

**Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza Herdy”
UNIGRANRIO**

IONE ANDREIOLO

**INFLUÊNCIA DO COLESTEROL EM MODELO IN VIVO DE CARCINOMA
HEPATOCELULAR**

**RIO DE JANEIRO
2025**

Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza Herdy”
UNIGRANRIO

IONE ANDREIOLO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza
Herdy”, como requisito parcial para a obtenção do
título de Bacharel em Biomedicina.

Orientadora: Dr^a. Anissa Daliry
Coorientadora: MSc. Vivian Vieira Dias da Silva

RIO DE JANEIRO
2025

IONE ANDREIOLO

**INFLUÊNCIA DO COLESTEROL EM MODELO IN VIVO DE CARCINOMA
HEPATOCELULAR**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza
Herdy”, como requisito parcial para a obtenção do
título de Bacharel em Biomedicina.

Orientadora: Anissa Daliry
Coorientadora: Vivian Vieira Dias da Silva

Aprovada em:

Barra da Tijuca, 28 de Novembro de 2025.

BANCA EXAMINADORA

Dr^a. Anissa Daliry (orientadora)

MSc. Vivian Vieira (coorientadora)

Prof. Daniel Machado

Dr^a Karine Lino

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus, por guiar meus passos, me dar forças nos momentos difíceis e iluminar meu caminho durante toda essa jornada.

À minha mãe, por todo amor, paciência e incentivo. E à minha irmã por acreditar em mim. Vocês são minha base e meu maior motivo para continuar.

Ao meu pai, que já não está mais aqui, mas vive em cada conquista minha e continua sendo uma inspiração de pessoa e profissional.

Ao meu namorado, Arthur, por todo o amor, compreensão e incentivo. Obrigada por estar presente em cada etapa, celebrando as conquistas e me apoiando nos momentos mais desafiadores.

À minha orientadora, Dra. Anissa Daliry, e à minha coorientadora, MSc. Vivian Vieira, por toda dedicação, paciência e carinho. Obrigada por me guiarem e me ajudarem em cada etapa e por serem inspirações para mim.

Agradeço também às bolsas de fomento, que tornaram este trabalho possível.

À equipe do laboratório, por cada aprendizado, risada e momento de apoio mútuo. Obrigada por tornaram o processo mais leve.

À professora Thuany, e a todos os professores que fizeram parte da minha trajetória acadêmica — Giselle Fagundes, Natália de Moraes, Renata Manfrinato, Rafael Montenegro, Wallace Pacienza, Daniel Machado, e tantos outros que contribuíram com seus ensinamentos e incentivos ao longo do curso. Cada um de vocês deixou uma marca importante na minha formação e na pessoa que me tornei.

E, com muito carinho, agradeço à Dra. Karine Lino e ao professor Daniel Machado, por aceitarem o convite para compor minha banca. Obrigada pela atenção, pelas contribuições e por fazerem parte desse momento tão importante da minha vida.

A cada pessoa que, de alguma forma, caminhou comigo até aqui: meu mais sincero e profundo obrigado.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Espectro da MASLD.....	9
Figura 2 – Esquema da formação do colesterol endógeno.....	10
Figura 3 – Desenho experimental.....	12
Figura 4 – Efeito do colesterol no peso corporal e gordura visceral dos camundongos.....	13
Figura 5 – Efeito do colesterol nos parâmetros bioquímicos dos camundongos.....	14
Figura 6 – Efeito do colesterol nos parâmetros histopatológicos dos camundongos...	15
Figura 7 – Quantificação das esteatose e fibrose nos camundongos.....	16
Figura 8 – Efeito do colesterol na tumorigênese dos camundongos.....	17
Figura 9 –Avaliação do peso hepático e desenvolvimento tumoral.....	17
Figura 10 – Imagens representativas das esteatoses macrovesicular e microvesicular.....	20

SUMÁRIO

1 RESUMO.....	7
2 INTRODUÇÃO.....	8
3 METODOLOGIA.....	11
4 RESULTADOS.....	13
5 DISCUSSÃO.....	18
6 CONCLUSÃO.....	21
REFERÊNCIAS.....	23

INFLUÊNCIA DO COLESTEROL EM MODELO IN VIVO DE CARCINOMA HEPATOCELULAR

Ione Andreiolo¹

Anissa Daliry²

Vivian Vieira Dias da Silva³

RESUMO

O carcinoma hepatocelular (CHC) é o tipo mais comum de câncer hepático, é a sexta causa de câncer no mundo. Uma das etiologias do CHC é a doença hepática esteatótica associada à disfunção metabólica (MASLD), que tem como características o acúmulo de gordura nos hepatócitos e sua prevalência mundial aproxima-se dos 30%. Seu espectro inicia na esteatose até a esteatohepatite associado à disfunção metabólica, sendo consideradas formas reversíveis, mas que podem progredir para a cirrose e o CHC, cenários estes irreversíveis. A sua fisiopatologia abrange a lipotoxicidade, que é resultado do excesso de lipídeos, o que engloba o colesterol. O objetivo desse estudo é avaliar a influência do colesterol em modelo in vivo de CHC associada a MASLD. O estudo foi feito a partir da análise de amostras de 29 camundongos C57BL/6 machos. A adição de colesterol à dieta aumentou o peso corporal, a gordura visceral, parâmetros bioquímicos, esteatoses e potencializou a tumorigênese, a partir do aumento do peso do fígado, número e tamanho dos tumores. O tratamento com atorvastatina contribuiu para a diminuição da esteatose e do peso do fígado. Assim, o colesterol desempenhou papel crucial na progressão do CHC associado à MASLD.

Palavras-chave:. Carcinoma hepatocelular. Colesterol. Doença hepática esteatótica associada à disfunção metabólica. Esteatohepatite associada à disfunção metabólica.

ABSTRACT

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the most common type of liver cancer and one of its etiologies is metabolic dysfunction-associated fatty liver disease (MASLD). HCC is the sixth leading cause of cancer worldwide, and it is estimated that 4.6% of cases occur in Latin America. MASLD is characterized by the accumulation of fat in the liver, and its global prevalence is close to 30%. Its spectrum ranges from steatosis to steatohepatitis associated with metabolic dysfunction—reversible forms—and can also progress to cirrhosis and HCC—irreversible scenarios. Its pathophysiology involves lipotoxicity, which is the result of excess lipids, including cholesterol. The objective of this study is to evaluate the influence of cholesterol in an in vivo model of HCC associated with MASLD. The study was based on the analysis of samples from 29 male C57BL/6 mice. The addition of cholesterol to the diet increased body weight, visceral fat, biochemical parameters, steatosis, and potentiated tumorigenesis, based on the increase in liver weight, number, and size of tumors. Treatment with atorvastatin contributed to a decrease in steatosis and liver weight. Thus, cholesterol played a crucial role in the progression of HCC associated with MASLD.

Keywords:. Hepatocellular carcinoma. Cholesterol. Metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease. Metabolic dysfunction-associated steatohepatitis.

¹ Graduanda do curso de Biomedicina na Universidade do Grande Rio – UNIGRANRIO

² Doutora em Biologia Celular e Molecular

³ Mestre em Biologia Celular e Molecular

1 INTRODUÇÃO

De acordo com Instituto Nacional de Câncer (INCA), a nomenclatura dos tipos de câncer está relacionada ao tipo histológico – célula que deu origem – e a topografia. O carcinoma se refere a neoplasias originadas dos epitélios de revestimento (Brasil, 2011).

O carcinoma hepatocelular (CHC), também conhecido por hepatocarcinoma, é o câncer derivado dos hepatócitos, principais células do fígado (Gomes *et al.*, 2013), e é o tipo mais comum de câncer hepático, representando 90% dos casos (Singal; Lampertico; Nahon, 2020). As hepatites, toxinas, consumo excessivo de álcool e a doença hepática esteatótica associada a disfunção metabólica (MASLD), que é o foco do estudo, são as principais etiologias para o CHC (Brasil, 2022).

A incidência de CHC varia em cada continente em razão dos inúmeros fatores de risco relacionados. Estima-se que dentre os casos de CHC, 72% desses ocorram na Ásia, 10% na Europa, 7,8% na África, 5,1% na América do Norte, 4,6% na América Latina e 0,5% na Oceania (Singal; Lampertico; Nahon, 2020). O CHC é a sexta causa de câncer no mundo (Pol, 2024) e a taxa de mortalidade do CHC é alta e vem crescendo cada vez mais. Conforme a Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no Sistema Único de Saúde (Conitec), em 2022, a incidência global anual do CHC é estimada entre 500.000 e 1.000.000, levando a 700.000 mortes por ano (Brasil, 2022). No Brasil, vale destacar que as taxas de mortalidade e incidência são muito semelhantes, o que o torna uma preocupação. A incidência de CHC está em torno de 3,3% e 6% por 100.000/ano e a mortalidade está em torno de 3,6% a 6% por 100.000/ano (Magalhães *et al.*, 2023). Fora isso, a sua taxa de sobrevida é insatisfatória (Magalhães *et al.*, 2023). A American Cancer Society, em 2022, usou informações do banco de dados do Instituto Nacional do Câncer e afirmou que a taxa relativa de sobrevida em 5 anos para todos os cânceres de fígado é de apenas 20% (American Cancer Society, 2022).

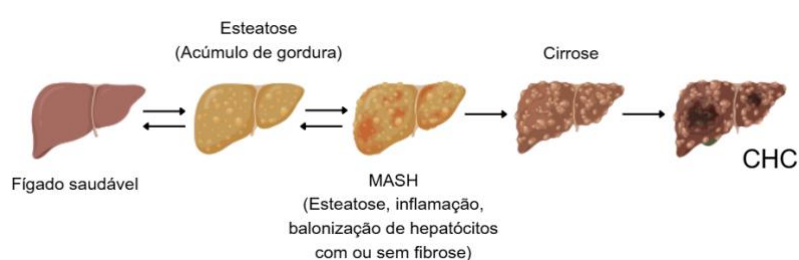
O CHC é um câncer silencioso diagnosticado já em estágios avançados quando o tumor é irresssecável, o que torna os tratamentos ineficazes (Chidambaranathan-Reghupaty *et al.*, 2022). Uma das terapias existentes é antiangiogênica com sorafenibe, porém está não apresentando benefício clínico considerando as taxas de recorrência ou aumento da sobrevida (Conitec, 2022).

A MASLD, uma das etiologias do CHC, é caracterizada pelo acúmulo de gordura no fígado. No Brasil, estudos identificaram a MASLD em cerca de 20% da

população e nos Estados Unidos essa taxa é de 46%, também ressaltando-a como um problema de saúde pública (Bergamin *et al.*, 2023). Já a prevalência mundial, essa taxa aproxima-se dos 30% (Fabbrini; Sullivan; Klein, 2013).

O espectro de uma doença diz respeito aos níveis e gravidades existentes. No caso da MASLD, o espectro varia desde a esteatose branda nas fases iniciais até a esteatohepatite associada à disfunção metabólica (MASH), sendo essas formas reversíveis, mas que podem progredir para cirrose ou CHC, cenários irreversíveis (Farias & Gonçalves, 2012).

Figura 1 - Espectro da MASLD



Fonte: Criado pelo autor

A MASH, representa o estágio mais avançado da MASLD, caracterizando-se por acúmulo lipídico, inflamação, balonização e lesão hepatocelular (Tsuchida *et al.*, 2019). A sua progressão para CHC envolve diversos "hallmarks" do câncer, incluindo inflamação crônica, reprogramação metabólica, proliferação celular exacerbada e senescência celular (Cherubini *et al.*, 2024; Dileo *et al.*, 2025).

A prevalência da MASLD é diretamente proporcional ao índice de massa corporal (IMC) (Fabbrini; Sullivan; Klein, 2013) e sua incidência vem crescendo constantemente em paralelo com a atual epidemia de obesidade (Tsuchida *et al.*, 2019).

Analisando histologicamente o fígado dos casos de MASLD, é possível observar a presença de esteatose e esteatohepatite e relacionar com o IMC. Em pessoas não obesas as taxas são de 15% e 3%, respectivamente, já em pessoas com obesidade de classe I e II são de 65% e 20%, respectivamente, e por fim em pacientes extremamente obesos são de 85% e 40%, respectivamente. (Fabbrini; Sullivan; Klein, 2013).

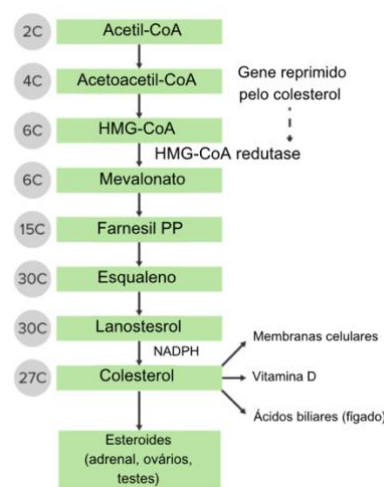
A inflamação do fígado é o ponto-chave para ocorrer a progressão da MASLD e pode ser desencadeada por diversos mecanismos, incluindo a morte celular induzida pelo estresse oxidativo (Malagó-Jr *et al.*, 2020). Além da relação com o estresse oxidativo, a fisiopatologia da MASLD também compreende a disfunção

mitocondrial e a lipotoxicidade, sendo essa um resultado do excesso de ácido graxo, triglicerídeos e colesterol livre (Oliveira *et al.*, 2020).

O colesterol livre é uma molécula de lipídeo e desempenha diversas funções no organismo, como: composição estrutural e funcional da membrana celular e síntese de hormônios reguladores do metabolismo e dos hormônios sexuais (Ludke; López, 1999). Por ser um lipídeo e ter características hidrofóbicas, o colesterol precisa ser transportado no sangue por lipoproteínas, as mais conhecidas são a lipoproteína de alta densidade (High density lipoprotein - HDL) e a lipoproteína de baixa intensidade (Low density lipoprotein - LDL) (Maranhão, 2013). Aproximadamente 75% do nosso colesterol é endógeno, originando-se da biossíntese do fígado, enquanto o restante é fornecido pela dieta alimentar, sendo chamado de colesterol exógeno (Ludke; López, 1999).

A síntese do colesterol endógeno, em cenário fisiológico, ocorre a partir de processos bioquímicos da via do mevalonato. Esse processo se inicia pela conversão, a partir de condensações, do Acetil-CoA em 3-hidroxi-3-metilglutatil-coenzima (HMG-CoA). O HMG-CoA se reduz a mevalonato a partir da enzima HMG-CoA redutase. Após uma série de reações enzimáticas, tem-se, por fim, a formação do colesterol (Garcia-Ruiz *et al.*, 2022). Em situações patológicas, é preciso que o paciente faça uso de medicamentos, como fibratos, ezetimibes e estatinas, conhecidos por reduzir níveis de colesterol. A estatina age inibindo a enzima HMG-CoA redutase, impossibilitando que essa reduza a HMG-CoA em mevalonato e, conseqüentemente, em colesterol. (Nelson; Cox; Hoskins, 2022).

Figura 2 - Esquema da formação do colesterol endógeno



Adaptado de: Lecturio, 2022

O acúmulo de colesterol livre é lipotóxico para os hepatócitos e é um dos fatores que contribuem para a inflamação e a fibrose, características típicas da MASH (Horn *et al.*, 2021). Fora a relação do colesterol endógeno com a progressão para MASH, o colesterol dietético também tem certa influência (Rooyen *et al.*, 2011). Estudos humanos, realizados em adultos do Havaí e da Califórnia, mostraram que há uma associação entre a ingesta de colesterol e o desenvolvimento de MASLD e MASH (Horn *et al.*, 2021). Estudos experimentais demonstraram que a dieta rica em gordura causa o desenvolvimento da esteatose branda e a adição de colesterol na dieta causa a progressão para MASH (Horn *et al.*, 2021).

Considerando as taxas e a periculosidade da MASLD e da sua evolução para CHC, é importante entender os mecanismos de progressão da doença.

Portanto, o objetivo desse estudo é avaliar a influência da adição de colesterol em modelo de CHC associada à MASLD, avaliando parâmetros que incluem: peso corporal, adiposidade e marcadores bioquímicos séricos e do tecido hepático; analisar a histopatologia e caracterizar os tumores de acordo com seu tamanho e quantidade.

2 METODOLOGIA

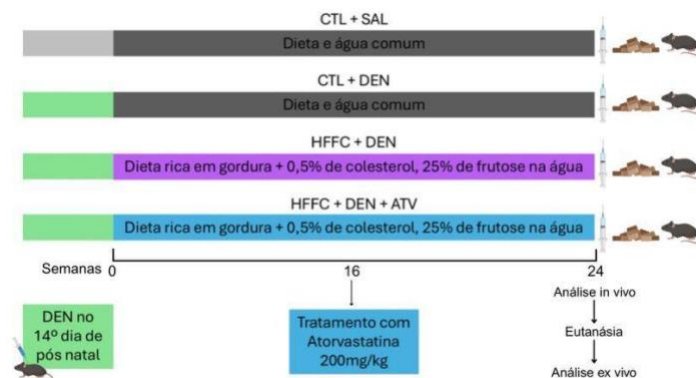
Trata-se de um estudo experimental com método de abordagem quantitativa e qualitativa. As palavras-chave são: Carcinoma hepatocelular. Colesterol. Doença hepática esteatótica associada à disfunção metabólica. Esteatohepatite associada à disfunção metabólica.

2. 1 Animais e protocolos experimentais

Foram utilizadas amostras de 29 camundongos C57BL/6 machos que receberam uma administração do carcinógeno dietilnitrosamina (DEN) em dose única de 25mg/kg no 14º dia de pós-natal e posteriormente iniciado uma dieta rica em gordura, frutose e adição de 0,5% de colesterol durante 24 semanas. Ao fim desse período, foi possível induzir o modelo de CHC nos camundongos. Nas últimas 8 semanas do protocolo foi administrado o tratamento com atorvastatina. Os grupos experimentais incluem: (i) controle Veículo (CTL + SAL, n=5) - camundongos em dieta controle sem indução farmacológica e tratados com veículo salina; (ii) controle DEN (CTL+DEN, n=8) - camundongos em dieta comum e administração de DEN; (iii) *high fat/fructose/cholesterol* + DEN (HFFC+DEN, n=8) - camundongos com dieta rica em

gordura e açúcar com adição de colesterol tratados com veículo e (iv) *high fat/fructose/cholesterol* + DEN + Atorvastatina (HFFC+DEN+ATV, n=8) - camundongos com dieta rica em gordura e açúcar com adição de colesterol tratados com atorvastatina (20 mg/kg). Ao final do protocolo, os animais foram submetidos a coleta de sangue, eutanásia e coleta de tecidos para posteriores análises. Todos os procedimentos experimentais foram previamente aprovados pelo comitê de ética no uso de animais (CEUA) - Licença: L-021/2022 - da Fundação Oswaldo Cruz.

Figura 3 - Desenho Experimental



Fonte: Criado pelo autor

2.2 Marcadores bioquímicos séricos e do tecido hepático

Para mensurar marcadores bioquímicos séricos, como colesterol total, colesterol-LDL, triglicerídeos, albumina e as atividades da enzima ALT foram utilizados kits comerciais (Bioclin, Belo Horizonte, MG, Brasil) e posteriormente analisados por espectrofotometria. Esses mesmos kits também foram usados para determinar os níveis de colesterol e triglicerídeos hepáticos.

2.3 Histopatologia

Os fígados foram fixados em solução de formalina tamponada com fosfato Millonig a pH 7,2, embebidos em parafina e corados com hematoxilina-eosina (HE) para avaliar a presença de esteatose e Tricrômio de Masson para avaliar a fibrose. Foram feitos pelo menos quatro cortes histológicos de seis animais por grupo.

2.4 Análise do tamanho e número de tumores

A análise do tamanho dos tumores foi realizada utilizando o software ImageJ, enquanto a análise do número de tumor foi realizada macroscopicamente de acordo com os números de tumores visíveis no momento da coleta das amostras.

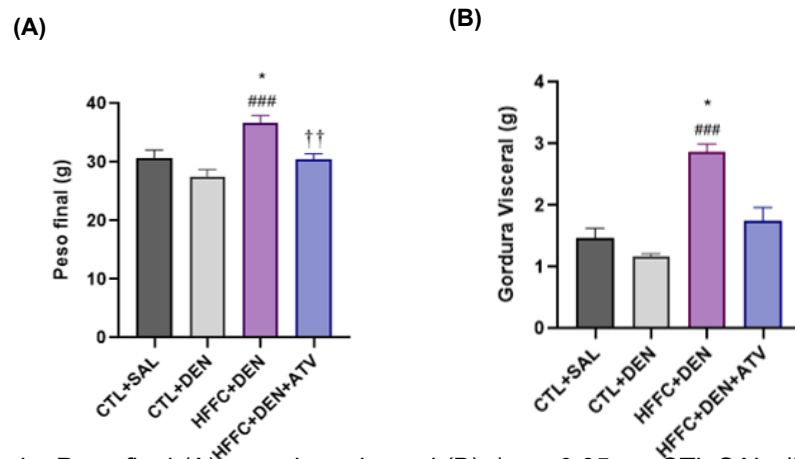
2.5 Análise estatística

As variáveis quantitativas são expressas em média $\pm$ erro padrão da média (EPM), enquanto as variáveis qualitativas são expressas em número (n) e porcentagem (%). A normalidade foi avaliada por meio do teste de Shapiro-Wilk e as comparações entre os grupos foram feitas por meio de análise de variância (ANOVA) de uma via seguida do teste post hoc de Tukey. Valores de $p < 0.05$ são considerados significativos. As análises foram feitas utilizando o GraphPad Prism versão 8.0.0 para Windows (GraphPad software, California, USA). Para as curvas de kaplan-meier, valores de $p < 0,05$ são considerados significativos.

3 RESULTADOS

Ao final do protocolo experimental, o grupo HFFC DEN demonstrou um aumento do peso corporal em comparação aos grupos CTLs, enquanto o grupo HFFC DEN ATV apresentou diminuição do peso corporal em comparação ao grupo HFFC DEN (Figura 4A). Já observando a gordura visceral, teve um aumento dos níveis do grupo HFFC DEN em comparação aos grupos CTLs (Figura 4B).

Figura 4 - Efeito do colesterol no peso corporal e gordura visceral dos camundongos

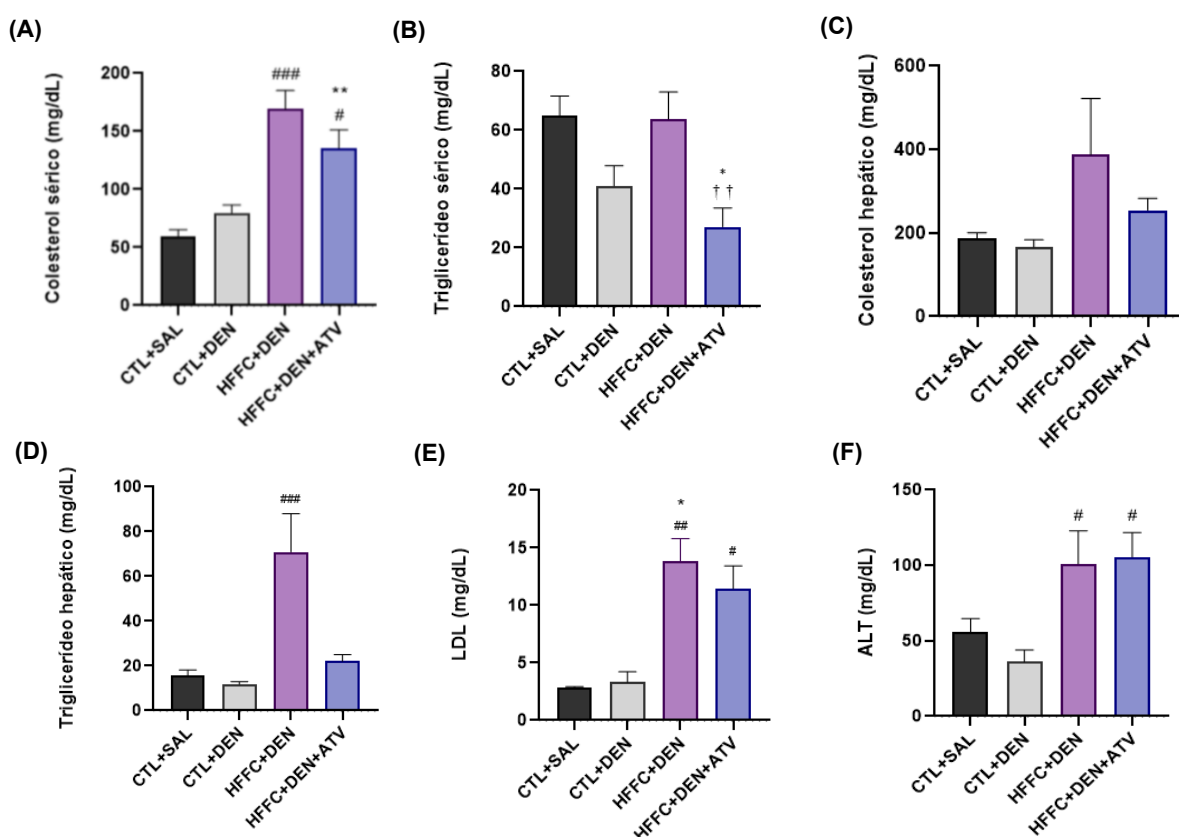


Legenda: Peso final (A) e gordura visceral (B). * $p < 0,05$ vs. CTL SAL; ### $p < 0,001$ vs. CTL DEN; †† $p < 0,01$ vs. HFFC DEN.

Em relação aos parâmetros bioquímicos, os níveis de colesterol sérico foram maiores nos grupos HFFC DEN e HFFC DEN ATV em comparação com os grupos CTLs (Figura 5A). Os níveis de triglicerídeos séricos no grupo HFFC DEN ATV foram significativamente menores do que os grupos CTL SAL e HFFC DEN (Figura 5B).

Enquanto os níveis de colesterol hepático não apresentaram diferença estatística (Figura 5C) e o triglicerídeo hepático teve um aumento significativo no HFFC DEN comparado com o grupo CTL DEN (Figura 5D). Os níveis de colesterol LDL foram maiores no grupo HFFC DEN e HFFC DEN ATV em relação ao CTL SAL, e também estava aumentado no grupo HFFC DEN comparado com o grupo CTL DEN (Figura 5E). E a atividade da enzima ALT foi maior nos grupos HFFC DEN e HFFC DEN ATV em comparação com o grupo CTL DEN (Figura 5F)

Figura 5 - Efeito do colesterol nos parâmetros bioquímicos dos camundongos



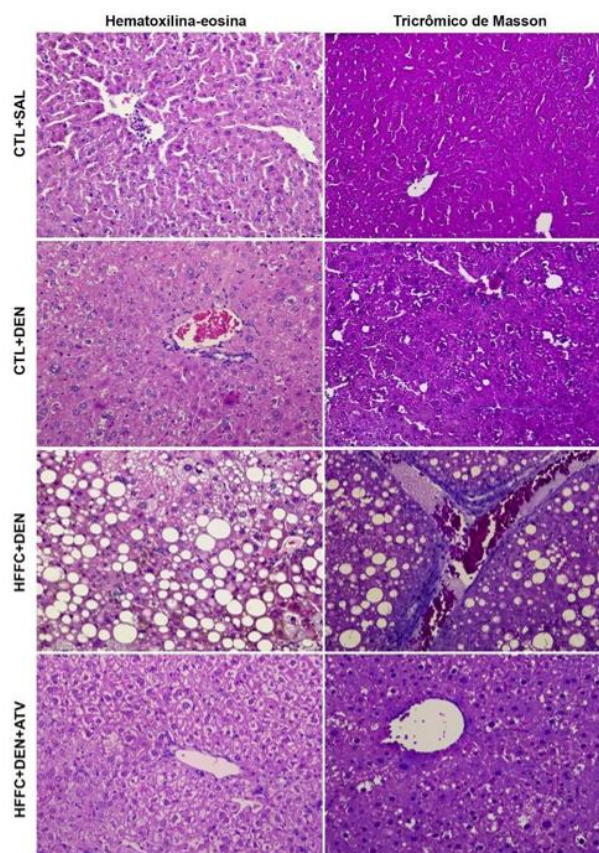
Legenda: Níveis séricos de colesterol (A), triglicerídeo (B), níveis hepáticos de colesterol (C) e triglicerídeo (D) e níveis de colesterol LDL (E) e alanina aminotransferase (F) de camundongos alimentados com dieta controle normocalórica administrado com salina (CTL SAL) ou carcinógeno dietilnitrosamina (CTL DEN), alimentados com dieta rica em gordura, frutose e 0,5% de colesterol e administrado com carcinógeno dietilnitrosamina (HFFC DEN), e alimentados com dieta rica em gordura, frutose e 0,5% de colesterol, administrado com carcinógeno dietilnitrosamina e tratados com atorvastatina (HFFC DEN ATV). * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001 vs. CTL SAL; # p < 0,05, ## p < 0,01, ### p < 0,001 vs. CTL DEN; † † p < 0,01 vs. HFFC DEN.

As amostras coradas com HE nas nossas análises histológicas demonstraram que grupo HFFC DEN teve um aumento significativo da esteatose macrovesicular quando comparado com o grupo CTL SAL e que a ATV levou a remissão da esteatose (Figuras 6 e 7A). O grupo HFFC DEN apresentou maior porcentagem na análise da

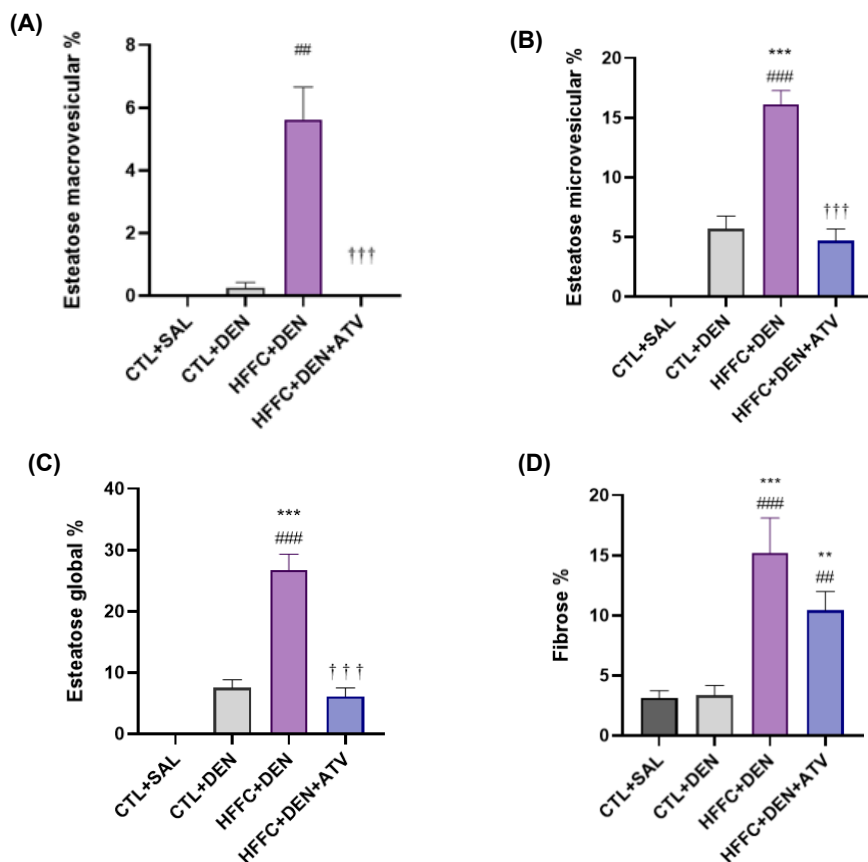
esteatose microvesicular e global em comparação aos grupos CTLs, enquanto os camundongos do grupo HFFC DEN ATV apresentaram diminuição dessas taxas em comparação com o HFFC DEN (Figuras 6, 7B e 7C).

A coloração com Tricrômico de Masson, para avaliar a fibrose, possibilitou que observássemos que os camundongos do grupo HFFC DEN e HFFC DEN ATV apresentaram maior depósito de fibras de colágeno quando comparado aos grupos CTLs (Figuras 6 e 7D).

Figura 6 - Efeito do colesterol nos parâmetros histopatológicos dos camundongos



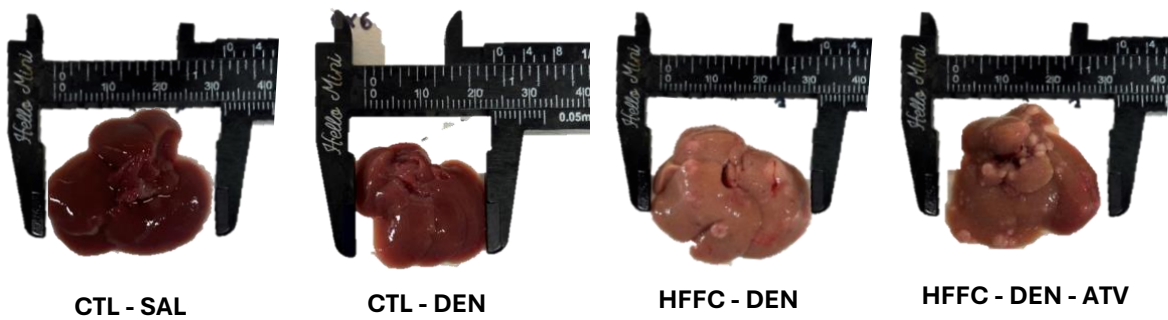
Legenda: Imagens representativas da análise histológica com coloração hematoxilina e eosina e coloração tricrômico de Masson de camundongos alimentados com dieta controle normocalórica administrado com salina (CTL SAL) ou carcinógeno dietilnitrosamina (CTL DEN), alimentados com dieta rica em gordura, frutose e 0,5% de colesterol e administrado com carcinógeno dietilnitrosamina (HFFC DEN), e alimentados com dieta rica em gordura, frutose e 0,5% de colesterol, administrado com carcinógeno dietilnitrosamina e tratados com atorvastatina (HFFC DEN ATV). n= 5-8 camundongos.

Figura 7 - Quantificação das esteatoses e da fibrose nos camundongos

Legenda: Quantificação da esteatose macrovesicular (A), esteatose microvesicular (B), esteatose global (C) e fibrose (D) de camundongos alimentados com dieta controle normocalórica administrado com salina (CTL SAL) ou carcinógeno dietilnitrosamina (CTL DEN), alimentados com dieta rica em gordura, frutose e 0,5% de colesterol e administrado com carcinógeno dietilnitrosamina (HFFC DEN), e alimentados com dieta rica em gordura, frutose e 0,5% de colesterol, administrado com carcinógeno dietilnitrosamina e tratados com atorvastatina (HFFC DEN ATV). ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. CTL SAL; ## $p < 0,001$, ### $p < 0,001$ vs. CTL DEN; ††† $p < 0,001$ vs. HFFC DEN. $n = 5-8$ camundongos.

Ao final de experimento, na semana 24, os fígados dos camundongos foram analisados. Observando macroscopicamente, a coloração dos fígados dos animais dos grupos HFFC, com ou sem tratamento, apresentou coloração amarelada quanto aos outros grupos, característica associada ao fígado gorduroso (Figura 8).

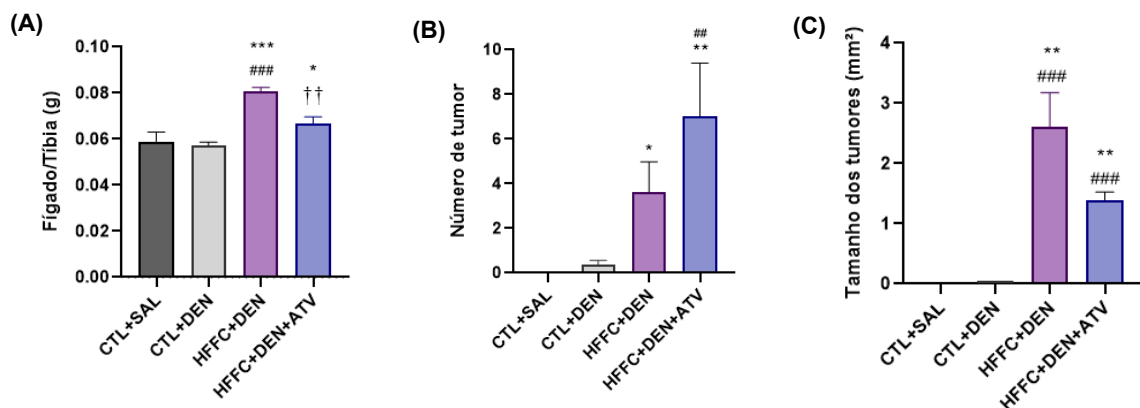
Figura 8 - Efeito do colesterol na tumorigênese dos camundongos



Legenda: Imagens representativas dos fígados dos camundongos alimentados com dieta controle normocalórica administrado com salina (CTL SAL) ou carcinógeno dietilnitrosamina (CTL DEN) (B), alimentados com dieta rica em gordura, frutose e 0,5% de colesterol e administrado com carcinógeno dietilnitrosamina (HFFC DEN) (C), e alimentados com dieta rica em gordura, frutose e 0,5% de colesterol, administrado com carcinógeno dietilnitrosamina e tratados com atorvastatina (HFFC DEN ATV). (D). n= 5-8 camundongos.

O peso do fígado dos camundongos do grupo HFFC DEN foi maior que nos grupos CTLs, enquanto o grupo tratado com atorvastatina demonstrou uma diminuição em relação ao HFFC DEN (Figura 9A). O número e tamanho do tumor foram avaliados de forma macroscópica. Foi observado que os animais do grupo HFFC DEN apresentou maior número de tumor em relação ao CTL SAL, enquanto o grupo HFFC DEN ATV apresentou maior número de tumor comparados com os dois grupos CTLs (Figura 9B). Já o tamanho dos tumores dos camundongos alimentados com dieta hiperlipídica e hiperglicídica foi maior do que nos grupos CTLs (Figura 9C).

Figura 9 - Avaliação do peso hepático e desenvolvimento tumoral



Legenda: Peso do fígado (A), número de tumor (B) e tamanho dos tumores (C) de camundongos alimentados com dieta controle normocalórica administrado com salina (CTL SAL) ou carcinógeno dietilnitrosamina (CTL DEN), alimentados com dieta rica em gordura, frutose e 0,5% de colesterol e administrado com carcinógeno dietilnitrosamina (HFFC DEN), e alimentados com dieta rica em gordura, frutose e 0,5% de colesterol, administrado com carcinógeno dietilnitrosamina e tratados com atorvastatina (HFFC DEN ATV). * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001 vs. CTL SAL; ## p < 0,01, ### p < 0,001 vs. CTL DEN; †† p < 0,01 vs. HFFC DEN. n= 5-8 camundongos.

4 DISCUSSÃO

Nesse estudo, tivemos como objetivo estabelecer um modelo de CHC associada à MASLD, e avaliar a influência do colesterol na tumorigênese.

Portanto, entender como a influência do colesterol no desenvolvimento de MASLD e progressão para o CHC é de extrema importância, uma vez que o câncer de fígado está cada vez mais presente e está associado a uma alta taxa de mortalidade (Singal; Lampertico; Nahon, 2020).

Além da dieta utilizada, foi adicionado o carcinógeno dietilnitrosamina (DEN), metabolizado no fígado por enzimas de citocromo P450, encontradas abundantemente nas células centrolobulares – células ao redor da veia central do lóbulo hepático. Esse metabolismo gera compostos reativos que causam danos celulares e mutações no DNA, explicando seu potencial carcinogênico (Tolba, R et al., 2015).

A utilização do DEN associado à dieta é fundamental em modelos experimentais de hepatocarcinogênese (Herck; Vonghia; Francque, 2017), pois, quando usado isoladamente, gera um baixo desenvolvimento de tumores, exigindo um período mais longo para que a doença progrida (Tolba, R et al., 2015).

Para avaliar o impacto da adição de colesterol no modelo de CHC associado à MASLD, foram comparados diversos parâmetros de quatro grupos experimentais: dois grupos controle, um grupo alimentado com dieta rica em gordura, frutose e colesterol associada à administração de DEN, e outro grupo submetido à mesma dieta, porém tratado com atorvastatina.

Inicialmente, foi avaliado o fenótipo dos camundongos. Foi observado que os camundongos que tiveram adição de colesterol na dieta apresentaram fenótipo alterado, obtendo maior peso corporal e maior depósito de gordura visceral. O alto índice de massa corporal e o acúmulo de tecido adiposo, são causas centrais da síndrome metabólica, que é um fator de risco para o desenvolvimento da MASLD e progressão para MASH (Swarup, Supreya et al., 2024).

Um estudo feito por Yan Wang et al., teve como intuito investigar os efeitos do MASH induzido por uma dieta rica em gordura na carcinogênese hepática induzida por carcinógeno. Após a análise dos animais, foi observado que a alimentação HFD induziu características típicas de MASH e uma incidência e multiplicidade bem maior de marcadores pré-cancerosos (Wang *et al.*, 2010).

Relacionado aos parâmetros bioquímicos, os níveis de colesterol sérico foram maiores nos grupos HFFC DEN e HFFC DEN ATV e o triglicerídeo hepático teve um aumento significativo no HFFC DEN comparado com o grupo CTL DEN.

Em um estudo de Mayuko Ichimura *et al.*, os níveis séricos de colesterol total e triglicerídeo hepático foram maiores nos grupos submetidos a dieta com adição de colesterol (Ichimura *et al.*, 2014). Portanto, tanto com os resultados desse estudo quanto os resultados de Ichimura, permite o entendimento e a análise de que o colesterol é uma molécula que altera os marcadores bioquímicos, quando adicionado a uma dieta, o que influencia a progressão da MASLD para MASH.

Os níveis de LDL não apresentaram diferença estatística significativa entre os grupos HFFC DEN e HFFC DEN ATV. O esperado seria que o tratamento com atorvastatina promovesse a inibição da enzima HMG-CoA redutase, impedindo a conversão da HMG-CoA em mevalonato e, consequentemente, reduzindo a síntese de lipídeos (McIver & Siddique, 2025). Essa inibição normalmente leva ao aumento da expressão de receptores de LDL, o que resulta na diminuição de seus níveis plasmáticos (Rosendo *et al.*, 2007).

Entretanto, esse efeito não foi observado nos resultados obtidos, o que pode ser explicado pelo fato de que, em modelos com lesão hepática induzida por dieta hiperlipídica e carcinógeno (HFFC + DEN), o fígado apresenta inflamação, estresse oxidativo e comprometimento metabólico que podem reduzir a sensibilidade à ação da atorvastatina, limitando sua capacidade de diminuir o LDL sérico (Malagó-Jr *et al.*, 2020).

Isso se dá porque a atorvastatina é metabolizada no fígado por enzimas do citocromo P450, principalmente a CYP3A4. A MASLD, ao causar inflamação e fibrose no fígado, pode comprometer a função dessas enzimas, o que diminui a capacidade de processamento do medicamento (Jamwal *et al.*, 2020).

Por fim, a enzima ALT é encontrada predominantemente no fígado e quando elevada indica dano hepático (Moriles; Zubair; Azer, 2024). O aumento da atividade da enzima ALT nos grupos HFFC DEN e HFFC DEN ATV em comparação com o grupo CTL DEN confirma a presença de dano hepático, que condiz com o quadro de inflamação característico da progressão da MASLD.

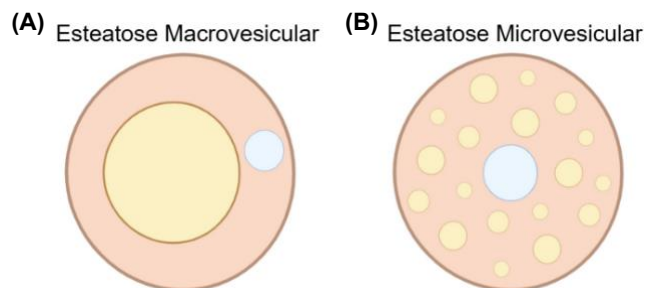
Dessa forma, os resultados bioquímicos obtidos neste estudo indicam que a sobrecarga lipídica intensifica o comprometimento hepático e metabólico,

comprometendo inclusive a resposta terapêutica a agentes hipolipemiantes, medicamentos usados para tratar dislipidemias, como a atorvastatina.

As histologias hepáticas foram analisadas com duas colorações diferentes. A hematoxilina-eosina - (HE) foi usada para avaliação da esteatose hepática, na qual a hematoxilina, de tom roxo, destaca os núcleos das células, enquanto a eosina, rosada, cora o citoplasma (Gurina & Simms, 2023). Já a Tricrômico de Masson foi aplicada para identificar a fibrose hepática, caracterizada pelos núcleos em roxo, o citoplasma em rosa e as fibras de colágeno em azul, facilitando a distinção entre as regiões normais e as áreas com acúmulo de tecido fibroso (Santos *et al.*, 2012).

A esteatose hepática pode ocorrer em dois padrões principais, sendo a macrovesicular e a microvesicular (Milroy, 2018). A esteatose macrovesicular apresenta um único vacúolo de gordura com o núcleo lateralizado (Figura 10A), visto, em sua maioria, em problemas hepáticos como a síndrome metabólica, enquanto a microvesicular é identificada pela presença de várias pequenas gotículas de gordura e o núcleo permanece centralizado (Figura 10B) – e está mais relacionada com disfunção mitocondrial.

Figura 10 - Imagens representativas das esteatoses macrovesicular e microvesicular



Fonte: Criado pelo autor

As análises histológicas coradas com H&E revelaram que os camundongos do grupo HFFC DEN apresentaram um aumento significativo da esteatose hepática, principalmente do tipo macrovesicular, quando comparados ao grupo CTL SAL. Além disso, observou-se um aumento na esteatose microvesicular e global, indicando um acúmulo expressivo de lipídios nos hepatócitos. Esses achados mostram que a adição de colesterol à dieta favorece o desenvolvimento da esteatose hepática, agravando o quadro de acúmulo lipídico e contribuindo para a progressão da doença.

Foi observado que os camundongos do grupo HFFC DEN ATV tiveram uma diminuição significativa das esteatoses macrovesicular, microvesicular e global. Dessa forma, a redução das diferentes formas de esteatose reflete uma regressão do dano

hepático, demonstrando um efeito protetor da atorvastatina sobre o fígado e sugerindo que seu uso pode auxiliar na prevenção da progressão da MASLD.

Observando a histologia corada com Masson, foi possível constatar que houve o desenvolvimento de fibrose no fígado dos camundongos do grupo HFFC DEN. O acúmulo contínuo de colesterol no fígado com inflamação e lesão hepática, leva ao processo de cicatrização (Song *et al.*, 2021).

No cenário da tumorigênese, o fígado do grupo HFFC DEN e HFFC DEN ATV e HFFC DEN ATV mostrou aparência mais amarelada, decorrente da esteatose e do acúmulo de TG e ácido graxo (Francque *et al.*, 2021), contrariamente aos fígados dos CTL que estão mais avermelhados. Além da tonalidade diferente, o peso do fígado também estava maior no grupo HFFC DEN. O peso do fígado foi normalizado pelo comprimento da tibia para corrigir variações no tamanho corporal dos animais e permitir comparações mais precisas entre os grupos.

A avaliação macroscópica também serviu para analisar o número e tamanho do tumor. O número e o tamanho dos tumores foram maiores nos camundongos dos dois grupos HFFC DEN quando comparado aos CTLs. O grupo HFFC DEN ATV apresentou uma tendência de aumento no número de tumor, isso se dá porque o tratamento com atorvastatina atuou na inibição de apenas uma via, sendo a via do mevalonato, o que, embora possa ter limitado parcialmente o crescimento tumoral, não foi suficiente para conter completamente a proliferação celular. As células cancerígenas possuem alta capacidade adaptativa e tendem a buscar mecanismos alternativos para garantir sua sobrevivência e continuidade do crescimento, ativando outras vias de sinalização que compensam a via inibida (Hanahan, 2022).

Dessa forma, pode-se compreender que a adição de colesterol contribuiu significativamente para a progressão da MASLD, favorecendo o ambiente propício ao desenvolvimento do CHC, tanto no número quanto na dimensão dos tumores.

5 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo demonstram que a adição de colesterol à dieta exerceu um papel essencial na progressão da MASLD.

A presença do colesterol na dieta hiperlipídica potencializou a dislipidemia, o acúmulo de gordura visceral, a esteatose hepática e o aumento do peso do fígado, o que propicia o desenvolvimento do CHC.

Observou-se um aumento tanto no número de tumores quanto no peso hepático, reforçando o papel do colesterol na promoção da tumorigênese no fígado.

O uso da atorvastatina contribuiu para a regressão da esteatose, sugerindo um efeito benéfico na progressão da MASLD.

REFERÊNCIAS

AMERICAN CANCER SOCIETY. Taxas de sobrevivência do câncer de fígado. American Cancer Society, 2022. Disponível em: <https://www.cancer.org/about-us/who-we-are/our-history.html>. Acesso em: 31 de Março de 2025.

BERGAMIN, Matheus. Doença hepática gordurosa não alcoólica - revisão de literatura. Brazilian journals, 2023. Disponível em: https://www.gov.br/conitec/pt-br/midias/consultas/relatorios/2022/20220520_relatorio_ddt_chc_cp_31.pdf. Acesso em: 14 de Março de 2025.

BRASIL. Carcinoma hepatocelular no adulto. Conitec, 2022. Disponível em: https://www.gov.br/conitec/pt-br/midias/consultas/relatorios/2022/20220520_relatorio_ddt_chc_cp_31.pdf. Acesso em: 13 de Março de 2025.

BRASIL. Fisiopatologia do câncer. Biblioteca virtual de saúde, 2011. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/abc_do_cancer.pdf. Acesso em: 23 de Outubro de 2025.

CHERUBINI, Alessandro et al. Sexual dimorphism of metabolic dysfunction associated steatotic liver disease. Science Direct, 2024. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1471491424001357>. Acesso em: 02 de Setembro de 2025.

CHIDAMBARANATHAN-REGHUPATY, Saranya, et al. Carcinoma hepatocelular (CHC): epidemiologia, etiologia e classificação molecular. PubMed, 2022. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8796122/#S27>. Acesso em: 19 de Maio de 2025.

DILEO, Eleonora et al. Impact of Sexual Dimorphism on Therapy Response in Patients with Metabolic Dysfunction-Associated Steatotic Liver Disease: From Conventional and Nutritional Approaches to Emerging Therapies. Pub Med, 2025. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11821005/>. Acesso em: 02 de Setembro de 2025.

FABBRINI, Elisa; SULLIVAN, Shelby; KLEIN, Samuel. Obesity and Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Biochemical, Metabolic and Clinical Implications. PubMed Central, 2013. Disponível em: [Obesity and Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Biochemical, Metabolic and Clinical Implications - PMC](#). Acesso em: 15 de Março de 2025.

FARIAS, Alberto & GONÇALVES, Luciana. Tratamento da DHGN / NASH. Sociedade Brasileira de Hepatologia, 2012. Disponível em: https://www.sbhepatologia.org.br/pdf/FASC_HEPATO_31_FINAL.pdf. Acesso em: 14 de Março de 2025.

FRANCQUE, Sven et al. Non-alcoholic fatty liver disease: a patient guideline. National Library of Medicine, 2021. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8514420/#sec6>. Acesso em: 03 de Novembro de 2025.

GARCIA-RUIZ, Carmen, et al. Colesterol mitocondrial e câncer. PubMed, 2022. Disponível em: GOMES, Marcos, et al. Carcinoma hepatocelular: epidemiologia, biologia, diagnóstico e terapias. Scielo, 2013. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/ramb/a/kRJmYGTXMPmRv5PSMvRd85m/>. Acesso em 13 de Março de 2025.

GURINA, Tatyana S. & SIMMS, Lary. Histology, Staining. National Library of Medicine, 2023. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557663/>. Acesso em: 30 de Outubro de 2025.

HANAHAN, Douglas. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. Cancer Discovery, 2022. Disponível em: <https://aacrjournals.org/cancerdiscovery/article/12/1/31/675608/Hallmarks-of-Cancer-New-DimensionsHallmarks-of->. Acesso em: 04 de Novembro de 2025.

HORN, Christian, et al. Role of cholesterol-associated steatohepatitis in the development of NASH. PubMed central, 2021. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8710790/>. Acesso em: 24 de Março de 2025.

ICHIMURA, Mayuko et al. High-fat and high-cholesterol diet rapidly induces non-alcoholic steatohepatitis with advanced fibrosis in Sprague–Dawley rats. Wiley on-line library, 2014. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/hepr.12358>. Acesso em: 23 de Outubro de 2025.

JAMWAL, Rohitash et al. Nonalcoholic fatty liver disease and diabetes is associated with decreased CYP3A4 protein expression and activity in human liver. Pub Med, 2020. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7065849/>. Acesso em: 28 de Outubro de 2025.

LUDKE, M. C. M. M.; LÓPEZ, J. Colesterol e Composição dos ácidos graxos nas dietas para humanos e na carcaça suína. Ciência Rural, v. 29, n. 1, p.181-187, 1999. Disponível em: [SciELO Brasil - Colesterol e composição dos ácidos graxos nas dietas para humanos e na carcaça suína Colesterol e composição dos ácidos graxos nas dietas para humanos e na carcaça suína](#). Acesso em: 14 de Março de 2025.

MAGALHÃES, Cristiane, et al. Perfil clínico e epidemiológico do carcinoma hepatocelular no Brasil. Open Journal Systems, 2023. Disponível em: <https://ojs.focopublicacoes.com.br/foco/article/download/1388/1010#:~:text=No%2520Brasil%252C%2520a%2520incidência%2520de,%2525%2520por%2520100.000%2520pessoas%2520Fano>. Acesso em: 20 de Março de 2025.

MAGALÓ-JR, Wilson. Efeitos nutricionais e mecanismos bioquímicos na doença hepática gordurosa não alcoólica. Revista da associação brasileira de nutrição, 2021, Disponível em: <https://www.rasbran.com.br/rasbran/article/download/1436/363/6259>. Acesso em: 14 de Março de 2025.

MARANHÃO, Raul, et al. Lipoproteína: Estrutura, metabolismo, fisiopatologia e implicações clínicas. Scielo, 2013. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/abc/a/wzH4SbjQ3yrRfvRSPvgMd8t/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em: 14 de Março de 2025.

MCLAVER, Lindsey & SIDDIQUE, Momin. Atorvastatin. National Library of Medicine, 2025. Disponível em: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK430779/#:~:text=Atorvastatin%20also%20increases%20the%20number,lipoprotein%20\(IDL%2DC\).&text=Absorption:%20Atorvastatin%20is%20rapidly%20absorbed,distribution%20of%20about%20380%20liters.&text=Excretion:%20Atorvastatin%20and%20its%20metabolites,about%2020%20to%2030%20hours](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK430779/#:~:text=Atorvastatin%20also%20increases%20the%20number,lipoprotein%20(IDL%2DC).&text=Absorption:%20Atorvastatin%20is%20rapidly%20absorbed,distribution%20of%20about%20380%20liters.&text=Excretion:%20Atorvastatin%20and%20its%20metabolites,about%2020%20to%2030%20hours). Acesso em: 27 de Outubro de 2025.

MILROY, Christopher M. Fatty liver and the forenci pathologist. Pub Med, 2018. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6490134/>. Acesso em: 30 de Outubro de 2025.

MORILES, Kevin E.; ZUBAIR, Maomé; AZER, Samy A. Alanine Aminostransferase (ALT) test. National Library of Medicine, 2024. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK559278/>. Acesso em: 28 de Outubro de 2025.

NELSON, David L.; COX, Michael M.; HOSKINS, Aaron A. Princípios de bioquímica de Lehninger. V.1. 8. ed. Porto Alegre: ArtMed, 2022. E-book. p.i. ISBN 9786558820703. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/reader/books/9786558820703/>. Acesso em: 15 mar. 2025.

OISETH, Stanley,; JONES, Lindsay,; MAZA Evelin. Metabolismo do Colesterol. Lecturio, 2025. Disponível em: <https://www.lecturio.com/pt/concepts/metabolismo-do-colesterol/>. Acesso em: 20 de Agosto de 2025.

OLIVEIRA, Arielécio, et al. Os efeitos dos nutracêuticos no tratamento da doença hepática gordurosa não alcoólica: uma revisão integrativa. Research Society and Development, 2020. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/download/5866/5250/28869#:~:text=A%20doença%20hepática%20gordurosa%20não,e%20perda%20de%20peso%20gradual..> Acesso em: 21 de Março de 2025.

POL, Stanislas. Carcinoma hepatocelular (CHC). PubMed, 2024. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11892391/>. Acesso em: 19 de Maio de 2025.

ROOYEN, Derrick et al. Hepatic free cholesterol accumulates in obese, diabetic mice and causes non-alcoholic steatohepatitis. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3186822/>. Acesso em: 05 de Outubro de 2025.

ROSENDO, Alexandre et al. Farmacogenética e efeito antiinflamatório dos inibidores da HMG-CoA redutase. Scielo, 2007. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/abem/a/G9MQ3RWtLSXz9YRLWK37bWg/?format=html&lang=pt>. Acesso em: 28 de Outubro de 2025.

SANTOS, Bruno et al. Verhöeff & Tricrómio de Masson: Aplicações e Importância de um Protocolo Combinado. Research, 2012. Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/Bruno-Santos-45/publication/251875689_Verhoeff_Tricromio_de_Masson_Aplicacoes_e_Importancia_de_um_Protocolo_Combinado/links/00b7d51f1b8f7c4541000000/Verhoeff-Tricromio-de-Masson-Aplicacoes-e-Importancia-de-um-Protocolo-Combinado.pdf. Acesso em: 30 de Outubro de 2025.

SCHLAGETER, Manuel, et al. Histopathology of hepatocellular carcinoma. PubMed Central, 2014. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4239483/>. Acesso em: 14 de Março de 2025.

SINGAL, Amit; LAMPERTICO, Pietro; NAHON, Pierre. Epidemiology and surveillance for hepatocellular carcinoma: New trends. PubMed Central, 2021. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6986771/>. Acesso em: 13 de Março de 2025.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE HEPATOLOGIA. Gordura hepática gordura não alcoólica. Sociedade Brasileira de Hepatologia, 2012. Disponível em: https://www.sbhepatologia.org.br/pdf/revista_monotematico_hepato.pdf. Acesso em: 15 de Março de 2025.

SONG, Yongfeng et al. Cholesterol-induced toxicity: An integrated view of the role of cholesterol in multiple diseases. Science direct, 2021. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1550413121004204>. Acesso em: 03 de Novembro de 2025.

TOLBA, Rene. Diethylnitrosamine (DEN)-induced carcinogenic liver injury in mice. Sage journals, 2015. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0023677215570086>. Acesso em: 23 de Outubro de 2025.

TSUCHIDA, Takuma et al. A simple diet-and chemical-induced murine NASH model with rápido progression of steatohepatitis, fibrosis and liver cancer. PubMed Central, 2019. Disponível em: A Simple Diet- and Chemical-Induced Murine NASH Model with Rapid Progression of Steatohepatitis, Fibrosis and Liver Cancer - PMC. Acesso em: 17 de Março de 2025.

WANG, Yan et al. Nonalcoholic steatohepatitis induced by a high-fat diet promotes diethylnitrosamine initiated early hepatocarcinogenesis in rats. PubMed Central, 2010. Disponível em: [A esteatohepatite não alcoólica induzida por uma dieta rica em gordura promove a dietilnitrosamina iniciada pela hepatocarcinogênese precoce em ratos - PMC](#). Acesso em: 17 de Março de 2025.