudo é prevalentemente pequena em comparação a grandes estudos epidemiológicos, podendo essa maior prevalência de casos de hepatite B e C no gênero masculino no nosso estudo se dever a um viés amostral.

Infelizmente não foi possível verificar na pesquisa a história de transfusão sanguínea, submissão a procedimentos dentários com instrumentos e uso de drogas intravenosas, importantes fatores de risco para a infecção pelo vírus da hepatite C. Entretanto, considerando que a idade média dos indivíduos com diagnóstico de HCV na forma crônica da pesquisa era acima de 60 anos e levando em consideração que o rastreio sorológico nos bancos de sangue para as hepatites B e C só foram empregados a partir de 1993 (Martins et al., 2010), acredita-se que uma fração desses pacientes tenha em algum momento adquirido a infecção por transfusão sanguínea ou por compartilhamento de agulhas e seringas em um período anterior a introdução do rastreio, quando a forma de transmissão do vírus era desconhecida. Um estudo de perfil sorológico e epidemiológico desenvolvido no Pará em 2008 encontrou uma prevalência maior de casos de hepatite C em indivíduos > 60 anos (Aquino et al., 2008), bem como no estudo conduzido por Rodrigues *et al.* na cidade do Paraná em 2012 (Rodrigues et al. 2012), condizente com a faixa etária encontrada dos pacientes no nosso estudo. O fato de indivíduos infectados por HCV serem em geral de idade mais avançada é apontado por um estudo caso-controle desenvolvido em doadores de sangue de um banco de sangue da cidade

de Belém - PA que observo que a idade média dos indivíduos infectados doadores de sangue era de 40 anos ou mais (Oliveira-filho et al., 2010).

Durante a pesquisa foi constatado que dos 3 pacientes que receberam o diagnóstico de CHC eram todos do gênero feminino nos dois grupos de genes estudados, apresentando uma idade média de 50,6 anos, sendo que 2 delas alegaram ter feito uso alguma vez na vida de cigarro e todas as três eram portadoras de diabetes mellitus. Como não foi possível avaliar a carga tabágica pela falta de informações do banco de dados, a influência da carga tabágica como fator de risco para CHC não foi possível de ser constatado. Como os dados referentes à epidemiologia do CHC no Brasil são escassos e exíguos, torna-se difícil de fazer uma comparação dos resultados desta pesquisa com perfil epidemiológico nacional. Contudo, alguns estudos realizados nos municípios de Florianópolis em 1996 e no município de São Paulo em 2009 apontam que a idade média de diagnóstico desse tumor é de 54,7 anos, com uma taxa de prevalência maior no gênero masculino, diferente do observado em nossa pesquisa, onde a prevalência foi maior no gênero feminino (Gonçalves *et al*, 1997). Entretanto, um estudo coorte desenvolvido na cidade do México de 2004 a 2007 encontrou uma prevalência maior da doença no gênero feminino (63,8%), sendo o vírus da hepatite C como principal etiologia associada (Ladrón, L. *et al*, 2009). O mesmo estudo desenvolvido em 2009 apontou que a principal etiologia naquele município foi de HCV (54%), sendo que 2 das 3 pacientes com o diagnóstico de CHC da pesquisa tinham recebido o diagnóstico dessa infecção viral.

É digno de observar que todas as três pacientes desse estudo eram diabéticas, sendo que hoje o diabetes mellitus configura um fator de risco independente para esse tipo de câncer de fígado, como apontado por estudos que sinalizam que nas últimas duas décadas tem se observado um aumento da prevalência do diabetes, da doença hepática não alcoólica gordurosa e da esteatohepatite gordurosa não alcoólica, especialmente em países desenvolvidos, condições metabólicas que por si só que aumentam o risco de CHC em 2 a 3 vezes em relação a indivíduos não diabéticos (Dyal, H. K. *et al*, 2017) devido a diversos mecanismos fisiopatológicos, incluindo o estresse oxidativo ao DNA e ao estado de resistência insulínica que essas condições promovem. Na verdade, o diabetes mellitus é uma doença que aumenta o risco de diferentes neoplasias, incluindo câncer de mama, de pâncreas, de rins, de pulmão e de intestino (Abudawood, M., 2019). Além disso, o tempo de duração do diabetes pode afetar a sobrevida e o prognóstico de pacientes com CHC (Yang, W.-S. *et al*, 2011). Nesse sentido, com o aumento progressivo da incidência global do diabetes, todos os profissionais de saúde, particularmente os hepatologistas e diabetologistas, devem reconhecer

a conexão entre essas duas doenças e atuar no sentido de retardar o crescimento da incidência dessas doenças e melhorar o prognóstico dos pacientes com esse tipo de tumor.

O tabagismo ocasiona algumas alterações, como inflamação sistêmica, estresse oxidativo, resistência insulínica, hipóxia tecidual e danos causados pelos radicais livres. Uma revisão de evidências cumulativas sugere que o tabagismo representa um fator de risco independente para fibrose hepática e contribui para a carcinogênese no CHC. Além disso, a fibrose relacionada ao tabagismo foi relatada em pacientes com patologias hepáticas, como a DHGNA, a colangite biliar primária, a doença hepática alcoólica e as hepatites virais crônicas (Premkumar, 2021). A prática do tabagismo proporciona um efeito sinérgico quando há infecção pelos vírus HBV e HCV (CFM, 2019). Em um estudo realizado por Zein *et al* (2010), foram avaliados 1.091 pacientes com DHGNA comprovado por biópsia e 28,5% apresentaram histórico de tabagismo e constatou-se a associação entre história de tabagismo \geq 10 anos-maço e fibrose avançada, OR = 1,63. No presente trabalho, o tabagismo foi relatado por 57,6% da amostra do gene ABCC2 e 65,2% da amostra do gene GGH, revelando consonância com os estudos citados.

O álcool é considerado um importante agente cancerígeno para diferentes tipos de câncer, incluindo o CHC, ao induzir a produção e acúmulo dentro das células de espécies reativas de oxigênio, inflamação crônica, mudanças na metilação do DNA e falha dos mecanismos de reparo do DNA. Estudos feitos nos EUA e na Itália apontam que o álcool por si só corresponde a 32-45% dos casos de CHC, constituindo um problema de saúde (Donato, F., 1997; Hassan, M. M. *et al.*, 2002). Estima-se que o uso crônico abusivo de mais de 80g de álcool por dia aumente o risco para o desenvolvimento CHC em 5 vezes. Dessa forma, é recomendado que pacientes com cirrose alcoólica entrem no grupo de pacientes que merecem ser rastreado para lesões hepáticas com US abdominal (Davila, J.A. *et al*, 2010). Além disso, o álcool pode atuar de forma sinérgica com outros fatores de risco para CHC, como hepatite C e obesidade, aumentando o risco desse tumor. Neste estudo, foram identificados 4 casos de cirrose de etiologia alcoólica (6,77%), sendo que todos os indivíduos eram do gênero masculino, com idade acima de 40 anos, com o perfil genotípico A/A mais comum no grupo do gene GGH e C/C no grupo do gene ABCC2. Ademais, foram identificados 2 casos (3,38%) de indivíduos que declararam consumir álcool e serem portadores de cirrose e infecção pelo vírus C. Embora não tenha sido possível estimar o consumo médio de álcool dos pacientes da pesquisa, é inegável que o consumo de álcool em indivíduos portadores de outras hepatopatias potencializa o risco de desenvolvimento de CHC.

O CHC corresponde ao resultado final do longo curso clínico das patologias hepáticas crônicas e seu processo envolve a substituição do parênquima hepático normal por tecidos fibróticos e nódulos regenerativos, ocasionando perda da função hepática (Pinzani, 2011). A etiologia da cirrose inclui alcoolismo, DHGNA, infecção crônica pelo HBV e HCV e causas hereditárias como a hepatite autoimune (Zhou, 2014). Appel-da-Silva *et al* (2016) avaliou 453 pacientes cirróticos ambulatoriais em vigilância de CHC e 75 (16,6%) foram diagnosticados com CHC. Em um estudo realizado por Ascha *et al* (2010), foi estimado a incidência de cirrose em 510 pacientes com hepatopatias crônicas, dos quais 195 (38,23%) apresentaram DHGNA-cirrose e 315 (61,76%) cirrose secundária ao HCV crônico. No presente trabalho, dos 35 pacientes do gene ABCC2, 4 (11,42%) apresentaram hepatite C crônica e cirrose, 2 (5,7%) cirrose hepática, 1 (2,85%) infecção pelo HBV e cirrose e 1 (2,85%) infecção pelo HCV e cirrose. Dos 24 pacientes do gene GGH, 4 (16,6%) apresentaram hepatite C crônica e cirrose, 3 (12,5%) hepatite C crônica, 1 (4,16%) cirrose hepática, 1 (4,16%) infecção pelo HCV e cirrose hepática e 1 (4,16%) infecção pelo HBV e cirrose hepática.

A DHGNA é caracterizada pelo acúmulo de gordura no fígado, ou seja, mais de 5% do seu conteúdo, sem a presença de etiologias secundárias como consumo excessivo de álcool, distúrbios metabólicos ou lesão hepática induzida por drogas. Entre as origens virais, observa-se que a infecção HCV desempenha um papel na resistência à insulina e no metabolismo dos lipídios, o que pode conduzir à esteatose hepática e à inflamação mais grave em pacientes com hepatite C crônica (CHC). A prevalência de esteatose hepática em pacientes com CHC varia entre 40% e 80%, dependendo das condições metabólicas individuais, do consumo de álcool e dos genótipos virais (Shi, 2021). A prevalência de esteatose hepática em pacientes com HCV crônica varia de 30-70% sendo sugerido que a presença desse acúmulo é consideravelmente mais elevada, cerca de 2-2,5 vezes maior do que o inicialmente estimado (Raquif *et al*, 2008). Em um estudo que abrangeu 120 pacientes com HCV crônico, foi observado que 41% dos pacientes apresentavam esteatose hepática, além de 18% com diagnóstico de esteato-hepatite não alcoólica (NASH) sobreposto ao quadro de HCV (Ong, 2006). Em estudo realizado por Rau *et al* (2022), dos 8.789 pacientes com HCV incluídos no estudo, 962 (12,3%) apresentavam esteatose. No presente trabalho, dos 35 pacientes do gene ABCC2, 2 (5,71%) apresentaram esteatohepatite e dos 24 pacientes do gene GGH, 3 (12,5%).

O gene ABCC2 é um membro da família de genes que codificam proteínas envolvidas com a resistência a várias drogas, estando localizado no domínio apical da membrana de células polarizadas, como hepatócitos, células tubulares renais proximais e enterócitos. A proteína deste gene participa da excreção por via biliar de diversas substâncias, como

bilirrubina, ânions e toxinas. Mais de 200 variantes desse gene têm sido identificadas em regiões, como os éxons, íntrons e nas regiões promotoras, algumas dessas variantes são simples substituições de nucleotídeos únicos que não levam a mudança nos aminoácidos da proteína, sem consequências funcionais (Nies, A. T.; Keppler, D.; 2006). Contudo, alguns desses polimorfismos têm implicações importantes sobre a resposta de indivíduos a medicamentos. Por exemplo, uma metanálise chinesa envolvendo 10 estudos com 2.863 pacientes observou que a variante c.-24C>T estava associada com um risco significativamente aumentado de resistência a drogas antiepilépticas (Qian, L. et al., 2017). Um estudo chinês que avaliou a frequência genotípica de 213 indivíduos que foram submetidos a terapia com clopidrogel, um agente antiplaquetário utilizado na terapia pós-coronarioplastia, obteve uma frequência alélica de 74,88% e de 25,12% para os alelos C e T do gene ABCC2 rs717620, respectivamente, similar ao nosso estudo. Ademais, este mesmo estudo observou que indivíduos portadores da variante TT apresentam uma taxa maior de resposta a inibição da agregação plaquetária induzida pela droga do que indivíduos portadores de outras variantes, como CC e CT (Chen, L.-D. et al., 2022). Um outro estudo caso-controle chinês que avaliou a frequência genotípica de 200 pacientes divididos em dois grupos, um grupo com lesão hepática induzida por drogas e outro com pacientes sem lesão hepática, observou que indivíduos que apresentavam os polimorfismos C/T e T/T do ABCC2 rs717620 no grupo de pacientes com lesão hepática induzida por drogas tiveram taxas aumentadas de hiperbilirrubinemia, que era o foco do estudo, e de risco de mortalidade (Huang, Y.-S. et al., 2021).

No grupo do gene do ABCC2 (rs717620), as 28 pacientes tinham como perfil genotípico a combinação C/C, enquanto que 14 pacientes no grupo do gene GGH (rs3758149) tinha o perfil genotípico A/A.

A partir da correlação entre o perfil genotípico com os sintomas dos pacientes, foi possível avaliar quais genótipos de cada gene se apresentaram em maior frequência para cada sintoma listado. Nos pacientes com diagnóstico de hepatite B no grupo do gene GGH, 13% possuíam o perfil genotípico A/A, já no grupo do gene ABCC2, 21,2% possuíam o perfil genotípico C/C. Nos pacientes com diagnóstico de hepatite C no grupo do gene GGH, 26% possuíam o perfil genotípico A/A, já no grupo do gene ABCC2, 33,3% possuíam o perfil genotípico C/C. As manifestações clínicas mais frequentes do gene GGH foram perda de peso (16), dor abdominal (15) e icterícia (13), que apresentaram perfis genotípicos A/A (39,1%), A/A (30,4%) e A/A (34,7%), respectivamente. No grupo do gene ABCC2, as manifestações

clínicas mais frequentes foram perda de peso (18), dor óssea (13) e icterícia (13), que apresentaram perfis genotípicos C/C (45,5%), C/C (33,3%) e C/C (33,3%).

7. CONCLUSÃO

Nesta série de casos, foi observado uma prevalência maior de indivíduos com diagnóstico de infecção pelos vírus das hepatites B e C em comparação às outras causas de hepatopatias crônicas. A maioria dos indivíduos era do gênero masculino com idade superior a 60 anos, condizente ao perfil encontrado na maioria dos estudos populacionais.

Foram identificados apenas 3 casos de carcinoma hepatocelular, sendo todos do gênero feminino, não esperado para o perfil de prevalência desse tumor. É digno de observar que todos esses três casos tinham o diagnóstico de diabetes mellitus.

Na amostra estudada, quanto aos polimorfismos identificados, foi identificado maior prevalência do perfil genotípico C/C nos pacientes com hepatopatias crônicas por diversas causas, no gene ABCC2 (rs717620), e prevalência do perfil genotípico A/A, no gene GGH (1801133), diferente do perfil genotípico encontrado em outras amostras populacionais.

O mesmo achado de perfil genotípico é encontrado para as manifestações clínicas mais encontradas nos pacientes com hepatopatias crônicas, sendo perda de peso, dor abdominal, dor óssea e icterícia as manifestações mais comuns.

Sugere-se que mais estudos sejam feitos avaliando os polimorfismos de genes envolvidos com o processamento de fármacos, como antivirais, em pacientes com hepatites virais crônicas, e quimioterápicos, em pacientes com CHC, a fim de avaliar o perfil e a possível relação de resposta dos pacientes associado aos polimorfismos.

REFERÊNCIAS

ABUDAWOOD, M. **Diabetes and cancer: A comprehensive review**. Journal of Research in Medical Sciences : The Official Journal of Isfahan University of Medical Sciences, v. 24, 25 out. 2019.

AQUINO, J.A.; PEGADO, K.A.; BARROS, L.P.; MACHADO, L.F.P., 2008. **Soroprevalência de infecções por vírus da hepatite B e vírus da hepatite C em indivíduos do Estado do Pará**. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 41, n. 4, p. 334-337.

ALVES, M.R.; SILVA, D.M.; SOUZA, T.O. *et al.* **Perfil epidemiológico dos casos de hepatite C em uma diretoria regional de saúde da Bahia**. Revista de Pesquisa Cuidado é Fundamental Online, 2013, v. 6, p. 889-896.

AMERICAN COLLEGE OF RADIOLOGY. **Liver Reporting & Data System (LI-RADS)**. Disponível em: <http://www.acr.org/Clinical-Resources/Reporting-and-Data-System/LI-RADS>. Acesso em: 15 de Julho de 2023.

AMERICAN COLLEGE OF RADIOLOGY. **Liver Reporting & Data System**. Disponível em: <https://www.acr.org/-/media/ACR/Files/RADS/LI-RADS/CEUS-LI-RADS-2017-Core.pdf?la=en> . Acesso em 04 de Julho de 2023.

APPEL-DA-SILVA, M.C. *et al.* **Incidence of hepatocellular carcinoma in outpatients with cirrhosis in Brazil: A 10-year retrospective cohort study**. World Journal of Gastroenterology, 2016, v.22, n.46, p. 10219-10225.

ARAÚJO, O.R.C. **Estudo da relação entre polimorfismos genéticos e hipermetilação de promotores gênicos e a progressão da hepatite crônica e desenvolvimento do carcinoma hepatocelular**. Ministério da Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, mar. 2018.

BARBOSA, F.S.; ALMEIDA, M.E.F. **Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica: um problema global de caráter reversível**. J. Health Biol Science, v. 7, n. 3, p. 305-311, 2019.

BENZAQUEM, D.C. *et al.* **Estudo do polimorfismo genético de espécies do gênero Aniba (Lauraceae) utilizando marcadores ISSRs**. Disponível em:

<<http://repositorioinstitucional.uea.edu.br//handle/riuea/2255>>. Universidade do Estado do Amazonas, Manaus - AM, 2009. Acesso em: 14 de Jul de 2023.

BLECHACZ, M. L et al. **Biopsy for liver cancer: How to balance research needs with evidence-based clinical practice.** Hepatology, 2015, v. 62, p. 1645.

BONEKAMP, S.; KAMEL, I.; SOLGA, S. et al. **Can imaging modalities diagnose and stage hepatic fibrosis and cirrhosis accurately?.** Journal Hepatology, 2009, v. 50, n. 1, p. 17-35.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Hepatites virais 2021.** Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/especiais/2021/boletim-epidemiologico-de-hepatite-2021.pdf/view>>. Boletim epidemiológico. Número especial. Jul, 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual técnico para o diagnóstico das hepatites virais.** Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das Infecções Sexualmente Transmissíveis, do HIV/Aids e das Hepatites Virais. Brasília – DF, 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para hepatite C e coinfeções.** Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das Infecções Sexualmente Transmissíveis, do HIV/Aids e das Hepatites Virais. Brasília – DF, 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas de Hepatite B e coinfeções.** Nov. 2022.

BUCHO, M.S.C.R.C. **Fisiopatologia da Doença Hepática Alcoólica.** Universidade Fernando Pessoa. Porto, 2012.

BLUMBERG, B.S. et al. **The relation of infection with the hepatitis B virus to primary hepatic carcinoma.** Am Journal Pathology, 1975, v.81, p. 669–82.

CACOUB, P.; ASSELAH, T. **Hepatitis B Virus Infection and Extra-Hepatic Manifestations: A Systemic Disease.** American Journal of Gastroenterology, 2021, v. 117, n. 2, p. 253–263.

CARRILHO, F.J.; PARAGANUA-VENOZZO, D.C.; CHAGAS, A.L.; ALENCAR, R.S.S.M.; et al. **Epidemiology of Liver Cancer in Latin America: Current and Future Trends**. *Seminars in Liver Disease*, v. 40, n. 02, p. 101–110, 11 nov. 2019.

CHAVE, KJ. **γ -Glutamyl Hydrolase**. *Handbook of Proteolytic Enzymes*. c. 550, v. 2, p. 2452-2549, 2013.

CHEN, C.L. et al. **Metabolic factors and risk of hepatocellular carcinoma by chronic hepatitis B/C infection: a follow-up study in Taiwan**. *Gastroenterology*, 2008, v. 135, p. 111–21.

CHEN, L.-D. et al. **Association of ABCC2 polymorphism with clopidogrel response in Chinese patients undergoing percutaneous coronary intervention**. *Frontiers in Pharmacology*, v. 13, 7 out. 2022.

CHOLANKERIL, G. et al. **Hepatocellular carcinoma in non-alcoholic steatohepatitis: Current knowledge and implications for management**. *World Journal of Hepatology*, v. 9, n. 11, p. 533–543, 2017.

CRUZ, C.R.B., SHIRASSU, M.M.; MARTINS, W.P. **Comparação do perfil epidemiológico das hepatites B e C em um serviço público de São Paulo**. *Arquivos de Gastroenterologia*, v. 46, n. 3, p. 225-229, 2009.

COLLIER, J.; SHERMAN, M. **Screening for hepatocellular carcinoma**. *Hepatology*, v. 27, n. 1, p. 273–278, jan. 1998.

CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA (CFM). **A tragédia do tabagismo: causas, consequências e prevenção**. Série: drogas lícitas e ilícitas, n.2. Brasília - DF, 2019.

DAVILA, J. A. et al. **Use of surveillance for hepatocellular carcinoma among patients with cirrhosis in the United States**. *Hepatology*, v. 52, n. 1, p. 132–141, jul. 2010.

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

DEAN, M.; HAMON, Y.; CHIMINI, G. **The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily**. *Journal of Lipid Research*, v. 42, n. 7, p. 1007–1017, jul. 2001.

DEVOS, L. et al. **Associations between single nucleotide polymorphisms in folate uptake and metabolizing genes with blood folate, homocysteine, and DNA uracil concentrations.** *The American Journal of Clinical Nutrition*, v. 88, n. 4, p. 1149–1158, out. 2008.

DONATO, F. et al. **Hepatitis B and C virus infection, alcohol drinking, and hepatocellular carcinoma: A case-control study in Italy.** *Hepatology*, v. 26, n. 3, p. 579–584, set. 1997.

DYAL, H. K. et al. **Diabetes Mellitus Increases Risk of Hepatocellular Carcinoma in Chronic Hepatitis C Virus Patients: A Systematic Review.** *Digestive Diseases and Sciences*, v. 61, n. 2, p. 636–645, dez. 2015.

EL-SERAG, H. B.; HAMPEL, H.; JAVADI, F. **The Association Between Diabetes and Hepatocellular Carcinoma: A Systematic Review of Epidemiologic Evidence.** *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, v. 4, n. 3, p. 369–380, mar. 2006.

EL-SERAG, H. B.; RUDOLPH, K. L. **Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis.** *Gastroenterology*, v. 132, n. 7, p. 2557–2576, jun. 2007.

EL-SERAG, H. B. et al. **Diagnosis and Treatment of Hepatocellular Carcinoma.** *Gastroenterology*, v. 134, n. 6, p. 1752–1763, maio de 2008.

FRAQUELLI, M. et al. **Contrast-enhanced ultrasound for the diagnosis of hepatocellular carcinoma in adults with chronic liver disease.** *Cochrane Database Syst Rev*, v. 9, 2022.

FREITAS, GRO. **Clonagem de antígenos quiméricos contendo epítomos das glicoproteínas E1 e E2 do envelope do vírus da hepatite C e caracterização de suas propriedades imunogênicas através da imunização com DNA.** Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, ago. 2014.

FORCE, M. et al. **Alpha-Fetoprotein (AFP) and AFP-L3 Is Most Useful in Detection of Recurrence of Hepatocellular Carcinoma in Patients after Tumor Ablation and with Low AFP Level.** *Viruses*, v. 14, n. 4, p. 775, abr. 2022.

GANNE-CARRIÉ, N.; NAHON, P. **Hepatocellular carcinoma in the setting of alcohol-related liver disease.** *Journal of Hepatology*, v. 70, n. 2, p. 284–293, fev. 2019.

GARCIA, GABRIELLA TEXEIRA. **Vírus da Hepatite C e Células Mononucleares do Sangue Periférico**. 2016. Tese (Doutorado em Doenças Infecciosas e Parasitárias) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016. Acesso em: 2023-08-26.

GLOBAL CANCER OBSERVATORY (GLOBOCAN). **Worldwide incidence of CHC**. International Agency of Research on Cancer. 2020.

GONÇALVES, C.S.; PEREIRA, F.L.; GAYOTTO, L.C.C. **Hepatocellular carcinoma in Brazil: report of a national survey**. Rev Inst Med Trop, São Paulo, v. 39, p. 165-170, 1997.

Gurtsevitch VE. Human oncogenic viruses: **Hepatitis B and hepatitis C viruses and their role in hepatocarcinogenesis**. Biochemistry (Mosc) 2008;73:504–513.

HASHIM, D. et al. **The global decrease in cancer mortality: trends and disparities**. Annals of Oncology, v. 27, n. 5, p. 926–933, maio 2016.

HASSAN, M. M. et al. **Risk factors for hepatocellular carcinoma: Synergism of alcohol with viral hepatitis and diabetes mellitus**. Hepatology, v. 36, n. 5, p. 1206–1213, nov. 2002.

HEIDELBAUGH, J.J.; BRUDERLY, M. **Cirrhosis and chronic liver failure: Part I. Diagnosis and evaluation**. Am Fam Physician, v. 74, p. 756–762, 2006.

HENRIQUES, M.S.M.; ARAÚJO, M.S.T.; SOUSA, A.W.P. **Doença hepática gordurosa não alcoólica**. Disponível em: <https://universidadefbg.com.br/arq/livros/ebook_DHGNA.pdf> Acesso em: 20 Jul 2023. João Pessoa, 2016.

HOFFMANN, K. et al. **Sorafenib modulates the gene expression of multi-drug resistance mediating ATP-binding cassette proteins in experimental hepatocellular carcinoma**. PubMed, v. 30, n. 11, p. 4503–8, 1 nov. 2010.

HUANG, Y.-S. et al. **The association of transporter ABCC2 (MRP2) genetic variation and drug-induced hyperbilirubinemia**. Journal of the Chinese Medical Association, v. 84, n. 2, p. 129–135, fev. 2021.

IOANNOU, G. N. et al. **Incidence and Predictors of Hepatocellular Carcinoma in Patients With Cirrhosis**. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, v. 5, n. 8, p. 938-945.e4, 1 ago. 2007.

JAFFE, A.; STRAZZABOSCO, M. **Metabolic syndrome and liver cancer**. In: Doria C, Rogart JN, editors. *Hepato-Pancreato-Biliary Malignancies: Diagnosis and Treatment in the 21st Century*. Cham, Switzerland: Springer International Publishing; 2021. p. 1–19.

JESUS, V.P. **Análise epidemiológica da Doença Hepática Alcoólica no estado de Sergipe**. 2022. 30 f. Trabalho de conclusão de curso (Graduação) - Departamento de Medicina. Universidade Federal de Sergipe, Lagarto, 2022.

KAJIHARA S, HISATOMI A, MIZUTA T, *et al.* **A Splice Mutation in the Human Canalicular Multispecific Organic Anion Transporter Gene Causes Dubin-Johnson Syndrome**. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 253, n. 2, p. 454-457, dez. 1998

KANWAL, F.; SINGAL, A. G. **Surveillance for Hepatocellular Carcinoma: Current Best Practice and Future Direction**. *Gastroenterology*, v. 157, n. 1, p. 54–64, jul. 2019.

KIM, V.. **Frequência de polimorfismos nos genes responsáveis pela absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME) de medicamentos na população brasileira**. 2018. Tese (Doutorado em Ciências em Gastroenterologia) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018. doi:10.11606/T.5.2018.tde-12092018-100648. Acesso em: 2023-08-27.

KOJIRO, M.; YANO, H.; NAKASHIMA, O. **Pathology of early hepatocellular carcinoma: Progression from early to advanced**. *Seminars in Surgical Oncology*, v. 12, n. 3, p. 197–203, maio 1996.

LADRÓN, L. et al. **Hepatocellular carcinoma: Epidemiological profile from a cohort of federal employees in Mexico**. *Annals of Hepatology*, 1 jul. 2009.

LEE, S. et al. **CT and MRI Liver Imaging Reporting and Data System Version 2018 for Hepatocellular Carcinoma: A Systematic Review With Meta-Analysis**. *Journal of the American College of Radiology: JACR*, v. 17, n. 10, p. 1199–1206, 1 out. 2020.

LOPES, R.M.M. **História natural da hepatite C**. 2015. 33 f. Trabalho de conclusão de curso - Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar. Universidade do Porto. Porto, 2015.

LIAW, Y.-F.; CHU, C.-M. **Hepatitis B virus infection**. *The Lancet*, v. 373, n. 9663, p. 582–592, 14 fev. 2009.

LIU, Z. et al. **Distribution of hepatitis B virus genotypes and subgenotypes**. *Medicine*, v. 100, n. 50, p. e27941, 17 dez. 2021.

LIMA, J. M. DE et al. **Estudo do polimorfismo genético no gene p53 (códon 72) em câncer colorretal**. *Arquivos de Gastroenterologia*, v. 43, n. 1, p. 8–13, mar. 2006.

LURIE, Y. **Non-invasive diagnosis of liver fibrosis and cirrhosis**. *World Journal of Gastroenterology*, v. 21, n. 41, p. 11567, 2015.

MARRERO, J.A. *et al.* **Alpha-fetoprotein, des-gamma carboxyprothrombin, and lactin-bound alpha-fetoprotein in early hepatocellular carcinoma**. *Gastroenterology*, v. 137, p. 110, 2009. PMID: 19362088

MARRERO, J. A. et al. **Diagnosis, Staging, and Management of Hepatocellular Carcinoma: 2018 Practice Guidance by the American Association for the Study of Liver Diseases**. *Clinical Liver Disease*, v. 13, n. 1, p. 1–1, jan. 2019.

MARTINS, T.; NARCISO-SCHIAVON, J.L.; SCHIAVON, L.L. **Epidemiologia da infecção pelo vírus da hepatite C**. *Revista da Associação Médica Brasileira*, v. 57, n. 1, pp. 107-112, 2010. <http://dx.doi.org/10.1590/S0104-42302011000100024> PMid:21390467.

MARTINS SB. **Transportadores de membrana e sua influência nos processos de absorção e disposição de fármacos**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2011.

MASSARWEH NN, EL-SERAG HB. **Epidemiology of Hepatocellular Carcinoma and Intrahepatic Cholangiocarcinoma**. *Cancer Control* 24:1073274817729245, 2017.

MIURA, M. et al. **Influence of SLC01B1, 1B3, 2B1 and ABCC2 genetic polymorphisms on mycophenolic acid pharmacokinetics in Japanese renal transplant recipients**. *European Journal of Clinical Pharmacology*, v. 63, n. 12, p. 1161–1169, 29 set. 2007.

MOR-COHEN, R. et al. **Identification and Functional Analysis of Two Novel Mutations in the Multidrug Resistance Protein 2 Gene in Israeli Patients with Dubin-Johnson Syndrome.** *Journal of Biological Chemistry*, v. 276, n. 40, p. 36923–36930, 26 jul. 2001.

NASCIMENTO, J. C. R. **Polimorfismo da apolipoproteína e na cirrose hepática induzida pelo vírus da hepatite C com ou sem carcinoma hepatocelular no perioperatório de transplante ortotópico de fígado.** 2020. 134 f. Tese (Doutorado em Ciências Médicas) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2020.

NIES, A. T.; KEPPLER, D. **The apical conjugate efflux pump ABCC2 (MRP2).** *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, v. 453, n. 5, p. 643–659, 18 jul. 2006.

NUSSBAUM RL, McINNES RR, WILLARD HF. **Thompson & Thompson: Genética Médica.** 7ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.

NGUYEN, V.T.T., LAW, M.G.; DORE, G.J. **Hepatitis B-related hepatocellular carcinoma:**

epidemiological characteristics and disease burden. *J Viral Hepatitis*, 2009, v. 16, p. 453–63.

NADER, L. A.; DE MATTOS, A. A.; BASTOS, G. A. N. **Burden of liver disease in Brazil.** *Liver International*, v. 34, n. 6, p. 844–849, 7 fev. 2014.

NELSON, P. et al. **The epidemiology of viral hepatitis among people who inject drugs: Results of global systematic reviews.** *Lancet*, v. 378, n. 9791, p. 571–583, 13 ago. 2011.

OLIVEIRA-FILHO, A. B. DE et al. **Likely transmission of hepatitis C virus through sharing of cutting and perforating instruments in blood donors in the State of Pará, Northern Brazil.** *Cadernos de Saúde Pública*, v. 26, n. 4, p. 837–844, abr. 2010.

OPPENEER, S. J. et al. **Genetic variation in folylpolyglutamate synthase and gamma-glutamyl hydrolase and plasma homocysteine levels in the Singapore Chinese Health Study.** *Molecular Genetics and Metabolism*. v. 105, n. 1, p. 73–78, 1 jan. 2012.

ONG J, PITTS A, YOUNOSSI ZM et al. **The impact of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) on mortality: a population-based cohort study.** *Hepatology*, v. 44 (Suppl. 1), A660 (2006).

OTT, J.J.; STEVENS, G.A.; GROEGER, J. **Global epidemiology of hepatitis B virus infection: new estimates of age-specific HBsAg seroprevalence and endemicity.** *Vaccine*, v. 30, p. 2212-9, 2012.

PINZANI, M.; ROSELLI, M.; ZUCKERMANN, M. **Liver cirrhosis.** *Best Pract Res Clin Gastroenterology*, v. 25, n. 2, p. 281-290, abril 2011.

PRECIADO, M.V. *et al.* **Hepatitis C vírus molecular evolution: Transmission, disease progression and antiviral therapy.** *World J Gastroenterol* 20, v. 43, p. 15992-16013, nov. 2021.

PREMKUMAR, M.; ANAND, A. C. **Tobacco, Cigarettes, and the Liver: The Smoking Gun.** *Journal of Clinical and Experimental Hepatology*, v. 11, n. 6, p. 700–712, nov. 2021.

QIAN, L. *et al.* **The ABCC2 c.-24C>T polymorphism increases the risk of resistance to antiepileptic drugs: A meta-analysis.** *Journal of Clinical Neuroscience: Official Journal of the Neurosurgical Society of Australasia*, v. 37, p. 6–14, 1 mar. 2017.

RAFIQ, N.; YOUNOSSI, Z. M. **Interaction of metabolic syndrome, nonalcoholic fatty liver disease and chronic hepatitis C.** *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology*, v. 2, n. 2, p. 207–215, abr. 2008.

RAU, T. *et al.* **High-dose methotrexate in pediatric acute lymphoblastic leukemia: Impact of ABCC2 polymorphisms on plasma concentrations.** *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, v. 80, n. 5, p. 468–476, nov. 2006.

RAU, M. *et al.* **Prognostic impact of steatosis in the clinical course of chronic HCV infection—Results from the German Hepatitis C-Registry.** *PLOS ONE*, v. 17, n. 6, p. e0264741–e0264741, 16 jun. 2022.

RASTOGI, A. *et al.* **Hepatocellular carcinoma: Clinicopathologic associations amidst marked phenotypic heterogeneity.** *Pathology Research and Practice*, v. 217, p. 153290–153290, 1 jan. 2021.

REIS, M.F. **Alcoolismo na Atenção Básica: uma abordagem familiar e Projeto de Intervenção.** 2021. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal de São Paulo. São Paulo, 2021

RHEE, M. S.; RYAN, T.J.; GALIVAN, J.H. **Gamma-glutamyl hydrolase secreted from human tumour cell lines.** Cell. Pharm, v. 2, p. 289-292, 1995.

ROCHA, A.S. *et al.* **Doença hepática alcoólica no Brasil: uma visão epidemiológica.** Revista Caderno de Medicina, v. 18, n.1, 2018.

RODRIGUES NETO, J. *et al.* **Prevalência da hepatite viral C em adultos usuários de serviço público de saúde do município de São José dos Pinhais - Paraná.** Revista Brasileira de Epidemiologia, v. 15, p. 627–638, 1 set. 2012.

RODRIGUES, L.M.C *et al.* **Mapeamento epidemiológico das hepatites hospitalares.** Rev Bras Promoç Saúde, v. 32, p. 714, 2019.

SANGIOVANNI A, PRATI GM, FASANI P, *et al.* **The natural history of compensated cirrhosis due to hepatitis C virus: a 17-year cohort study of 214 patients.** Hepatology 43:1303, 2006.

SANTOS RSD, CLEMENTINO AKP, LUSTOSA NHR, *et al.* **Doença hepática alcoólica: manifestações e diagnóstico laboratorial através do coagulograma e transaminases.** Temas em saúde. Vol 13, nº 3. João Pessoa, 2016.

SHASTRY, B. S. **SNPs in disease gene mapping, medicinal drug development and evolution.** Journal of Human Genetics, v. 52, n. 11, p. 871–880, 11 out. 2007.

SHI, Y.-W.; YANG, R.-X.; FAN, J.-G. **Chronic hepatitis B infection with concomitant hepatic steatosis: Current evidence and opinion.** World Journal of Gastroenterology, v. 27, n. 26, p. 3971–3983, 14 jul. 2021.

SIEGEL, R.L.; MILLER, K.D.; WAGLE, N.S.; JEMAL, A. **Cancer statistics, 2023.** Cancer J Clin, v. 73, p. 17, 2023.

SILVA, D.G. **Doença hepática gordurosa não alcoólica: implicações fisiopatológicas da senescência celular e desafios diagnósticos e terapêuticos.** Universidade de Brasília. Brasília, 2022.

SILVA, D. G. DA *et al.* **Doença hepática gordurosa não alcoólica: atualização sobre a fisiopatologia.** Brasília Médica, v. 52, n. 3-4, 2015.

SILVA, A.P. **Mutações nos genes não estruturais do vírus da hepatite C associadas à resistência aos novos antivirais.** 2014. 143 f. Tese (Doutorado em Biologia Parasitária) - Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2014.

SILVA et al. **Hepatites virais: B, C e D: atualização.** Rev. Soc. Bras. Clín. Méd, v. 10, n. 3, 1 jan. 2012.

SILVA, L.M.C *et al.* **Análise da elastografia por ultrassonografia em pacientes com esteatose hepática.** Radiol Bras., v. 53, n.1, p. 47–55, 2020.

SINGAL, A. et al. **Meta-analysis: surveillance with ultrasound for early-stage hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis.** Alimentary pharmacology & therapeutics, v. 30, n. 1, p. 37–47, 1 jul. 2009.

SMITH, A.; BAUMGARTNER, K.; BOSITIS, C. **Cirrhosis: Diagnosis and Management.** *Am Fam Physician.* v. 100, n. 12, p. 759-770, dez. 2015. PMID: 31845776.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE HEPATOLOGIA (SBH). **Hepatopatia Alcoólica: Patogênese e Tratamento.** Revista Hepato Brasil: saúde, cultura e ciência na SBH. Ano 6, n. 4, 2019.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE HEPATOLOGIA (SBH). **Doença hepática gordurosa não alcoólica.** Revista Monotemático Hepato, v. 6, n. 2, 2019.

SOMI, M.H. **Hepatocellular Carcinoma.** Hepatitis Monthly, v. 5, n.3, p. 65–76, 2005.

SOUTO, K.E.P. **Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica (DHGNA) em pacientes morbidamente obesos submetidos à cirurgia bariátrica: correlação entre os achados histopatológicos das biópsias hepáticas intraoperatórias e estado glicêmico basal.** 2017. 121 f. Tese de Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Ciências Cirúrgicas. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2017.

STEPHENS, P.R.S. *et al.* **Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratório de saúde: volume 4.** Capítulo 2: Virologia. FIOCRUZ. Rio de Janeiro, 2013.

STERLING, R. K. et al. **Frequency of Elevated Hepatocellular Carcinoma (CHC) Biomarkers in Patients With Advanced Hepatitis C.** American Journal of Gastroenterology, v. 107, n. 1, p. 64–74, jan. 2012.

SUNBUL, M. **Hepatitis B virus genotypes: Global distribution and clinical importance.** World Journal of Gastroenterology, v. 20, n. 18, p. 5427, 2014.

TAMURA, T.; HISHIDA, A.; WAKAI, K. **Coffee consumption and liver cancer risk in Japan: a meta-analysis of six prospective cohort studies.** Nagoya Journal of Medical Science, v. 81, n. 1, p. 143–150, 1 fev. 2019.

TANNO, H.; FAY, O. **Viral hepatitis in Latin America.** Acta Gastroenterol Latinoam. 2005, v. 35, p. 169-82. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16333976/>>. Acesso em: 20 de ago de 2023.

TIMOTEO, M.V.F. *et al.* **Perfil epidemiológico das hepatites virais no Brasil.** Research, Society and Development, v. 9, n. 6, e29963231, 2020.

THE INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **WHO Classification of Tumours of the Digestive System (IARC WHO Classification of Tumours).** 4th ed. In: Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, Theise ND, editors. Publisher: World Health Organization; 2010. pp. 1–418.

TRÉPO, C.; CHAN, H. L. Y.; LOK, A. **Hepatitis B virus infection.** The Lancet, v. 384, n. 9959, p. 2053–2063, dez. 2014.

TOH, S. *et al.* **Genomic Structure of the Canalicular Multispecific Organic Anion–Transporter Gene (MRP2/cMOAT) and Mutations in the ATP-Binding–Cassette Region in Dubin–Johnson Syndrome.** The American Journal of Human Genetics, v. 64, n. 3, p. 739–746, mar. 1999.

TOMMASO, L.; RONCALLI, M. **Tissue Biomarkers in Hepatocellular Tumors: Which, When, and How.** Front Med (Lausanne), v. 4, n. 10, 2017.

TORBENSON, M. S. **Morphologic Subtypes of Hepatocellular Carcinoma.** Gastroenterology Clinics of North America, v. 46, n. 2, p. 365–391, 1 jun. 2017.

TSUJII, H. *et al.* **Exon-intron organization of the human multidrug-resistance protein 2 (MRP2) gene mutated in Dubin–Johnson syndrome.** Gastroenterology, v. 117, n. 3, p. 653–660, set. 1999.

TURATI, F. et al. **Alcohol and liver cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective studies**. *Annals of Oncology*, v. 25, n. 8, p. 1526–1535, 14 mar. 2014.

VAN DER POL, C.B. et al. **CT/MRI and CEUS LI-RADS Major Features Association with Hepatocellular Carcinoma: Individual Patient Data Meta-Analysis**. *Radiology*, p. 302:326, 2022.

VILLANUEVA, A. **Hepatocellular Carcinoma**. *New England Journal of Medicine*, v. 380, n. 15, p. 1450–1462, 11 abr. 2019.

WANG, P. et al. **Diabetes mellitus and risk of hepatocellular carcinoma: a systematic review and meta-analysis**. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, v. 28, n. 2, p. 109–122, fev. 2012.

Wang G, Zhu S, Li X. **Comparison of values of CT and MRI imaging in the diagnosis of hepatocellular carcinoma and analysis of prognostic factors**. *Oncol Lett* 2019; 17:1184.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Hepatitis B**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-b>>. World Health Organization, 2023. Acesso em: 20 de Ago 2023.

WERNER, L.F. **Tendência temporal da morbimortalidade por doença hepática alcoólica em Santa Catarina no período de 2008-2017**. 2020. 39 f. Trabalho de Conclusão de Curso (UNISUL). Universidade do Sul de Santa Catarina. Tubarão, 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Liver**. The global cancer observatory. Dez, 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Global status report on alcohol and health - 2018** Disponível em: <<https://www.who.int/publications/i/item/9789241565639>>. Acesso em: 19 de Jul. de 2023.

YANG, W.S. et al. **The Role of Pre-Existing Diabetes Mellitus on Hepatocellular Carcinoma Occurrence and Prognosis: A Meta-Analysis of Prospective Cohort Studies**. *PLoS ONE*, v. 6, n. 12, p. e27326, 21 dez. 2011.

YIN, D. et al. **Structural organization of the human gamma-glutamyl hydrolase gene**. *Gene*, v. 238, p. 463-470, 1999.

ZEIN, C.O. *et al.* **Smoking and severit of hepatic fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease.** J Hepatol, v. 54, n. 4, p. 753-759, abril 2011.

ZHOU, W.C *et al.* **Pathogenesis of liver cirrhosis.** World Journal of Gastroenterology, v. 20, n. 23, p. 7312, 2014.

ZUBERI, B.F. *et. al.* **Determination of correlation of Adjusted Blood Requirement Index with outcome in patients presenting with acute variceal bleeding.** World journal of gastroenterology, v. 15, n. 19, p. 2372-5, 2009.

ZOULIM, F.; TESTONI, B. **Eliminating cccDNA to cure Hepatitis B virus (HBV) infection.** Journal of Hepatology, 2023, v.78, p. 742-753.