

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

EXPRESSÃO DAS CONEXINAS 26, 32, 43 E PANEXINA 1 EM
DIFERENTES ETAPAS DA HEPATOCARCINOGENESE QUÍMICA
ASSOCIADA À FIBROSE EM CAMUNDONGOS C3H/HEJ.

Luis Artur Sensulini

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências,
Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de
Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia
Geral e Aplicada, Área de concentração 2.01.00.00-0.

Aluno: *Luis Artur Sensulini***Orientador:** *Prof. Adj. Luís Fernando Barbisan***Coorientador:** *Prof. Dr. Bruno Cogliati***Colaborador:** *Dr. Guilherme Ribeiro Romualdo*

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

EXPRESSÃO DAS CONEXINAS 26, 32, 43 E PANEXINA 1 EM
DIFERENTES ETAPAS DA HEPATOCARCINOGENESE
QUÍMICA ASSOCIADA À FIBROSE EM CAMUNDONGOS
C3H/HEJ.

Luis Artur Sensulini

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências,
Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título
de Mestre no Programa de Pós-Graduação em
Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração
2.01.00.00-0.

Aluno: *Luis Artur Sensulini*

Orientador: *Prof. Adj. Luís Fernando Barbisan*

Coorientador: *Prof. Dr. Bruno Cogliati*

Colaborador: *Dr. Guilherme Ribeiro Romualdo*

**BOTUCATU – SP
2022**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Sensulini, Luis Artur.

Expressão das Conexinas 26, 32, 43 e Panexina 1 em diferentes etapas da hepatocarcinogênese química associada à fibrose em camundongos C3H/HeJ / Luis Artur Sensulini. - Botucatu, 2022

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Luis Fernando Barbisan

Coorientador: Bruno Cogliati

Capes: 20100000

1. Fígado - Câncer. 2. Conexinas. 3. Carcinoma hepatocelular. 4. Homeostase. 5. Carcinogênese.

Palavras-chave: Conexina 26; Conexina 32; Conexina 43; Hepatocarcinogênese induzida quimicamente; Panexina 1.

Agradecimentos

Agradeço, dessa forma:

Primeiramente à toda a minha família, especialmente a minha mãe Andréia e ao meu pai Elias por todo o apoio necessário nesta etapa e nas demais anteriores. Todos os processos foram necessários e importantes para o meu crescimento pessoal e profissional. Uma das maiores motivações para que eu cultivasse a vontade de criar minha vida fora de casa, foi a trajetória e dificuldades que vocês vivenciaram em suas vidas, onde, apesar de tudo, nunca desistiram e sempre me motivaram em meus momentos de raiva ou tristeza. Graças a vocês, tive oportunidades e uma trajetória de vida diferente da que vocês trilharam quando tinham a minha idade e sempre terei orgulho e felicidade do que me proporcionaram e me apoiaram. Tenho certeza de que ambos me conhecem, talvez, melhor do que eu mesmo e sabem o quanto me cobro em relação a sucesso e independência pessoal, além do quanto sou duro com diversas situações que são insignificantes frente aos planos de Deus. Tenho muito orgulho de vocês e espero ainda poder compartilhar muitas alegrias conjuntas.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luis Fernando Barbisan pela oportunidade, ensinamentos, paciência e voto de confiança em diversas situações.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Bruno Cogliati igualmente pela oportunidade, direcionamentos, recepção em São Paulo e apoio para a condução deste projeto.

Ao colaborador Dr. Thiago Aloia pelos ensinamentos em relação as técnicas, equipamentos compartilhados e companheirismo, onde, mesmo chegando em um local completamente novo e diferente à minha realidade, fiz amigos, aprendi e tive a oportunidade de vivenciar a rotina de um dos maiores hospitais do Brasil e da América Latina.

A todos os companheiros de laboratório por todo o apoio, principalmente Guilherme, Gabriel, Sara e Luis Sarmiento, especialmente os dois primeiros, os quais a experiência e ensinamentos na área foram vitais para que cada linha deste trabalho fosse feita no campo e escrita neste documento. Vocês me acolheram mesmo eu, naquele momento, não possuindo conhecimento na área, questionando e vivenciando conhecimentos e técnicas novas para o meu dia a dia. Além disso, passamos todos por momentos difíceis onde, em plena pandemia, nenhum de nós pode passar longos períodos com suas famílias ou desfrutar de grandes momentos de lazer. No entanto, a todo momento, mantivemos nossas obrigações e nunca cogitamos suspender um biotério, trabalhos, e/ou deixar o ritmo do companheiro cair. Vocês me respeitaram durante todo este longo período de convivência, e eu os admiro pelo empenho,

entrega e alma que colocam todo dia em seus respectivos trabalhos e rotina. Saibam que mesmo que tenhamos estilos de vida diferentes, cada palavra e ação de vocês foi vital para que eu completasse este longo processo de dois anos e meio.

À instituição Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências e Programa de Pós-Graduação Biologia Geral e Aplicada por toda estrutura oferecida para que este projeto fosse desenvolvido.

Às agências de fomento, CAPES (88887.509944/2020-00 – Cota empréstimo) e (88887.600742/2021-00). Além de FAPESP (18/10953-9) através do meu co-orientador, por todo suporte das etapas essenciais para a realização dessa dissertação.

Por fim, a todos os amigos e funcionários que colaboraram direta ou indiretamente para que este trabalho fosse possível.

“Vim, vi, venci”

Gaius Julius Caesar

Lista de abreviaturas:

ALT- Alanina aminotransferase

AST- Aspartato aminotransferase

CCl₄- Tetracloreto de carbono

CEHs- Células estreladas hepáticas

CHC- Carcinoma hepatocelular

Cxs- Conexinas

DAMPs- Padrões moleculares associados a dano

DEN/NDEA- Dietilnitrosamina/N-nitrosodietilamina

DHGNA- Doença hepática gordurosa não-alcoólica

EHA- Esteatohepatite alcoólica

EHNA- Esteatohepatite não-alcoólica

ERNs- Espécies reativas de nitrogênio

EROs - Espécies reativas de oxigênio

FHAs- Focos de hepatócitos alterados

HE- Hematoxilina-eosina

IL- Interleucina

MEC- Matriz extracelular

Panx 1/2/3- Panexina 1, 2 ou 3

PBS- Solução tampão fosfato

TNF- α - Sigla do termo em inglês para fator de necrose tumoral alfa

VHB- Vírus da hepatite B

VHC- Vírus da hepatite C

Resumo

O câncer de fígado é a quarta maior causa de mortes relacionadas ao câncer com crescente aumento de incidência e mortalidade no mundo nas últimas décadas, tendo como principal representante o carcinoma hepatocelular (CHC). Um dos mecanismos de controle da homeostasia celular é a comunicação intercelular realizada por canais específicos que inclui as famílias de proteínas das conexinas (Cxs) e panexinas (Panxs). No fígado, a Cx32 e Cx26 são as principais formadoras de junções GAP hepáticas, além das células endoteliais sinusoidais que expressam, preferencialmente, a Cx43. Estudos demonstraram que a Cx26 e Cx32 tem expressão elevada no fígado normal e até mesmo em lesões pré-neoplásicas, mas baixa expressão no CHC. Outros estudos demonstraram correlação positiva entre a hiperexpressão da Panx1 com pior prognóstico e risco maior de ocorrência de metástase nos pacientes. Assim, no presente trabalho avaliou-se o comportamento da expressão das Cxs 26, 32 e Panx1 ao longo do processo de hepatocarcinogênese associada à fibrose em camundongos C3H/HEJ, em lesões pré-neoplásicas e neoplasias pela técnica de imunofluorescência. Dessa maneira, camundongos C3H/HEJ, com 14 dias de idade, receberam injeção intraperitoneal (i.p) de 25 mg/kg peso corpóreo (p.c.) de dietilnitrosamina (DEN), ou seu veículo (NaCl 0,9%) no caso do grupo controle. A partir da 8ª semana de vida, por um período de 8 a 29 (grupo interrupção) ou 8 a 46 semanas (grupo contínuo), os camundongos receberam 3 doses i.p semanais de tetracloreto de carbono (CCl₄, solução a 10% em doses escalonadas de 0,25 a 1,50 µL/g peso corpóreo, sendo esta última mantida até o final das aplicações). Nas semanas 17, 30 e 47, os animais foram eutanasiados. Amostras de soro e de fígado (com ou sem tumores) foram coletadas para análise sérica de alanina aminotransferase (ALT) ou para histologia/immunoistoquímica e imunofluorescência. A incidência e multiplicidade de lesões hepáticas pré-neoplásicas e neoplásicas foram comparadas nos diferentes pontos de eutanásia. Em geral, os resultados demonstraram que a continuidade de aplicações de CCl₄ da 30-46ª semana não influenciaram no tamanho e incidência das lesões macroscópicas ou de adenomas e CHC quando comparado com o grupo interrupção, embora com níveis séricos de ALT maiores no grupo contínuo. Os níveis de proliferação celular Ki-67+, nos adenomas e CHC, foram similares nos grupos de interrupção e contínuo de aplicações de CCl₄. A deposição de colágeno nos grupos tratados com CCl₄ foi mais intensa no grupo interrompido. Além disso, a expressão da Cx26 e Cx32 foi menor nas lesões hepáticas pre-neoplásicas e neoplásicas em comparação com tecido hepático normal (grupo controle) e no tecido adjacente (grupo DEN/CCl₄), com correlação negativa de ambas Cxs com os níveis de Ki-67+. Não houve diferença significativa de expressão de Panx1

entre os grupos tratados ou controle, nos diferentes períodos de eutanásia ou evolução da hepatocarcinogênese. Em conclusão, os resultados indicam o modelo animal utilizado pode ser reproduzido com menor número de aplicações de CCl₄ e que a expressão das Cxs 26 e 32 são marcadores precoces do processo de carcinogênese associado a fibrose. As próximas etapas, consistem na realização e análise da expressão gênica das Cxs e Panx1, em amostras de RNA extraídas a partir de microdissecção a laser já realizada de áreas de FHA, adenomas e CHC e tecido hepático normal, além da quantificação de imunofluorescência da Cx43.

Palavras-chave: Conexinas 26, 32 e 43; Panexina 1; Hepatocarcinogênese induzida quimicamente;

Abstract

Liver cancer is the fourth leading cause of cancer-related deaths with increasing incidence and mortality worldwide in recent decades, with hepatocellular carcinoma (HCC) as the main representative. One of the mechanisms controlling cellular homeostasis is intercellular communication performed by specific channels that include the protein families of the connexins (Cxs) and pannexins (Panxs). In the liver, Cx32 and Cx26 are the main formers of hepatic GAP junctions, in addition to sinusoidal endothelial cells that preferentially express Cx43. Studies have shown that Cx26 and Cx32 have high expression in normal liver and even in preneoplastic lesions, but low expression in HCC. Other studies have shown a positive correlation between Panx1 overexpression with worse prognosis and higher risk of metastasis occurrence in patients. Thus, in the present study we evaluated the behavior of the expression of Cxs 26, 32 and Panx1 throughout the process of hepatocarcinogenesis associated with fibrosis in C3H/HEJ mice, in preneoplastic lesions and neoplasms by immunofluorescence technique. Thus, 14-day-old C3H/HEJ mice received intraperitoneal (i.p.) injection of 25 mg/kg body weight (b.w.) of diethylnitrosamine (DEN), or its vehicle (NaCl 0.9%) in the control group. From the 8th week of life, for a period of 8 to 29 (interruption group) or 8 to 46 weeks (continuous group), the mice received 3 weekly i.p doses of carbon tetrachloride (CCl₄, 10% solution in doses ranging from 0.25 to 1.50 μ L/g body weight, the latter maintained until the end of the applications). At weeks 17, 30 and 47, the animals were euthanized. Serum and liver samples (with or without tumors) were collected for serum alanine aminotransferase (ALT) analysis or for histology/immunohistochemistry and immunofluorescence. The incidence and multiplicity of preneoplastic and neoplastic liver lesions were compared at the different euthanasia points. Overall, the results showed that continued CCl₄ applications from week 30-46 did not influence the size and incidence of macroscopic lesions or of adenomas and HCC when compared to the interruption group, although with higher serum ALT levels in the continuous group. The levels of Ki-67+ cell proliferation in adenomas and HCC were similar in the interruption and continuous CCl₄ application groups. Collagen deposition in the CCl₄-treated groups was more intense in the interrupted group. In addition, the expression of Cx26 and Cx32 was lower in pre-neoplastic and neoplastic liver lesions compared with normal liver tissue (control group) and in adjacent tissue (DEN/CCl₄ group), with negative correlation of both Cxs with Ki-67+ levels. There was no significant difference in Panx1 expression between the treated or control groups at the different periods of euthanasia or evolution of hepatocarcinogenesis. In conclusion, the results indicate that the animal model used can be reproduced with fewer applications of CCl₄ and that the expression of Cxs 26 and 32 are early

markers of the process of carcinogenesis associated with fibrosis. The next steps, consist of performing and analyzing the gene expression of Cxs and Panx1, in RNA samples extracted from laser microdissection already performed from areas of FHA, adenomas and HCC and normal liver tissue, in addition to the immunofluorescence quantification of Cx43.

Keywords: Connexins 26, 32 and 43; Chemically induced hepatocarcinogenesis; Pannexin 1.

Sumário

1. Revisão de literatura..	1
1.1 Epidemiologia e etiologia do carcinoma hepatocelular.....	1
1.2 Patologia do Carcinoma Hepatocelular.....	5
1.3 Modelos Experimentais.....	9
1.4 Comunicação (inter)celular na carcinogênese hepática.....	13
1.5 Justificativa e Objetivo.....	19
2. Metodologia.....	20
2.1 Delineamento experimental	20
2.2 Análises histológicas	22
2.2.1 Identificação de lesões pré-neoplásicas e neoplásicas.....	22
2.2.2 Imunofluorescência	22
2.2.3. Imunohistoquímica para Ki-67 e Sirius Red.....	23
2.2.4 Microdissecção a laser.....	24
2.3 RT-qPCR (em andamento).....	25
2.3.1 Extração de RNA e Transcrição Reversa.....	25
2.3.2 Reação de PCR em Tempo Real.....	25
2.4 Análise sérica de Alanina amino transferase (ALT)	26
2.5 Análises estatísticas	26
3. Resultados e discussão considerando os diferentes períodos de eutanásia	26
3.1 Dados gerais da primeira eutanásia (17 semanas).....	26
3.1.1 Histopatologia de lesões pré-neoplásicas e neoplásicas na primeira eutanásia (17 semanas)	28
3.2 Dados gerais da segunda eutanásia (30 semanas).....	29
3.2.1 Lesões neoplásicas na segunda eutanásia (30 semanas).....	30
3.3 Dados gerais da última eutanásia DEN+CCl₄ interrompido (47 semanas).....	31

3.3.1 Lesões neoplásicas no grupo DEN+CCl ₄ interrompido.....	32
3.3.2 Dados gerais da última eutanásia DEN+CCl ₄ contínuo (47 semanas)	33
3.3.3 Lesões neoplásicas no grupo DEN+CCl ₄ contínuo.....	34
3.4 Comparações dados lesões nodulares macroscópicas grupos DEN+CCl ₄ (todos os períodos)	35
3.4.1 Comparações dados de peso corpóreo grupos DEN+CCl ₄ (todos os períodos)...	36
3.4.2 Comparativo de lesões neoplásicas grupo DEN+CCl ₄ (todos os períodos).....	37
3.5 Análise suplementar de pulmão nas eutanásias da semana 47.....	38
3.6 Resultados e discussão ALT	39
3.7. Resultados e discussão imunohistoquímica Ki-67 e Picro Sirius	40
4. Resultados e discussão imunofluorescência Conexinas e Panxina 1	43
5. Resultados, discussão e correlação das Cxs 26 e 32 e Panx1 com os níveis de Ki-67	47
6. Conclusão e Próximas etapas	49
7. Referências	50
8. Anexo I.....	64

1. Revisão de literatura

1.1 Epidemiologia e etiologia do carcinoma hepatocelular

O câncer de fígado é a quarta maior causa de mortes relacionadas ao câncer e o sexto em incidência, configurando como uma das neoplasias malignas com maior número de incidência e mortalidade no mundo (GLOBOCAN, 2020). De maneira global, o número de casos de câncer de fígado está aumentando, sendo que poderá ser atingida a marca de 1 milhão de novos casos até 2030 (TORRE et al., 2015). Considerando ambos os sexos e todas as idades, as maiores taxas de incidência e mortalidade relacionadas ao câncer de fígado são, em grande parte, encontradas em países asiáticos e africanos (Figs. 1 e 2) (GLOBOCAN, 2020). Considerando o período de 5 anos após o diagnóstico, o câncer de fígado tem uma taxa de sobrevivência de apenas 18%, ficando atrás apenas do câncer pancreático em termos de letalidade (CRAIG et al., 2020).

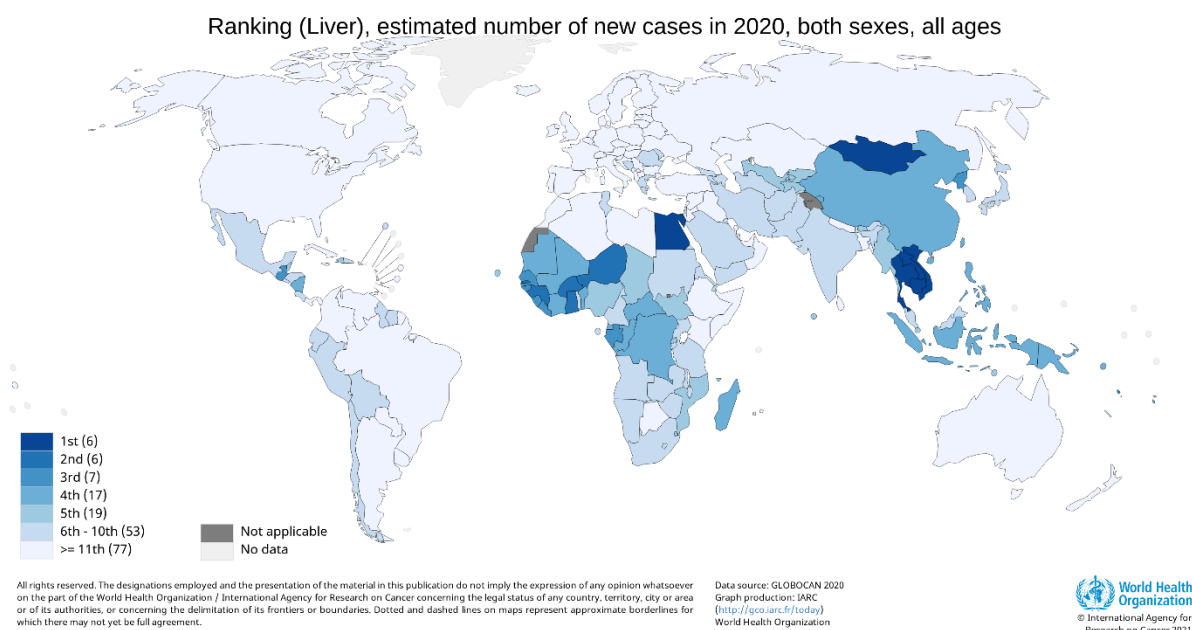


Fig. 1: Número estimado de novos casos de câncer de fígado em 2020, considerando ambos os sexos e todas as idades. FONTE: GLOBOCAN 2020.

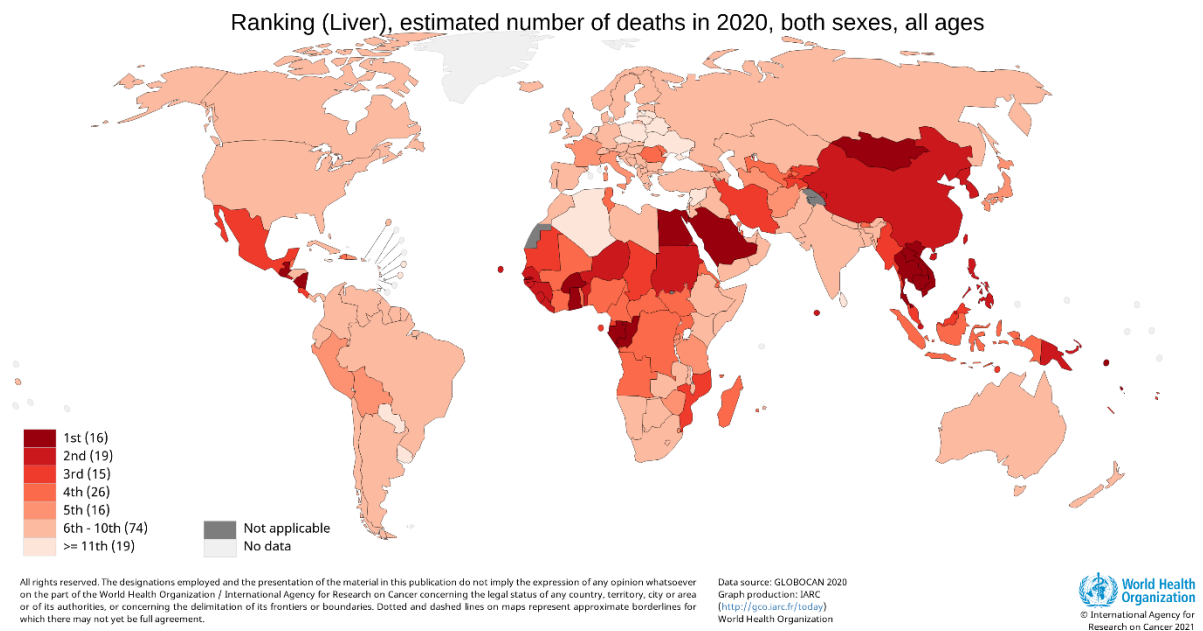


Fig. 2: Número estimado de mortes relacionadas ao câncer de fígado em 2020, considerando ambos os sexos e todas as idades. FONTE: GLOBOCAN 2020.

Uma vez que possui formas heterogêneas, o câncer hepático abrange diversos grupos de neoplasias malignas com características histológicas distintas e prognósticos variáveis (TORRE et al., 2015). Os principais tipos relatados são o carcinoma hepatocelular (CHC), colangiocarcinoma, carcinoma fibrolamelar e o hepatoblastoma (LOZANO et al., 2012). O câncer primário mais frequente de fígado tem como seu principal representante o CHC, o qual corresponde a grande maioria dos casos incidentes e de mortes (>90%) (YU; YUAN; LU, 2008). Em termos de idade, o CHC é raro em pessoas com menos de 40 anos de idade, tendo sua maior probabilidade de ocorrência atrelada ao avanço da idade dos indivíduos (ZHANG; EL-SERAG; THRIFT, 2020).

Em relação às variações epidemiológicas associadas ao CHC, destacam-se as diferenças de incidência entre gêneros, além das variações entre regiões geográficas, sendo esta neoplasia mais frequente em homens e em países africanos e asiáticos (EL-SERAG; RUDOLPH, 2007; TORRE et al., 2015).

No intervalo compreendendo os anos de 1978 e 2012, a incidência do CHC decaiu em países asiáticos e na Itália, mas aumentou na Índia, Américas, Oceania e em alguns países europeus (VALERY et al., 2018). No entanto, em países como os Estados Unidos, nos anos mais recentes, ocorreu uma diminuição de incidência de CHC devido a um platô ou diminuição da

ocorrência em determinados grupos populacionais do país, demonstrando uma variação do comportamento da doença de acordo com o local e subgrupo populacional (PETRICK et al., 2020; ZHANG; EL-SERAG; THRIFT, 2020). Apesar disso, um fato comum ao CHC em todas as regiões do mundo é o mau prognóstico (GOLABI et al., 2017).

Devido à ausência de sintomas específicos nos estágios iniciais e a falta de marcadores para diagnóstico precoce, a maioria dos pacientes que possuem CHC são diagnosticados já em estágio avançado, possuindo prognóstico ruim e menor sobrevida (a taxa de mortalidade comparada a incidência é de 0.95) (KOBAYASHI et al., 2017). Em termos de tratamento, mesmo o transplante de fígado sendo considerado o mais eficiente para o CHC (HÜBSCHER, 2011), a falta de doadores limita a aplicação desta terapêutica. Tratamentos como ressecção cirúrgica e o próprio transplante de fígado associado ou não as técnicas de ablação, têm seu sucesso atrelado quando aplicados em estágios iniciais do CHC (RINGELHAN et al., 2018). Mesmo com os quimioterápicos Sorafenibe e Regorafenibe, mais recentemente aplicados ao tratamento do CHC, o resultado terapêutico continua insatisfatório, sendo que a média de sobrevivência após o diagnóstico é de 6-9 meses nos casos de estágio inicial e 1-2 meses em estágio avançado (REN et al., 2020). O sorafenibe têm sua taxa de eficácia diminuída à medida que o CHC progride, sendo que, em certo momento, o tumor acaba por adquirir completa resistência ao medicamento (FAN; WEI; XU, 2020). Além disso, a falha em identificar pacientes com alto risco de metástase e recorrência tem resultado em um prognóstico insatisfatório. Estimativas robustas sugerem que aproximadamente 70% dos pacientes com CHC possuem risco de recidiva dentro de 5 anos após a cirurgia (VILLANUEVA et al., 2011). Sendo assim, é importante que sejam exploradas novas ferramentas de diagnóstico, estratégias de terapia e marcadores de prognóstico para essa neoplasia primária (REN et al., 2020).

Quando se fala a respeito de fatores de risco, cerca de 70 a 90% dos pacientes com CHC apresentam contexto hepático de fibrose e cirrose, frequentemente associado às infecções crônicas pelo vírus das Hepatites B e C (VHB e VHC), doença hepática gordurosa não-alcoólica (DHGNA) ou a sua progressão a esteatohepatite não-alcoólica (EHNA) (EL-SERAG; RUDOLPH, 2007; POON et al., 2009). O VHB induz uma condição necroinflamatória crônica que leva a mutação nas células hepáticas (IARC, 2008), enquanto o VHC promove a tumorigênese através de dano repetitivo, regeneração e fibrose (S DE MITRI et al., 1995). Outras condições como resistência à insulina, alterações nos níveis de gordura no sangue, obesidade e hipertensão, compondo uma condição conhecida como síndrome metabólica, favorecem o surgimento do CHC (MCGLYNN; PETRICK; EL-SERAG, 2021). Ainda em termos de alimentação, micotoxinas produzidas pelo fungo da espécie *Aspergillus*,

denominadas de Aflatoxinas, contaminam alimentos como milho, amendoim e nozes (MCGLYNN; PETRICK; EL-SERAG, 2021). Mais especificamente a aflatoxina B1 possui potencial carcinogênico quando ocorre concomitantemente com uma infecção pelo VHB, aumentando o risco de desenvolvimento do CHC (MCGLYNN; PETRICK; EL-SERAG, 2021).

Em termos de consumo de álcool, foi demonstrado em estudos de metanálise que doses de 3 drinks por dia estavam relacionadas diretamente com um risco 16% maior de desenvolvimento de CHC, ao passo que um consumo de doses menores não demonstrou correlação alguma (TURATI et al., 2014). Sendo assim, de modo geral, doenças hepáticas relacionadas ao álcool correspondem a cerca de 30% dos casos de CHC quando ocorrem com fatores de risco como obesidade, diabetes e infecções virais pelos VHB e VHC (GANNE-CARRIÉ; NAHON, 2019).

Por fim, nota-se que mesmo possuindo diferentes etiologias, os eventos clássicos para o desenvolvimento do CHC passam por uma sequência de dano, inflamação crônica, fibrose, cirrose (não obrigatoriamente) e CHC (CHIDAMBARANATHAN-REGHUPATY; FISHER; SARKAR, 2021) (Fig. 3).

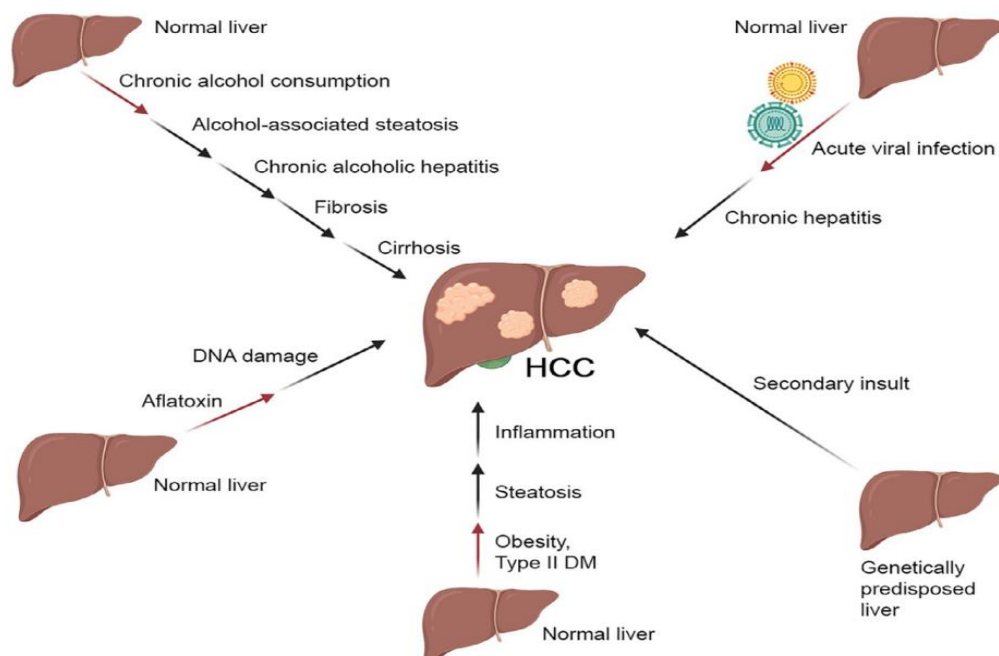


Fig. 3: Diferentes etiologias do CHC (CHIDAMBARANATHAN-REGHUPATY; FISHER; SARKAR, 2021).

1.2 Patologia do Carcinoma Hepatocelular

O processo de hepatocarcinogênese, mais especificamente o desenvolvimento do CHC, envolve a presença de processos inflamatórios constantes levando a um ciclo de inflamação e reparo, propiciando assim a formação de um microambiente que favorece a transformação maligna de hepatócitos (MARQUARDT; ANDERSEN; THORGEIRSSON, 2015). O fígado, por sua vez, possui um sistema de fluxo sanguíneo próprio através de seus sinusóides que possibilitam a troca de metabólitos e estabelecimento de funções imunológicas próprias em todo o sistema hepático (JENNE; KUBES, 2013).

Os sistemas de imunidade inata e adaptativa atuam de forma conjunta afim de rastrear e eliminar células alteradas (RINGELHAN et al., 2018). No entanto, infecções crônicas no caso dos VHB e VHC, acúmulo de gordura na Doença hepática gordurosa não-alcoólica (DHGNA) e Esteatohepatite não-alcoólica (EHNA) ou (padrões moleculares associados ao dano na doença hepática alcoólica) (DAMP's), regulam continuamente sinais pró-inflamatórios (como algumas citocinas), levando a um desbalanço imunológico hepático (JENNE; KUBES, 2013). Sendo assim, o desbalanço imunológico no microambiente hepático atrelado ao fenômeno da necroinflamação leva a doenças hepáticas como infecções crônicas, autoimunidade e formação de tumores como o CHC (Fig. 4) (PROTZER; MAINI; KNOLLE, 2012; RINGELHAN et al., 2018).

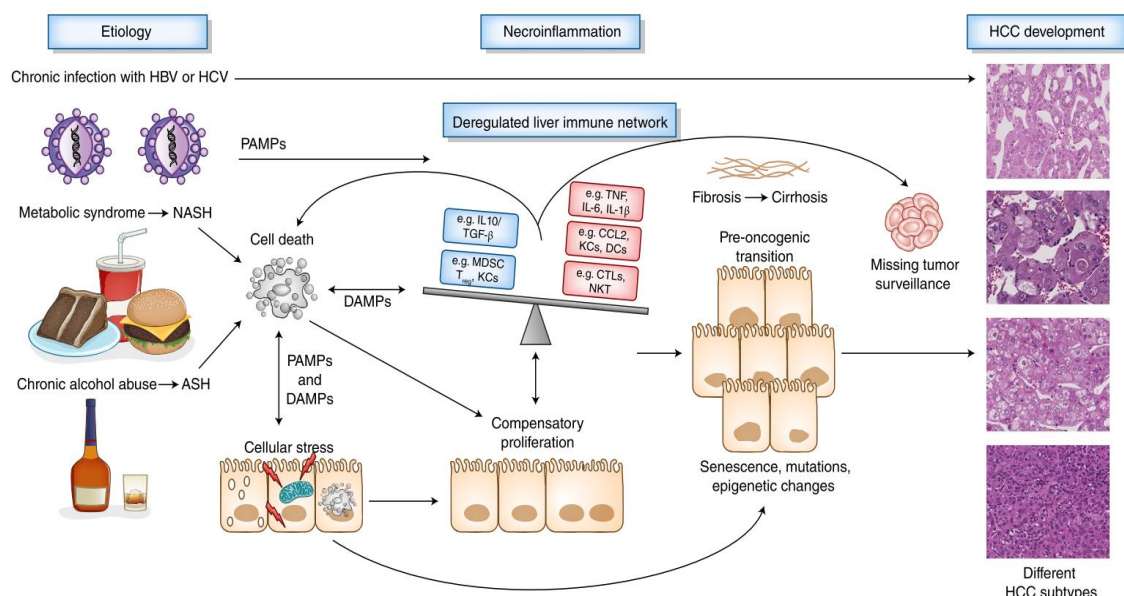


Fig. 4: Fenômeno da necroinflamação relacionado ao desbalanço imunológico e desenvolvimento do CHC (RINGELHAN et al., 2018).

A sequência de progressão do CHC humano passa por inflamação crônica/fibrose, que progride para cirrose, e finalmente a instalação da neoplasia, sendo a cirrose um fator de risco comum de várias etiologias que levam ao CHC (HASHEM B. EL-SERAG, M.D., 2011; SINGAL; EL-SERAG, 2015). A morte de hepatócitos é o primeiro gatilho para o processo de inflamação relacionado a hepatocarcinogênese (JI et al., 2015). Uma vez que a inflamação aguda é uma resposta benéfica que erradica potenciais patógenos e promove a regeneração do fígado após uma lesão química/biológica, a inflamação crônica é prejudicial, visto que contribui para o surgimento de fibrose e do CHC (AFFO; YU; SCHWABE, 2017). Sendo assim, em um contexto de inflamação crônica, o recrutamento de células inflamatórias juntamente com a secreção de citocinas/quimiocinas resulta na formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs) e ativação de estreladas hepáticas (CEHs) (AFFO; YU; SCHWABE, 2017). Onde, aliada à regeneração compensatória de hepatócitos decorrentes do dano hepático, a exposição crônica as EROs e ERNs abre caminho para o início do desenvolvimento de fibrose e do CHC (AFFO; YU; SCHWABE, 2017). Já por sua vez, as CEHs produzem colágenos e possuem participação ativa no processo patogênico da fibrose. Elas facilitam a formação do CHC auxiliando na manutenção microambiente tumoral juntamente com macrófagos e monócitos (AMANN et al., 2009; JI et al., 2015; ZHAO et al., 2011). Além disso, as CEHs podem auxiliar na progressão tumoral através de uma indução de troca de expressão de macrófagos do tipo M1 (caráter inflamatório) para M2 (caráter imunossupressor) (JI et al., 2015).

As citocinas podem ser sintetizadas por diversos tipos de células hepáticas e, no microambiente hepático, os hepatócitos possuem receptores de superfície para as mesmas (BISHAYEE, 2014). Além disso, as interleucinas (IL) como as IL-1 alfa, IL- B, IL-6, IL-8 e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) participam do processo de inflamação crônica do fígado, sendo a IL-6 um maior foco de estudo na literatura (BUDHU; WANG, 2006; NAUGLER; KARIN, 2008a). Em uma situação de hepatite crônica, os macrófagos do fígado (células de Kupffer) potencializam a resposta inflamatória hepática através da produção de IL-6, levando a uma proliferação compensatória de hepatócitos (NAUGLER; KARIN, 2008b). Dados em pacientes com HBV e HBC demonstraram uma correlação entre altos níveis de IL-6 e um maior risco de desenvolvimento de CHC (NAKAGAWA et al., 2009; WONG et al., 2009). Outra citocina de caracter pró-inflamatório na hepatocarcinogênese, a IL-1B, também é relacionada as células estreladas, promovendo sua ativação para um fenótipo de miofibroblastos (HAN et al., 2004).

Uma vez descoberta a alta heterogeneidade molecular no CHC, as técnicas de sequenciamento atuais têm identificado mutações chave em determinados genes associados a evolução desta malignidade (NAULT et al., 2019). Particularmente, a ativação das vias MYC e TERT são de especial atenção (HOLCZBAUER et al., 2013; KAPOSI-NOVAK et al., 2009; MARQUARDT et al., 2014; NAULT et al., 2014). Em seus estudos, KAPOSI-NOVAK et al., 2009, demonstrou que MYC possui papel central na regulação da transformação maligna do CHC em seus estágios iniciais. Em relação ao TERT, esse gene possui importância nos eventos de proliferação celular descontrolada (MARQUARDT; ANDERSEN; THORGEIRSSON, 2015).

Diversos fenômenos celulares como inflamação, estresse oxidativo e hipóxia tem ação conjunta na facilitação da iniciação, promoção e progressão tumoral hepática (ARAVALLI; CRESSMAN; STEER, 2013). Evidências crescentes indicam complexas alterações genéticas, epigenéticas, aberrações cromossômicas, expressões anormais de proteínas celulares, hiperexpressão de oncogenes e inibição de genes supressores tumorais e vias moleculares alteradas facilitam, de forma conjunta, o desenvolvimento do CHC (ARAVALLI; STEER; CRESSMAN, 2008; LACHENMAYER et al., 2010). Dessa forma, uma vez descoberta a alta heterogeneidade molecular no CHC, as técnicas de sequenciamento atuais têm identificado mutações chave em determinados genes associados a evolução desta malignidade (NAULT et al., 2019).

Uma das vias de sinalização mais afetadas no CHC é a via de sinalização Ras (KOPANJA et al., 2018). Proteínas Ras possuem papel essencial supressor no controle das atividades de regulação nas vias de proliferação celular normal (DAVIES et al., 2012). As vias controladas por Ras modulam fatores de transcrição que relacionam as atividades da mesma com diversas fases do ciclo celular, onde, como importante membro da família Ras, a mutação em H-RAS tem sido investigada amplamente em diversos tipos de tumores sólidos (SUI et al., 2012). O possível mecanismo carcinogênico de H-RAS consiste em mutação nesse gene levando à uma hiperexpressão da respectiva proteína, a qual, por sua vez, leva a inibição de nucleases responsáveis pela ativação de apoptose, resultando em uma diminuição significativa nos níveis de morte celular e aumento de proliferação celular (OVERMEYER, 2011). Mais especificamente, mutações pontuais levam à ativação de proto-oncogenes celulares na família do gene RAS (BUCHMANN et al., 1989a). Além disso, mutações no gene H-RAS, especialmente no códon 61, são frequentemente detectadas nos tumores hepáticos em camundongos (OGAWA, 2009). Mais especificamente relacionado ao CHC, SUI et al. (2012) demonstrou em seus estudos uma correlação entre mutação em H-RAS e aumento na

recorrência de metástase nos pacientes, além da presença de mutações nos códons 40 e 61 em 71% dos tumores.

A sinalização através das vias Wnt/ β -catenina possui papel essencial no desenvolvimento e regeneração do fígado, além da promoção da zonação hepática necessária para a separação espacial de diversas funções metabólicas realizadas pelos hepatócitos (NEJAK-BOWEN; MONGA, 2011). No CHC, o acúmulo de β -catenina tem sido observado em cerca de 10-50% dos tumores, além de estar correlacionado com progressão tumoral e mau prognóstico (LACHENMAYER et al., 2012; LEE, 2006). Mutações em β -catenina gene 1 (CTNNB1) tem sido relatadas em cerca de 20-40% dos casos de CHC (VILCHEZ, 2016). Em seu estudo, (CIEPLY et al., 2009) comparou as características do CHC na presença e ausência de mutações no gene CTNNB1. Seus resultados demonstraram uma forte associação entre mutações em CTNNB1, aumento no tamanho tumoral e invasão macro e microvascular, dando suporte a ideia de que a sinalização aberrante de β -catenina contribui para a agressividade tumoral.

A ativação de proto-oncogenes celulares possui papel essencial no desenvolvimento de diversos tumores, sendo que esta ativação pode resultar de translocação ou rearranjo cromossômico, amplificação ou mutação gênica (BUCHMANN et al., 1989). Em seu trabalho, ALLY et al. (2017) encontraram que no CHC a hipoeexpressão do gene TP53 se relacionou positivamente com a ocorrência de maior grau histológico, alto risco de recorrência tumoral e expressão reduzida de marcadores gênicos de hepatócitos maduros, além de caracterizar como possíveis alvos terapêuticos os genes: MDM4, MET, VGEFA, MCL1, IDH1, TERT, vias de sinalização como a WNT e as proteínas de checkpoint imunológico CTLA-4, PD-1 e PD-L1.

O acúmulo de matriz extracelular (MEC) na cirrose contém formação de nódulos hiperplásicos (macro e micro), com alguns destes podendo apresentar características displásicas (CAILLOT et al., 2009). No entanto, em cerca de 15 a 20% dos casos, o CHC pode ocorrer em um fígado não fibrótico ou com fibrose mínima em região portal ou sem fibrose na região septal (BRALET et al., 2000). Mesmo com os critérios histopatológicos bem estabelecidos para o diagnóstico do CHC (clássico e/ou metastático), o diagnóstico para lesões iniciais e pequenas ganhou notoriedade devido ao aumento recente do número de diagnóstico obtido em exames de imagem de rotina (SCHLAGETER et al., 2014). Entre as lesões pré-neoplásicas/pré-malignas, os focos displásicos são lesões uniformes que, em sua morfologia, possuem limites bem definidos, hepatócitos com tamanho nuclear alterado e atipias celulares em relação aos hepatócitos normais e adjacentes a lesão e medem < 1 mm, não atingindo critério de malignidade e crescimento invasivo (FINEGOLD; GELLER; GERBER, 1995). Porém, uma lesão similar e de difícil distinção é a displasia de células pequenas (SCHLAGETER et al.,

2014). Essas lesões focais são formadas por grupos de hepatócitos pequenos e displásicos com proporção núcleo/citoplasma aumentada. Além disso, geralmente são notadas em fígados cirróticos e consideradas lesões pré-malignas devido ao seu alto índice proliferativo e baixo índice apoptótico (LE BAIL et al., 1997). Em contraste aos focos displásicos, nódulos displásicos são, por definição, > 1 mm em tamanho, sendo essas lesões geralmente encontradas em fígados cirróticos e subdivididas em lesões de baixo grau ou de alto grau (SCHLAGETER et al., 2014). Além disso, ambos os subtipos de lesão são descritos como precursoras do CHC, apesar de casos de regressão também serem descritos na literatura (SCHLAGETER et al., 2014).

O CHC também pode se desenvolver a partir de adenomas em casos de pacientes que possuem doenças hepáticas sem manifestações (CRAIG et al., 2020). Os adenomas hepáticos possuem 5 subgrupos moleculares, sendo estes: linhagem HNF1A (30-40%), CTNNB1 (10-15%), subtipo inflamatório relacionado a via JAK-STAT (40-50%), via *sonic hedgehog* (5%) e, por fim, adenomas hepáticos que não são classificados (<7%) por não possuem essas mutações e/ou fenótipo inflamatório (NAULT et al., 2017a, 2017b; NAULT; BIOULAC-SAGE; ZUCMAN-ROSSI, 2013).

Em relação a metástase, o mecanismo pelo qual as células do CHC levam a ocorrência do fenômeno ainda é incerto (SHI et al., 2016). Além disso, sendo um processo avançado após uma progressão intratumoral em contexto de doença hepática crônica, a metástase possui relevância em pacientes que possuem lesões multinodulares intra-hepáticas de CHC, sendo estes nódulos depósitos de lesões metastáticas ou tumores independentes (CRAIG et al., 2020).

1.3 Modelos Experimentais

O processo da carcinogênese química envolve processos multifatoriais desde o início a partir de hepatócitos normais que se tornam células iniciadas que eventualmente levam a formação do CHC (KLAUNIG, 1999). Para a investigação dos eventos morfológicos e moleculares associados à patogênese do CHC, assim como potenciais fatores predisponentes ou preventivos do processo de hepatocarcinogênese, são comumente utilizados modelos em roedores incluindo ratos e camundongos (BAKIRI; WAGNER, 2013). Tais ensaios pré-clínicos podem ser categorizados, como quimicamente induzidos, geneticamente modificados ou xenográficos (ANSTEE et al., 2019; SANTHEKADUR; KUMAR; SANYAL, 2018). Mais especificamente, a hepatocarcinogênese induzida quimicamente garante um valioso modelo para a investigação da biologia molecular especialmente em seus estágios iniciais devido a

possibilidade de análise do número e tamanho de lesões pré-neoplásicas e a investigação da influência de alterações genéticas e epigenéticas durante as diferentes fases do processo de desenvolvimento do CHC (OGAWA, 2009). Na literatura, os modelos de hepatocarcinogênese induzida quimicamente utilizam predominantemente animais machos, visto que os modelos refletem a disparidade de gênero assim como na doença correspondente em humanos (NAUGLER et al., 2007). Um fator determinante para tal preferência é que estudos experimentais apresentam evidência sólida de vias de estrógeno conferindo proteção ao desenvolvimento da hepatocarcinogênese em fêmeas (HONG et al., 2013; NAUGLER et al., 2007).

Nos modelos murinos de hepatocarcinogênese, o desenvolvimento do CHC passa pela fase de lesões pré-neoplásicas, denominadas de focos de hepatócitos alterados (FHAs), identificados em cortes histológicos corados pela hematoxilina-eosina (HE) tintoriais específicas (BANNASCH, 1986; QIN SU; BANNASCH, 2003). Os FHAs são utilizados como marcadores da hepatocarcinogênese em modelos murinos de iniciação e promoção (PITOT, 2007; QIN SU; BANNASCH, 2003). A etapa de iniciação da hepatocarcinogênese química é caracterizada por lesões no DNA de hepatócitos-alvo, que após um ciclo de replicação celular pode se fixar em mutações específicas, dando origem à hepatócitos iniciados (QIN SU; BANNASCH, 2003; PITOT, 2007). A expansão clonal dos hepatócitos iniciados pode ocorrer de forma espontânea ou acelerada pela ação de agentes promotores, levando ao desenvolvimento de FHAs. Assim, agentes sintéticos ou naturais podem acelerar ou inibir o desenvolvimento de FHAs, sendo classificados como agentes promotores ou supressores (anti-promotores) (KAESTNER et al., 2017; PITOT, 2007; QIN SU; BANNASCH, 2003).

Dentre as substâncias que são frequentemente utilizadas para a indução de lesões pré-neoplásicas nos animais destaca-se a dietilnitrosamina (DEN), ou N-nitrosodietilamina (NDEA). Nitrosaminas estão associadas com a etiologia do CHC humano, pois contribuem para o desenvolvimento de lesões no DNA, estresse oxidativo, inflamação crônica e proliferação celular aumentada em resposta a lesão tecidual, levando à hepatocarcinogênese (DARVESH; BISHAYEE, 2013). Em termos de dose diária humana de ingestão de produtos contendo nitrosaminas, a quantidade ocorre na proporção de microgramas (μg) por dia, sendo essas substâncias classificadas como “Grupo 2A: provavelmente carcinogênicos para humanos” seguindo os critérios da *International Agency for Research on Cancer* (IARC, 1978; LIJINSKY, 1999; TRICKER; KUBACKI, 1992). As formas de exposição humana a essas substâncias levam em conta tanto a categoria das nitrosaminas voláteis como não voláteis, podendo ser encontrados em produtos como tabaco, aditivos alimentícios, carnes defumadas e

curadas (HERRMANN; GRANBY; DUEDAHL-OLESEN, 2015; LIJINSKY, 1999; TRICKER; KUBACKI, 1992; TSUDA, 2001).

Um mecanismo de ação bem estabelecido de carcinogênese pela DEN, após sua metabolização, é a indução de dano no DNA e morte de hepatócitos centrolobulares (necrose e apoptose), levando à proliferação celular compensatória e formação de hepatócitos iniciados (GLAUERT et al., 2010; QIU et al., 2011). Além disso, a DEN, em dose única, atua como agente iniciador para a hepatocarcinogênese em roedores (ROMUALDO et al., 2017, 2018). Por consequência, a sua bioativação hepática gera metabólitos ativos e espécies reativas de oxigênio, levando a formação de adutos e lesões oxidativas no DNA (QI et al., 2008). Por outro lado, a inibição seletiva da CYP2E1, membro da família citocromo P450, inibe a iniciação da hepatocarcinogênese pela DEN (YE et al., 2012). A aplicação de baixas doses de DEN em camundongos neonatos resulta no desenvolvimento do CHC a longo prazo, sendo que, neste modelo, FHAs são observados em fases iniciais da hepatocarcinogênese e adenomas e CHC nos estágios tardios (YAMAMOTO et al., 2017) (Figura 5).

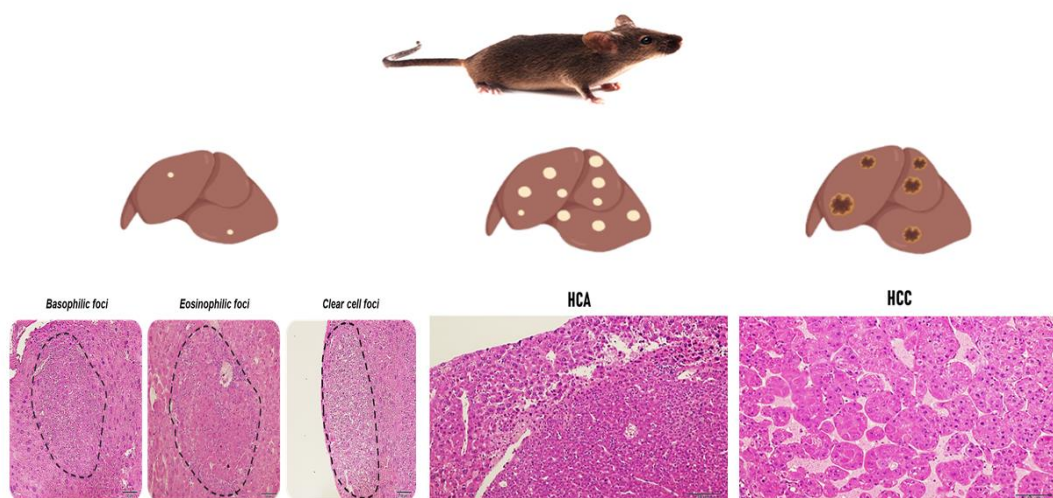


Fig. 5 Principais tipos de lesões encontradas em camundongos utilizados em modelos quimicamente induzidos pela DEN. A figura foi composta com a utilização de ilustrações da SMART-servier Medical Art. Disponível em: www.BioRender.com

Quanto à utilização de modelos neonatos, camundongos com 14 dias de idade são altamente suscetíveis à hepatocarcinogênese induzida por uma grande variedade de carcinógenos (VESSELINOVITCH, 1987). Sendo assim, nota-se que o desenvolvimento do fígado no período pós-natal é único devido aos mecanismos de proliferação celular e diferenciação

hepática operarem de maneira simultânea, promovendo uma maior suscetibilidade à indutores carcinogênicos (SEPTER et al., 2012).

Uma vez que se pode reproduzir parcialmente a fibrose hepática humana em modelos experimentais murinos, o tetracloreto de carbono (CCl_4) é o indutor químico mais utilizado para o desenvolvimento de fibrose hepática (SLATER; CHEESEMAN; INGOLD, 1985). Está bem estabelecido que a exposição contínua ao CCl_4 leva ao desenvolvimento de fibrose hepática e proliferação celular compensatória (STOWELL et al., 1951). A importância desse cenário fibrótico induzido pelo CCl_4 através de um processo inflamatório contínuo, morte celular, ativação de células estreladas hepáticas (CEHs) e síntese de colágeno dá-se principalmente devido à ausência do mesmo em modelos que utilizam somente aplicação de DEN, sejam elas aplicações únicas ou múltiplas (TSUCHIDA; FRIEDMAN, 2017; YANG et al., 2011). Já em termos de metabolização, o CCl_4 também é metabolizado pela enzima CYP2E1, produzindo radicais que levam a dano e morte de hepatócitos, além de desencadear resposta inflamatória (WEBER; BOLL; STAMPFL, 2003).

Na maioria dos modelos de hepatocarcinogênese, o CHC manifesta-se somente após um longo período de latência, sendo este em torno de 10-24 semanas após a exposição à um carcinógeno específico (OGAWA, 2009). Além disso, o CCl_4 foi demonstrado como um agente promotor da hepatocarcinogênese em roedores devido sua capacidade em aumentar a incidência de tumores hepáticos após a iniciação com um determinado agente químico genotóxico (DRAGANI et al., 1986; UEHARA et al., 2014). Assim, o CCl_4 , além de um agente pró-fibrogênico, também foi demonstrado ser agente promotor do CHC a partir da aplicação de doses repetidas (0.2 ml/kg, intraperitoneais) duas vezes por semana, durante 14 semanas consecutivas, após uma aplicação única de DEN (UEHARA, et al., 2014). Por fim, ROMUALDO et al. (2017, 2018) demonstraram que, no modelo neonato, a utilização do DEN em dose única como indutor da hepatocarcinogênese, aliado a doses repetidas de CCl_4 , não só levam ao surgimento do CHC a partir de um microambiente de fibrose hepática, mas também que o CCl_4 reduz o tempo experimental. Quanto ao modelo combinado de aplicação da DEN e CCl_4 simultaneamente em camundongo neonato, este pode resultar em aumento da incidência de tumores hepáticos, sendo que 100% dos camundongos do grupo co-tratado desenvolveram tumores hepáticos aos 5 meses de idade (UEHARA et al., 2013). Além disso, este modelo com uso simultâneo dos dois compostos de indução química da hepatocarcinogênese prova-se útil para o estudo dos eventos moleculares dos estágios iniciais, bem como tardios durante o desenvolvimento do CHC dando foco à fatores etiológicos como a genotoxicidade e fibrose hepática avançada (UEHARA et al., 2014).

1.4 Comunicação (inter)celular na carcinogênese hepática

A homeostasia, assim como os processos de morte celular e inflamação, são controlados por mecanismos de comunicação extracelular, intracelular e intercelular, sendo este último mediado por uma família de proteínas denominadas conexinas (Cxs) (VINKEN et al., 2008; VINKEN, 2012). As Cxs participam ativamente no controle do fluxo de metabólitos entre células adjacentes, visto que o mecanismo intercelular é mediado por junções GAP ou comunicantes. Hemicanais ou conexons são estruturas hexagonais de Cxs que formam-se na membrana plasmática (RUTKOWSKI et al., 2008). Estruturalmente, as junções comunicantes do tipo GAP são compostas por 2 pares acoplados de hemicanais/conexons, contendo 6 unidades de Cxs cada (VINKEN et al., 2008; VINKEN, 2012). Esse acoplamento de conexons que formam as junções GAP é auxiliado pela presença e ação de proteínas de adesão (NALEWAJSKA et al., 2020).

No que diz respeito a composição das junções GAP, ela pode variar de acordo com os tipos de conexons que a formam, podendo ser: Homomérico-Homotípico (dois conexons idênticos formados por apenas um tipo de conexina); Homomérico-Heterotípico (dois conexons diferentes formados por apenas um tipo de conexina); Heteromérico-Homotípico (dois conexons idênticos formados por, pelo menos, dois tipos diferentes de Cxs); e por fim, Heteromérico-Heterotípico (conexons diferentes formados por mais de dois tipos diferentes de Cxs) (KRYSKO et al., 2005; KUMAR; GILULA, 1996; MEŞE; RICHARD; WHITE, 2007; RUTKOWSKI et al., 2008) (Fig. 6).

A maioria dos tecidos animais expressa mais de um tipo de conexina, que pode ser regulada por hormônios, fatores de crescimento e mediadores pró-inflamatórios, garantindo a regulação das junções intercelulares (BOUCHER et al., 2018; ROY; KIM; LIM, 2017). Em termos de tecido humano, a expressão das Cxs também ocorre em muitos tecidos e órgãos com exceção de células como hemácias, espermatozoides e células de músculo estriado esquelético (ANGELILLO-SCHERRER et al., 2011; LAIRD, 2006).

No que diz respeito a importância do estudo das Cxs, seu comportamento em processos fisiológicos normais é bem conhecido. O desafio envolve o estudo do comportamento das mesmas em processos patofisiológicos de doenças como o câncer (NALEWAJSKA et al., 2020). Especificamente no câncer, as Cxs podem estar envolvidas em distúrbios de comunicação intercelular, desta forma, interferindo em sinalizações celulares parácrinas e autócrinas (NALEWAJSKA et al., 2020).

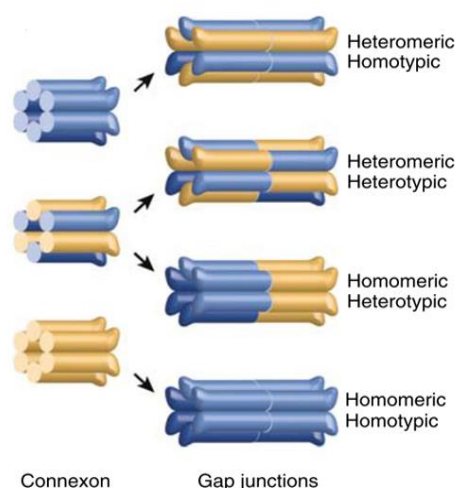


Figura 6. Diferentes composições dos canais tipo junção GAP. FONTE: (MEŞE; RICHARD; WHITE, 2007)

Quanto a estrutura individual das Cxs, cada unidade possui quatro domínios transmembranares, duas alças extracelulares, um laço citoplasmático, uma cabeça citoplasmática N-terminal e uma porção C-terminal (Fig. 7). Na família de Cxs, já foram identificadas 21 Cxs em humanos e 20 Cxs em roedores (OSHIMA, 2014). Em termos de variabilidade, a família das Cxs tem seus domínios transmembranares, laços extracelulares e a cabeça citoplasmática N-terminal bem conservadas, sendo que o domínio citoplasmático e a cabeça C-terminal possuem grande variabilidade em termos de sequência e extensão (MEŞE; RICHARD; WHITE, 2007).

Mais especificamente no fígado, a Cx32 e Cx26 são as maiores formadoras de junções GAP hepáticas, estando localizadas na membrana plasmática dos hepatócitos (STUTENKEMPER et al., 1992; VINKEN et al., 2008). A Cx32 está uniformemente distribuída em todas as regiões do fígado, enquanto a Cx26 está preferencialmente expressa na região acinar periportal (KOJIMA et al., 1994). Ao mesmo tempo, a maioria das células não parenquimatosas hepáticas, incluindo as células estreladas, células de Kupffer e células endoteliais sinusoidais expressam, preferencialmente, Cx43, enquanto as células vasculares expressam, predominantemente, Cx37 e Cx40 (EUGENÍN et al., 2007; FISCHER et al., 2005; GONZÁLEZ et al., 2002; HERNÁNDEZ-GUERRA et al., 2014).

Panexinas (Panx) são proteínas de uma família semelhante à das Cxs também possuindo função regulatória do fluxo de íons e recrutamento de componentes pró-inflamatórios em situações de estresse celular (CRESPO YANGUAS et al., 2017; 8 D'HONDT et al., 2011; WANG et al., 2013a). Estas proteínas apresentam uma configuração semelhante aos hemicanais

de Cxs, permitindo o fluxo de substâncias entre o citosol e o meio extracelular. No entanto, as estruturas hexaméricas das panexinas não se encaixam para formar junções comunicantes entre células adjacentes e, portanto, são chamadas simplesmente de canais de panexinas, e não hemicanais (CRESPO YANGUAS et al., 2017; D'HONDT et al., 2011; WANG et al., 2013a). Além disso, apesar de compartilharem semelhanças estruturais com as Cxs, as Panx possuem tipicamente uma cabeça C-terminal e alças extracelulares mais longas (D'HONDT et al., 2011; WANG et al., 2013a).

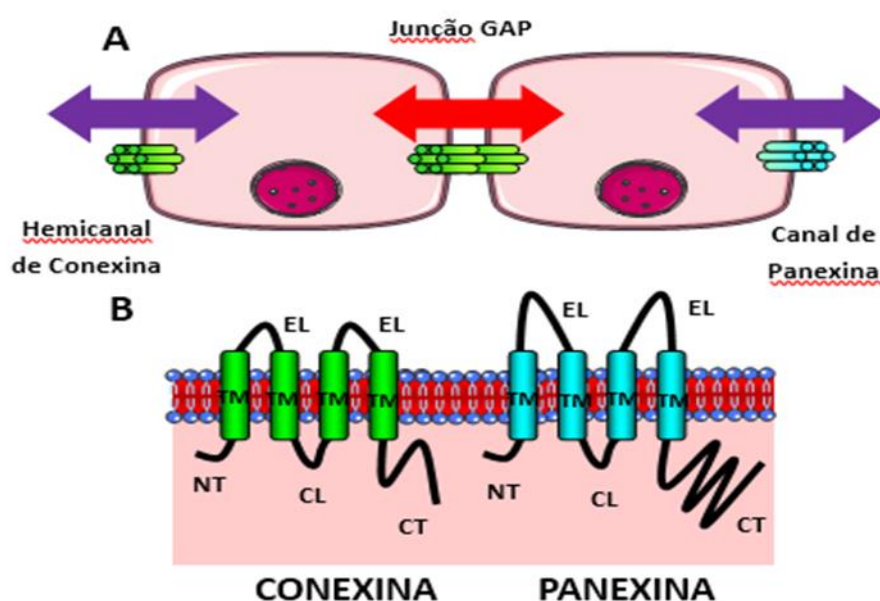


Figura 7. A) Arquitetura das junções GAP, dos hemicanais de conexinas e dos canais de panexinas. As junções comunicantes (GAP) são formadas pela interação entre dois hemicanais de conexinas de células adjacentes e intermediam a comunicação intercelular (seta vermelha). Os hemicanais de conexinas e os canais de panexinas são construídos por 6 conexinas (verde) e 6 panexinas (azul), respectivamente, e intermediam a comunicação parácrina (setas em roxo). **B)** Topologia das proteínas conexinas e panexinas. As conexinas (verde) e as panexinas (azul) consistem em 4 domínios transmembranares (TM), 2 laços extracelulares (EL), 1 alça citosólica (CL), 1 cauda citosólica carboxiterminal (CT) e 1 cauda aminoterminal (NT). Fonte: (MAES et al., 2015).

As panexinas foram descobertas nos anos dois mil como homólogas da família das inexas, proteínas formadoras de junções GAP em invertebrados (PANCHINA et al., 2000). A família das panexinas consiste na panexina 1 (Panx1), panexina 2 (Panx2) e Panexina 3 (Panx3) (BOND; NAUS, 2014). Dentre os três tipos de panexinas caracterizadas em humanos e roedores, a Panx1 tem presença detectada em órgãos como cérebro, baço, fígado, pele, cartilagem, bexiga, pulmão, rins, cólon, trombócitos, eritrócitos e células imunes (PENUELA

et al., 2007; KIM; KIM; LEE, 2015). Vários relatos demonstraram a expressão da Panx1 no tecido hepático, particularmente sendo produzida por hepatócitos (BRUZZONE et al., 2003; CSAK et al., 2011; GANZ et al., 2011; KIM, KIM & LEE, 2015; XIAO et al., 2012) e células de Kupffer (SÁEZ et al., 2014). De maneira análoga as conexinas e suas respectivas junções GAP, a classificação da oligomerização da Panx1 revelou que 6 subunidades eram necessárias para a formação de um panexon (nomenclatura similar ao conexons, formado por conexinas) (Figura 6). (BOASSA et al., 2007). No caso da Panx2, quando realizada análise similar utilizando a cabeça C-terminal mutante, viu-se que esta panexina organiza-se em heptâmeros ou octâmeros (AMBROSI et al., 2010).

Em termos de funcionalidade, a abertura dos canais de panexinas pode ser ativada mediante estímulos fisiológicos e patológicos. Mais especificamente no caso da Panx1, seus canais podem ser abertos por estímulos como a elevação de cálcio (Ca^{2+}), ligação de ATP a receptores purinérgicos P2Y (LOCOVEI; WANG; DAHL, 2006), bem como a receptores ionotrópicos P2X7 (PELEGRIN; SURPRENANT, 2006). No âmbito fisiopatológico, os canais de panexinas podem ser abertos por estímulos como redução de oxigênio e glicose, inibição metabólica e S-nitrosilação (THOMPSON, 2006; ZHANG et al., 2008).

Devido a sua importância na homeostase hepática, não é surpreendente que as Cxs desempenhem papel importante na toxicidade química (MAES et al., 2016). Fica evidente a importância dos canais de conexina e panexina nos processos de inflamação e morte celular (VINKEN, 2012). Além disso, diversas doenças como hepatites, fibroses e colestases são associadas com inflamação e morte celular, além da alteração da expressão e atividade de determinadas Cxs (VINKEN, 2012).

O estresse oxidativo e a inflamação afetam negativamente a expressão proteica das Cx26 e Cx32 (KOJIMA et al., 1996; YAMAMOTO et al., 2004). A maioria dos tumores estudados teve redução tanto em junções GAP de composição homóloga bem como os de composição heteróloga. Sendo assim, essa condição presumidamente contribuiu para a progressão neoplásica, permitindo o escape por parte das células tumorais de sinais de regulação relacionados a proliferação celular, diferenciação e apoptose (BENNETT et al., 1991; LOEWENSTEIN; KANNO, 1966; NIESSEN; WILLECKE, 2000; WILSON; CLOSE; TROSKO, 2000).

Em seu trabalho, MAES et al. (2016) indicaram que camundongos submetidos ao modelo de hepatite aguda induzida por paracetamol apresentaram maior expressão gênica de Cx43 e menor expressão das Cxs 26 e 32. Ademais, animais deficientes em Cx43 demonstraram maior taxa de morte hepatocelular, inflamação e estresse oxidativo frente à intoxicação induzida por

paracetamol, quando comparados aos animais selvagens (MAES et al., 2016). No contexto de administração crônica de CCl₄, foi exposto que camundongos deficientes em Cx43 desenvolveram fibrose excessiva (COGLIATI et al., 2011). Além disso, os animais fibróticos também demonstraram um menor número de lesões necroinflamatórias no parênquima hepático, proliferação hepatocelular reduzida e baixos níveis plasmáticos de alanina (ALT) e aspartato (AST) aminotransferase (COGLIATI et al., 2011).

Mais especificamente em relação ao CHC, MA (2002) demonstrou que a Cx32 e Cx43 tem expressão elevada no fígado normal e até mesmo em tecidos pré-neoplásicos, mas baixa expressão em amostras de CHC. Por consequência, a falta das Cx32 e Cx43 reduz o número de junções GAP entre as células do CHC e as células não tumorais do tecido, resultando na progressão da hepatocarcinogênese (MA, 2002). SHEEN (2004) demonstraram que os níveis de mRNAs da Cx 26 e Cx 32 são menores em amostras de HCC quando comparado com tecido de doadores sem a doença. Além disso, os pacientes com rápida recidiva do CHC, expressavam menores níveis quantidade de mRNA dessas Cxs na neoplasia quando comparados a amostras de pacientes sem recidiva após ressecção cirúrgica. WANG et al. (2013b) demonstraram que níveis adequados de expressão de Cx 43 em amostras de CHC são importantes para retardar a evolução, recidiva, metástase e prognóstico de pacientes com CHC associado a infecção pelo VHB. Ao mesmo tempo, outros autores atribuíram a possibilidade da contribuição das conexinas para a localização aberrante das junções GAP, ou seja, em um local celular diferente das quais as conexinas são encontradas em tecidos normais no órgão em questão (OYAMADA et al., 1994). Por outro lado, estudos demonstraram que os níveis de RNAm das Cx32 e Cx43 não foram menores quando comparados com tecidos hepáticos normais, porém demonstraram localização aberrante no CHC (OYAMADA et al., 1990).

Outros estudos demonstraram que as expressões proteicas das Cx26 e Cx32 estão reduzidas significativamente em tecidos humanos de CHC quando comparados a tecidos hepáticos normais (PLANTE; CHARBONNEAU; CYR, 2002). Além disso, notamos alterações de localização das três conexinas citadas sendo que, em tecidos hepáticos normais, estas conexinas estavam localizadas principalmente na membrana plasmática dos hepatócitos. Porém, em tecidos de CHC, a localização das conexinas deu-se em grande parte no citoplasma dos hepatócitos devido a “internalização”, fenômeno descoberto em um estudo anterior sobre a relação da Cx32 e o desenvolvimento do CHC (NAKASHIMA et al., 2004). A nível de mRNA SHEEN (2004) demonstrou que, em tecidos seccionados de CHC, uma diminuição da expressão das Cx32 e Cx26 estava significativamente relacionada com recorrências pós operatórias e morte.

Um acúmulo crescente de evidências sugere que, pelo menos em alguns casos, as Cxs exercem seu papel supressor tumoral através de uma via independente de suas junções GAP (NAUS; LAIRD, 2010). Em muitos casos, uma re-expressão de conexinas tanto em linhagens celulares metastáticas, bem como em não metastáticas resultou em uma diminuição na taxa de proliferação celular e tumorigênese, além de promover transições mesenquimais-epiteliais (KALLURI; WEINBERG, 2009; MCLACHLAN et al., 2006). Em nosso estudo, demonstramos que a Cx32 suprimiu a proliferação celular e invasão do CHC tanto em amostras de tecido hepático humano bem como em ensaios *in vitro* (ZHAO et al., 2015). Além disso, apresentamos evidência de que a regulação negativa da Cx32 em tecidos humanos de CHC está relacionada com uma maior invasão vascular e maior tamanho tumoral (ZHAO et al., 2015). Os estudos *in vitro* demonstraram que uma hiperexpressão ou depleção de Cx32 no CHC exibiu efeito supressor tumoral significativo quanto a invasão celular, migração e proliferação (ZHAO et al., 2015). Por fim, identificamos as vias de sinalização p53 e Akt como, em parte, alvos responsáveis pelas funções anti-metastáticas e anti-proliferativas da Cx32 (ZHAO et al., 2015).

Visto que para a formação das junções GAP existe a necessidade das células estarem em contato próximo, este processo de formação de canais depende da interação de propriedades adesivas entre as conexinas (COTRINA; LIN; NEDERGAARD, 2008), onde, por consequência, a relação entre as junções GAP e as junções aderentes tem sido bem documentada (FRENZEL; JOHNSON, 1996; JONGEN et al., 1991). Em alguns tecidos, células em diferentes estágios de diferenciação expressam diferentes tipos de conexinas, sendo que células do CHC podem expressar as mesmas conexinas que os hepatócitos normais, ocorrendo boa aderência e comunicação entre si para a formação das junções GAP (SHEEN, 2004).

Em relação ao comportamento biológico da Panx1 na carcinogênese, de uma maneira geral, tem-se evidência de uma expressão aumentada nos tecidos tumorais gerais quando comparada a tecidos normais (JIANG; PENUELA, 2016). Quanto ao nível transcricional, a superexpressão de Panx1 foi relacionada com a alta disseminação de metástases baseado em análises de microarranjo em linhagens celulares de CHC (SONG et al., 2005). Novamente em tecidos tumorais diversos, a expressão aumentada ou à amplificação da Panx1 foi relatada em diversas biópsias humanas na maioria das neoplasias mais comuns (CERAMI et al., 2012; GAO et al., 2013). No entanto, o *Atlas Cancer Genoma* reportou alguns exemplos de deleções de Panx1 presentes em biópsias humanas, indicando que a expressão desta panexina pode ser regulada de maneira variada frente a tipos diferentes de neoplasias (JIANG; PENUELA, 2016). Em suma, a maioria dos relatos aponta para um efeito pró-tumoral da expressão da Panx1,

porém, este comportamento pode variar quanto às Panx2 e Panx3, além da especificidade do câncer e tecido-alvo (JIANG; PENUELA, 2016).

Quanto a Panx1 e o CHC, SHI et al. (2019) demonstraram correlação positiva entre a superexpressão da Panx1 e um pior prognóstico em pacientes humanos, com maior risco de ocorrência de metástase. Além disso, neste mesmo estudo, foi demonstrada uma menor quantidade de nódulos metastáticos no pulmão de camundongos knockout para Panx1, que receberam células de CHC murino (hepa 1-6) injetadas no tecido subcutâneo, em relação aos animais selvagens.

1.5 Justificativa e Objetivo

Grande parte dos trabalhos encontrados na literatura sobre hepatocarcinogênese induzida quimicamente utilizando em conjunto os compostos citados (DEN e CCl₄) tiveram seus tempos de biotério baseados em 17 semanas de vida dos animais (ROMUALDO et al., 2018), (ZALATNAI; LAPIS, 1994) ou trabalhos um pouco mais longos considerando 22 semanas como o de (UEHARA et al., 2013). Períodos mais extensos de biotério, por volta de 30 semanas ou mais, geralmente foram vistos em trabalhos em que somente aplicações únicas ou múltiplas de DEN foram realizadas, como em (WEGHORST; PEREIRA; KLAUNIG, 1989) e (KUSHIDA et al., 2011). Sendo assim, do ponto de vista da estratégia do delineamento experimental baseado para o presente projeto, viu-se a necessidade da realização de pontos de eutanásia mais longos considerando um número maior de aplicações de CCl₄ e posteriores comparações para verificar se, de fato, isto implicaria em um maior número de lesões nos animais (Adenomas e Carcinoma hepatocelular principalmente).

Sobre o prognóstico do CHC, a cirurgia, seja ela transplante de fígado ou ressecção, permanece a melhor terapia para pacientes com CHC, onde uma avaliação sobre a expressão de mRNA de conexinas em tecidos de CHC pode fornecer informações importantes sobre o risco de recorrências em pós operatórios (SHEEN, 2004). Visto que, de fato, o CHC é um cancer resistente a terapias e de difícil tratamento, mesmo em caso de benefícios clínicos em terapias sistêmicas, os avanços nos resultados em pacientes tem sido modestos (LLOVET et al., 2018). No caso do presente projeto, o interesse no estudo da Panx1 e das Cxs 26,32 e 43 dá-se pela falta de evidência na literatura sobre o comportamento desses canais nas diferentes fases de desenvolvimento do CHC em roedores e humanos (VINKEN, 2012), além da busca por novos biomarcadores terapêuticos, visto que as técnicas empregadas atualmente possuem pouca eficácia. Portanto, o objetivo do presente trabalho, além do contexto já citado do modelo de

hepatocarcinogênese induzida quimicamente, é essencialmente caracterizar a expressão das Cxs 26, 32, 43 e Panx1 em diferentes lesões e períodos da hepatocarcinogênese induzida quimicamente (DEN/CCL₄), visto que a literatura carece deste tipo de mapeamento da expressão dessas proteínas, especialmente considerando os três tipos principais de lesões envolvidas no desenvolvimento da hepatocarcinogênese (FHA, adenomas e CHC).

2. Metodologia

2.1 Delineamento experimental

Visando aumentar o desenvolvimento de CHC, a linhagem de camundongos C3H/HeJ foi selecionada devido a sua maior susceptibilidade a hepatocarcinogênese induzida pela DEN quando comparada a outros modelos murinos (LEE; NOMURA; KITAGAWA, 1989; WEGHORST; PEREIRA; KLAUNIG, 1989). Assim baseado no modelo experimental padronizado pelo nosso grupo de pesquisa (ROMUALDO et al., 2018), camundongos machos C3H/HeJ receberam, com 14 dias de idade, uma única injeção intraperitoneal (i.p) de 25 mg/kg peso corpóreo (p.c.) de DEN, ou somente o veículo (NaCl 0,9%) (Figura 8). A partir da 8ª semana de vida, por um período de 21 (da 8ª até a 29ª semana) e 38 semanas (da 8ª a 46ª semana), os camundongos receberam 3 doses i.p semanais de solução 10% CCl₄, diluído em óleo de milho (Fig. 8). A dose inicial de solução será 0,25 µL/g peso corpóreo (p.c.) (correspondendo a 0,025 µL/g ou 0,040 µg/g de CCl₄ puro). Semanalmente, a dose foi aumentada em 0,25 µL até atingir a dose máxima de 1,50 µL/g p.c. (correspondendo a 0,15 µL/g ou 0,24 µg/g de CCl₄ puro), que foi mantida até o final das aplicações.

Transcorrido o período de administração de doses nos camundongos, os mesmos foram eutanasiados por exsanguinação sob efeito de anestesia (solução de ketamina/xilazina a 100/16 mg/kg p.c., i.p) após 17 (n=15), 30 (n=15) e 47 (n=30) semanas de vida (Fig. 8). O período de 47 semanas inclui animais que receberam CCl₄ de maneira contínua até a semana 46 e, adicionalmente, outro grupo de animais que receberam CCl₄ até a semana 29. Este padrão de delineamento foi estabelecido para a análise da Cx26, Cx32, Cx43 e Panx1 nos estágios iniciais da hepatocarcinogênese (principalmente lesões pré-neoplásicas na semana 17) e estágios mais avançados (principalmente com adenomas e CHC, nas semanas 30 e 47) (ROMUALDO et al., 2018; UEHARA et al., 2013). Amostras hepáticas foram coletadas para análises histológicas e moleculares conforme descrito a seguir. Alterações nodulares macroscópicas foram

contabilizadas, e calculada a incidência (% de animais afetados), multiplicidade (número de nódulos/animal). Adicionalmente em 47 semanas somente, os animais tiveram seus pulmões coletados para análises histológicas visando à investigação de possíveis metástases hepáticas.

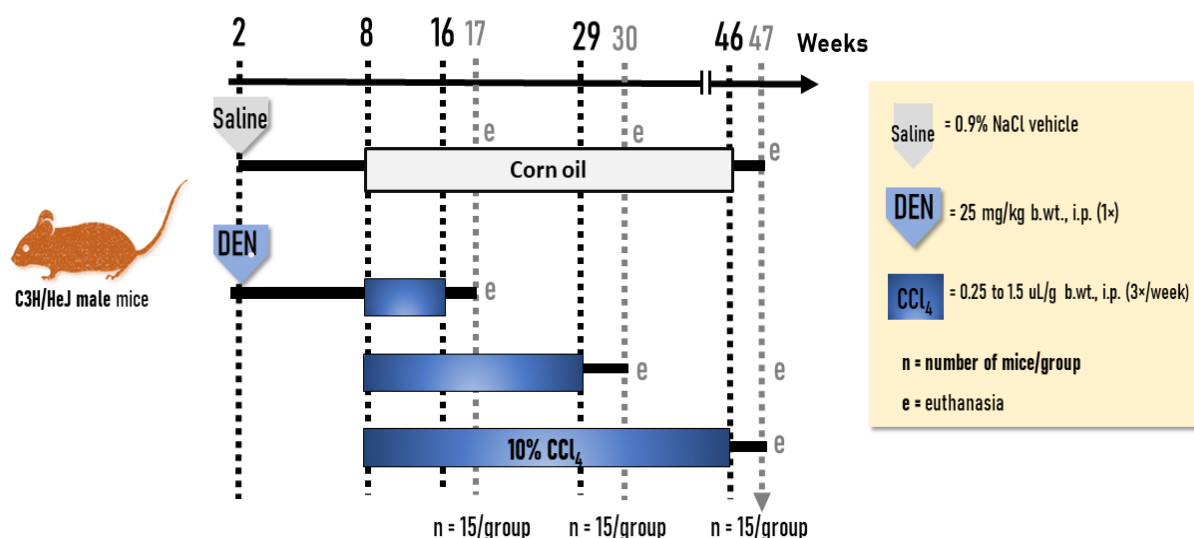


Figura 8. Delineamento Experimental.

Os camundongos foram adquiridos do biotério da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ, USP) e mantidos em biotério da Unidade de Pesquisa Experimental (UNIPLEX) da Faculdade de Medicina de Botucatu da Universidade Estadual Paulista (FMB – UNESP, Botucatu). Durante todo o experimento, os animais foram acondicionados em gaiolas de polipropileno com tampa de aço inoxidável na forma de grade e forradas com maravalha de pinho autoclavada (até 4 animais/caixa). Durante toda a fase de experimentação, as condições ambientais do biotério eram controladas: temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), umidade relativa do ar ($55 \pm 10\%$), período de luz (12 horas claro/12 horas escuro) e exaustão do ar contínua. As trocas das gaiolas e água filtrada, assim como o registro de massa corpórea, consumo de água e ração, foram realizadas duas vezes por semana. Água filtrada e a ração basal (Nuvilab, Quimtia, Brasil) foram fornecidas *ad libitum*. A água foi oferecida em bebedouros de vidro com tampa de borracha e bico metálico, com capacidade para 500 mL. Os procedimentos

descritos foram aprovados pelo comitê de ética em experimentação animal (CEUA) da FMB – UNESP nº 1345/2020 (Anexo I).

2.2 Análises histológicas

2.2.1 Identificação de lesões pré-neoplásicas e neoplásicas

Na ocasião da eutanásia, foram coletados e fixados em Metacarn (60% Metanol, 30% Clorofórmio e 10% Ácido Acético) (12 h) fragmentos representativos dos lóbulos esquerdo lateral, direito medial e caudado de cada animal, como previamente estabelecido (THOOLEN et al., 2010). Nódulos macroscópicos foram identificados, medidos e fixados. Em seguida, os tecidos seguiram para desidratação em concentrações crescentes de etanol, decrescentes de xilol e incluídos em parafina. Então, os blocos de parafina foram cortados no micrótomo com espessura de 5 μm . Posteriormente, os cortes obtidos foram corados com hematoxilina e eosina (HE) ou picrossírus red (Romualdo et al., 2018). As lesões pré-neoplásicas foram identificadas de acordo com a característica histológica/tintorial predominante, sendo classificadas como lesões de células claras, basofílicas ou eosinofílicas. Foi calculada a incidência (% de animais afetados) total e de cada subtipo histológico. Ademais, também foi calculado o número total de lesões por cm^2 da secção hepática, a área média das lesões (mm^2) e a área relativa das lesões na seção (mm^2/cm^2). As análises histológicas foram realizadas em microscópio Olympus CX23 (Olympus Corporation, Japão), por meio do software CellSens software (Olympus Corporation, Japão). As áreas das secções hepáticas foram medidas em lupa Stemi 2000 (Zeiss, Alemanha), utilizando-se do sistema de captura de imagem Dino Capture (ANMO Electronics Corporations, EUA). Os nódulos macroscópicos coletados durante a necropsia foram classificados como adenomas ou CHC em HE, além de calculada a incidência e multiplicidade de tais lesões.

2.2.2 Imunofluorescência

Cortes histológicos de 5 μm , obtidos em lâminas silanizadas (Starfrost, Alemanha), a partir de amostras congeladas contendo tecido hepático normal (controle), FHAs, adenomas e CHC foram submetidos ao procedimento de imunofluorescência para determinação das Cxs 26, 32, 43 e Panx 1. Os cortes histológicos foram hidratados e submetidos ao desmascaramento

antigênico em proteinase K, tampão citrato (pH 6,0) ou EDTA (pH 9,0), em banho-maria ou panela de pressão, por 10 a 60 minutos, e lavados 3 vezes em PBS, acrescido de 0,5% de Tween 20. Em seguida, as lâminas foram incubadas, em câmara úmida escura pelo período de 16 horas e à 4°C, com os seguintes anticorpos primários rabbit anti-mouse Cx43, Cx32, Cx26 e Panx1 (todos da Sigma-Aldrich, EUA), os quais tiveram suas concentrações padronizadas. Após incubação, as lâminas foram lavadas 3 vezes em PBS, acrescido de 0,5% de Tween-20. Em seguida, as lâminas foram incubadas com o anticorpo secundário Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG (H+L) (Life Technologies, EUA), na concentração de 10µg/mL (1:200), por 1 hora, em temperatura ambiente. Após incubação, as lâminas foram lavadas 3x em PBS, acrescido de 0,5% de Tween-20, e em seguida, incubadas por 10 min com DAPI (1:1000, diluído em PBS sem Tween), no escuro e em temperatura ambiente. Todas as reações foram acompanhadas de tecidos para o controle positivo de cada anticorpo. O controle negativo foi realizado pela omissão do anticorpo primário da reação e substituição pelo diluente. As lâminas foram observadas e fotografadas em microscópio confocal (Zeiss, Alemanha), para avaliação da distribuição tecidual e localização subcelular das proteínas em tecido hepático normal (animais do grupo controle), bem como nas lesões pré-neoplásicas e tumorais hepáticas dos animais, sendo a análise posterior realizada utilizando o software Leica QWin V3 (Leica Microsystems GmbH, Alemanha).

2.2.3. Imunohistoquímica para Ki-67 e Sirius Red

Outras secções hepáticas foram obtidas e submetidas à reação de imunohistoquímica. Após a desparafinação em estufa (60°C) *overnight* e banhos de xilol, as lâminas foram hidratadas em banhos sucessivos de álcool (100%, 90% e 70%). A seguir, as lâminas foram submetidas a recuperação antigênica em tampão citrato 0,01M (pH 6.0) em câmara de pressão pascal (5 min., 120°C) (Dako Cytomation, Dinamarca). Para o bloqueio da peroxidase endógena e de ligações inespecíficas, as lâminas foram incubadas em soluções 10% de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (20 min.) e 1% de leite desnatado (4°C, 1 h.), respectivamente, ambas diluídas em solução tampão fosfato (PBS). Então, houve aplicação de 100 µl de solução do anticorpo primários anti-Ki-67 (MA5-14520, diluição 1:200, Thermo Scientific, Reino Unido) diluídos em solução de albumina bovina sérica a 1%, seguida de incubação em câmara úmida (4°C, 12 h.). Após três lavagens com PBS (5 min./cada), as lâminas foram incubadas com polímero *horseradish peroxidase* (HRP) de etapa única (EasyPath - Erviegas, Brasil) (20 min.).

A seguir, a revelação da reação foi realizada cobrindo os cortes com solução de 3'3'-diaminobenzidina (DAB, Sigma-Aldrich, EUA). Por fim, a contra-coloração sendo realizada com hematoxilina de Harris a 50%, seguida de desidratação em álcool, xilol e montagem com resina (Permout, Fisher Scientific, EUA) e lâmina.

Para a análise semi-quantitativa de ambos marcadores, foi avaliado o número de hepatócitos Ki-67+ dentro das lesões pré-neoplásicas. No caso das lesões, foi contado o número total de hepatócitos Ki-67+ e dividido pela área total da lesão (mm²). Foram aleatoriamente selecionados 10 campos (objetiva 20×) e os hepatócitos Ki-67+ sendo contados e divididos pela área do campo analisado. Por fim, a análise morfométrica do colágeno foi realizada em cortes corados com Sirius red utilizando o software Leica QWin V3 (Leica Microsystems GmbH, Alemanha), selecionando 10 campos aleatórios (objetiva 20×) por secção (lóbulo esquerdo), compreendendo áreas portal ($\text{Área de colágeno (\%)} = \text{área Sirius red} / \text{total } 20\times \text{ área de campo}$).

2.2.4 Microdissecção a laser

O tecido hepático congelado normal (animais controle) e tratado contendo FHAs, adenomas e CHC, foi seccionado em cortes (5 µm) em criostato (Jung CM3000, Leica, EUA) e montado em uma membrana-revestida 1 mm PEN slides (Zeiss-Jena, Alemanha). Anteriormente ao uso, os cortes foram tratados por 30 min com uma solução contendo RNase, conforme recomendação do fabricante (Zeiss-Jena, Alemanha). Após a primeira seção ser montada, o corte foi mantido em uma criocâmara (-18°C) até que os cortes seguintes fossem obtidos. O maior número de cortes possível foi colocado sobre as membranas (slides). O corte e montagem foram realizados da maneira mais rápida possível afim de assegurar boa aderência à membrana. Os cortes sobressalentes e não fixados a membrana foram imediatamente armazenados a -80°C. As membranas contendo os cortes foram corados com cristal violeta de acordo com as instruções do fabricante (LCM Staining Kit - LifeTech, CA, EUA). Um microscópio de captura a laser (PALM - Zeiss, Jena, Alemanha) foi utilizado para a análise. Para a coloração dos cortes, utilizou-se 3 banhos sequenciais de 20 segundos cada em diferentes concentrações de álcool, terminando com cristal violeta por 30 segundos. Dois banhos adicionais de álcool foram feitos após a passagem no corante. Posteriormente, as membranas foram secas em uma sala à temperatura ambiente durante 5 minutos anteriormente a leitura. As áreas de interesse (FHAs, adenomas e CHC) foram capturadas através do derretimento focal da membrana através da ativação de laser. As tiras de tecido contidas na solução de estabilização

de RNA foram diretamente armazenadas -80°C com a tampa abaixada. Tiras na solução tampão foram agitadas em equipamento tipo Vórtex por 45s e armazenadas a -80°C.

2.3 RT-qPCR (em andamento)

2.3.1 Extração de RNA e Transcrição Reversa

A expressão gênica das Cxs 26, 32 e 43 e *Panx1* em lesões pré-neoplásicas (microdissecadas) ou neoplásicas (macrodissecadas) hepáticas estão sendo processadas para análise em PCR em tempo real. O RNA total está sendo extraído das amostras micro ou macrodissecadas utilizando os kits Single Cell-to-CT (LifeTech, CA, USA) e Illustra RNAspin Mini (GE Healthcare, USA), respectivamente. Em seguida, será avaliada a integridade do RNA por eletroforese em gel de agarose 1,5% (60V, 1,5 hora). Após eletroforese, a integridade e concentração do RNA será determinada pela visualização das bandas 28S e 18S sob luz UV (Chemidoc MP Imaging System, Bio-Rad Laboratories, USA) e por fluorimetria (Qubit 3.0 Fluotometer, Life Technologies, USA), respectivamente. Uma alíquota contendo 1000 ng/μL será utilizada para a confecção do cDNA (DNA complementar) por transcrição reversa. Brevemente, a transcrição reversa consiste em sucessivas incubações em termociclador, onde, inicialmente, os possíveis resquícios de DNA na amostra são eliminados pela ação da DNase I; são eliminadas e/ou inativadas proteases que possam degradar o RNA; são fornecidas bases nitrogenadas e, finalmente, as amostras são incubadas com a enzima Transcriptase Reversa (Superscript II, Thermo Fisher Scientific, USA) para a confecção da fita de cDNA. Após a transcrição reversa, o cDNA obtido será armazenado a -20°C até o momento da reação de PCR em tempo real.

2.3.2 Reação de PCR em Tempo Real

A análise por PCR em tempo real será realizada no aparelho LightCycler® 96 (Roche Life Science, USA). O mix para análise será preparado com 5 μL de amostra do cDNA adicionado ao reagente TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied-Life Technologies, USA), acrescido de água livre de endonucleases e os assays. A reação transcorrerá nas seguintes condições de amplificação: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos; 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 55°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto e uma extensão final a 72°C por 5 minutos. Todas as amostras serão analisadas em duplicidade. Os valores de ΔC_q resultantes das amostras de interesse serão normalizados com os resultados obtidos para os controles endógenos

(GAPDH e 18S), produzindo valores de ΔCq . A análise dos resultados será realizada conforme descrito por LIVAK; SCHMITTGEN, (2001), onde a expressão relativa dos genes é determinada por $2^{-\Delta\Delta Cq}$.

2.4 Análise sérica de Alanina amino transferase (ALT)

Na ocasião das eutanásias, o sangue foi coletado através de punção cardíaca, centrifugado (1500×g, 15 min.) e as amostras de soro armazenadas (-20°C). A dosagem de ALT foi avaliada, espectrofotometricamente, utilizando kits comerciais seguindo as instruções do fabricante (Apparat, Brasil).

2.5 Análises estatísticas

Os dados contínuos foram inicialmente comparados com a curva de Gauss através do teste de distância K-S. Quando paramétricos, os dados foram representados através da média e desvio padrão. Estes dados foram analisados pelo teste *t* de Student não pareado ou ANOVA. Quando não-paramétricos, os dados foram representados através de mediana e percentil e analisados pelo teste de Mann-Whitney. Foi aceito neste estudo risco alfa menor ou igual a 5% ($p < 0,05$).

3. Resultados e discussão considerando os diferentes períodos de eutanásia

3.1 Dados gerais da primeira eutanásia (17 semanas)

Os animais submetidos ao protocolo DEN+CCl₄ não apresentaram diferença estatística na evolução de peso corpóreo ($P=0.1510$) durante a semanas 5 à 17 (Fig. 9A), comparado com o grupo controle, como previamente relatado em experimento anterior (ROMUALDO et al., 2018, 2020). Entretanto, o peso corpóreo dos animais do grupo DEN/CCl₄ foi significativamente menor ($P= 0,0253$) que a do grupo controle ao final da semana 17 (Fig. 9C). Além disso, os animais submetidos ao protocolo DEN+CCl₄ apresentaram peso hepático absoluto similares aos do grupo controle ($P=0,9474$), enquanto o peso hepático relativo foi significativamente maior ($P=0,0031$) em relação ao grupo controle (Fig. 9C). No trabalho de UEHARA et al. (2013), utilizando protocolo similar de DEN+CCl₄ em camundongos B6C3F1/J, demonstraram maior porcentagem de peso hepático relativo no grupo DEN+CCl₄ no período de eutanásia de 17 semanas de vida. Em trabalho anterior, ROMUALDO et al. (2018), também observaram maiores valores médios de peso hepático relativo no grupo

DEN+CCl₄ com 17 semanas de vida, devido ao fator de toxicidade relacionado as aplicações de CCl₄. No que diz respeito a lesões hepáticas macroscópicas, 93.33% dos animais submetidos ao protocolo DEN+CCl₄ apresentaram lesões nodulares em relação ao grupo controle ($P<0.001$). O número médio de lesões macroscópicas foi pequeno nesta fase de indução, mas sua multiplicidade foi significativamente maior ($P=0.0008$) em relação ao grupo controle (Fig. 9C). As lesões nodulares demonstraram elevada incidência assim como já vista em trabalho anterior (ROMUALDO et al., 2018), onde ocorreu 100% de incidência e multiplicidade significativa de lesões nodulares nos animais submetidos ao protocolo com DEN/CCl₄.

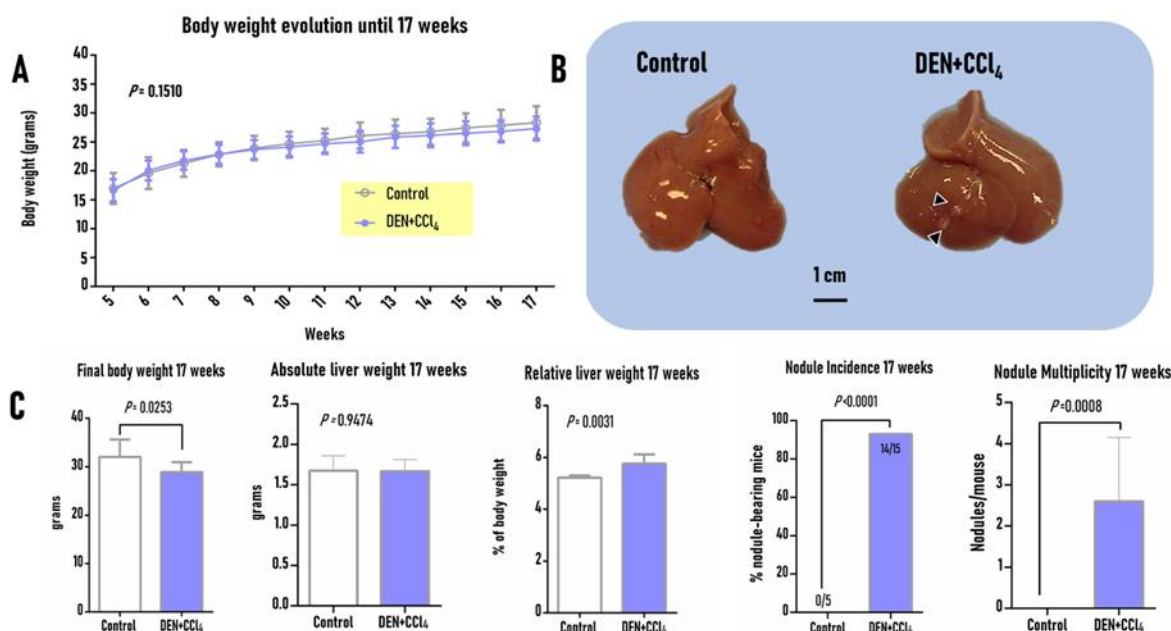


Figura 9. Dados gerais no protocolo DEN+CCl₄ ao final da semana 17. (A) Evolução de peso corpóreo durante as semanas 5 a 17; (B) Fotos representativas macroscópicas Fígado DEN+CCl₄ contendo nódulos macroscópicos (flecha); (C) Dados sobre corpóreo peso final, peso absoluto e peso relativo hepático, incidência e multiplicidade de nódulos comparações grupo DEN+CCl₄ e controle. n = 5 (Controle) ou 15 (DEN+CCl₄) camundongos/grupo. Dados expressos por média desvio padrão ou incidência de lesões em animais. Evolução de peso corpóreo analisada por ANOVA de duas vias e teste *post hoc* Bonferroni. Incidência analisada por teste de Fisher. Outros dados analisados por teste t Student ou teste de Mann-Whitney ($P<0,05$).

3.1.1 Histopatologia de lesões pré-neoplásicas e neoplásicas na primeira eutanásia (17 semanas)

Todos os animais (100%, $P < 0,001$) submetidos ao protocolo DEN+CCl₄ desenvolveram FHAs basofílicos com multiplicidade significativa ($P = 0,0001$) em relação aos FHAs eosinofílicos e de células claras. No entanto, no trabalho anterior de Romualdo et al. (2018) tendo observado que os FHAs basofílicos eram a lesão predominante, os autores relataram menor incidência e multiplicidade de focos eosinofílicos, mas maior incidência e multiplicidade de FHAs de células claras. Em outro trabalho, Uehara et al. (2013), com protocolo similar de 17 semanas, os autores detectaram incidência elevada de FHAs (100 %) , bem como 40% de incidência de adenomas hepatocelulares e 20% de CHC. No nosso estudo, encontramos incidência baixa ($P = 0,539$) e pequena multiplicidade ($P = 0,2241$) de adenomas, sem diferença estatística em relação ao grupo controle, correspondendo apenas a 5,66% da proporção das lesões identificadas (Figs. 10B, C e D). A predominância de FHAs basofílicos pode ser explicada pelo *turnover* metabólico que os FHAs dos fenótipos células claras e eosinofílico sofrem partindo de um estado anabólico da glicose para um estado catabólico que tem como objetivo a sustentação da proliferação celular, levando ao aparecimento de FHAs basofílicos (BANNASCH; KLIMEK; MAYER, 1997; LAHM et al., 2002; QIN SU; BANNASCH, 2003). Quando se utiliza a aplicação da DEN em camundongos neonatos, observa-se uma ocorrência mais rápida de lesões pré-neoplásicas e neoplásicas quando comparada a uma iniciação da carcinogênese hepática em animais adultos (VESSELINOVITCH et al., 1984). De uma maneira geral, nota-se uma predominância de FHAs e de poucos adenomas nos animais neste primeiro ponto de eutanásia.

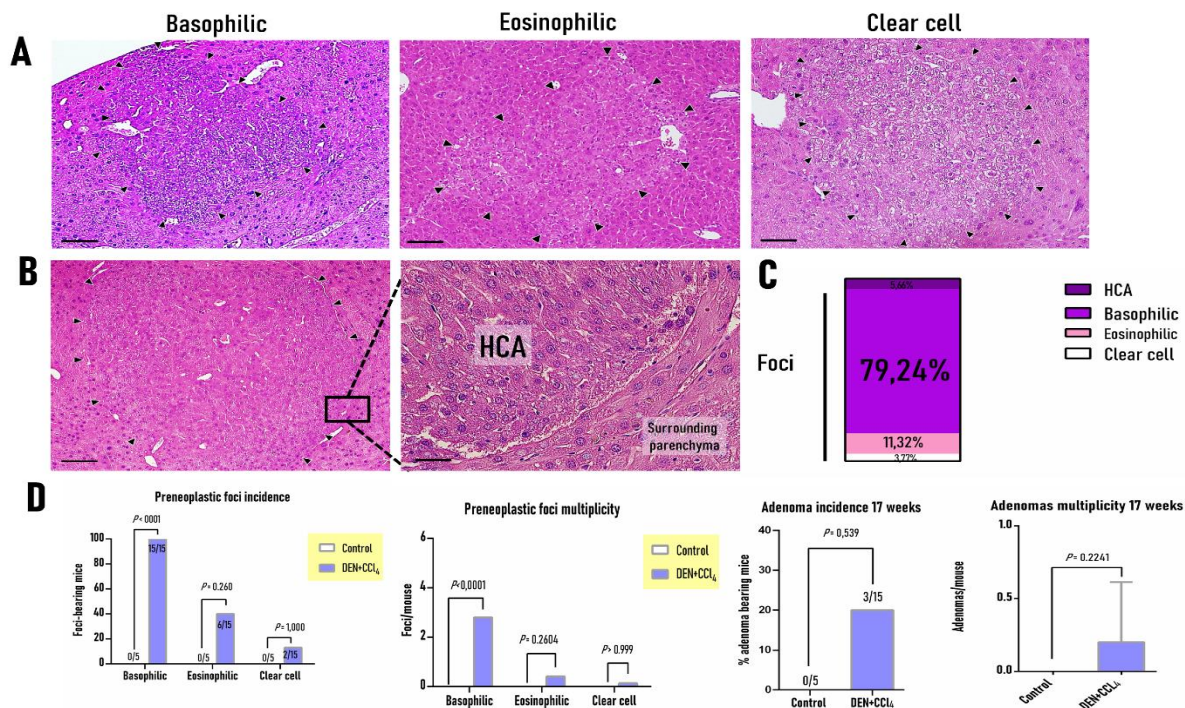


Figure 10. Lesões Pré-neoplásicas e neoplásicas na eutanásia da semana 17. Aspecto microscópico representativo (HE) de (A) diferentes fenótipos de focos pré-neoplásicos (pontas de seta, barra de escala: 50 μ m) e (B) adenoma hepatocelular (HCA) (pontas de seta, barra de escala: 100 μ m). Adenoma demonstrando perda típica da arquitetura lobular normal e compressão do parênquima circundante (detalhe, barra de escala: 20 μ m). Dados sobre a (C) proporção média, (D) incidência e multiplicidade de lesões (pré) neoplásicas. n = 5 (Controle) ou 15 (DEN/CCl₄) camundongos/grupo. Os dados são expressos em Média desvio padrão ou a proporção de camundongos portadores de lesões. Os dados foram analisados pelo teste de Fisher, teste t Student ou teste de Mann-Whitney ($P < 0,05$).

3.2 Dados gerais da segunda eutanásia (30 semanas)

A aplicação continuada do CCl₄ até a 29ª semana de vida, no geral, não exerceu efeitos significativos na evolução do peso corporal dos animais ($P = 0,0967$) em comparação com o grupo controle, no intervalo entre as semanas 5 a 30 (Fig. 11A), com uma diferença significativa apenas na semana 20 ($P = 0,0282$). O tratamento DEN+CCl₄ resultou em aumento significativo do peso corporal final dos animais ($P = 0,0384$), peso absoluto do fígado ($P < 0,0001$), e também do peso relativo do fígado ($P = 0,0001$), ao final da 30ª. semana de vida. Esse aumento de peso relativo do fígado também foi observado em grupo de camundongos submetido a um protocolo de DEN-CCl₄ similar ao nosso e previamente publicado por UEHARA et al., (2013), porém até 22 semanas de vida somente. Além disso em nosso estudo, 100% ($P < 0,001$) dos camundongos C3H/He apresentaram múltiplas lesões hepáticas nodulares ($P = 0,0001$) (Figs. 11B e C). O aumento de peso hepático absoluto e relativo observado neste momento experimental se deve

ao desenvolvimento das lesões macroscópicas em virtude da continuidade de CCl₄, que induz ciclos de necrose/proliferação celular regenerativa, inflamação e fibrose nos animais.

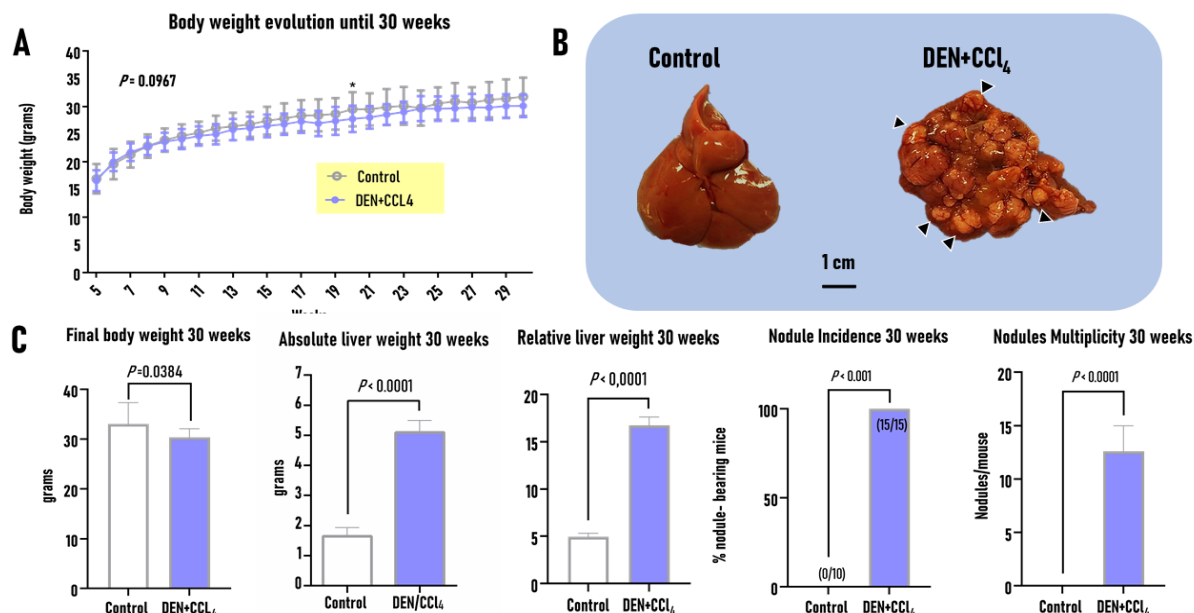


Figura 11. Dados gerais no protocolo DEN+CCl₄ médio (30 semanas). (A) Curva de evolução do peso corpóreo das semanas 5 a 30; (B) Aspecto macroscópico hepático representativo, mostrando um grande número de nódulos macroscópicos (pontas de seta) em camundongos tratados com DEN/CCl₄; (C) Dados sobre o peso corporal final, pesos absolutos e relativos do fígado, incidência e multiplicidade de nódulos macroscópicos. $n = 10$ (Controle) ou 15 (DEN/CCl₄) camundongos/grupo. Os dados são expressos em Média $\pm$ desvio padrão ou a proporção de camundongos portadores de lesões. A curva de evolução do peso corporal foi analisada por ANOVA de duas vias e teste *post-hoc* Bonferroni. Os dados de incidência foram analisados pelo teste de Fischer, enquanto outros dados foram analisados pelo teste t Student ou teste de Mann-Whitney ($P < 0,05$).

3.2.1 Lesões neoplásicas na segunda eutanásia (30 semanas).

Neste ponto experimental foi observado maior incidência e multiplicidade de adenomas ($P < 0,001$) quando comparados aos CHC. Ainda em relação a incidência de lesões hepatocelulares, 100% dos animais exibiram adenomas, enquanto 40% dos mesmos desenvolveram CHC (Fig. 12B). Em matéria de multiplicidade, os animais desenvolveram maior número ($P = 0,0001$) de adenomas do que CHC. Do total de lesões identificadas nos cortes histológicos, 96,31% foram diagnosticadas como adenomas e 3,69% como CHC (Fig. 12C). Estudos como os de CHAPPELL et al. (2014) e UEHARA et al. (2013), mesmo trabalhando com tempos de análise menores (até 22 semanas de vida), também observaram taxa de 100%

de incidência de adenomas em camundongos, além de uma maior incidência de CHC (50% em ambos trabalhos).

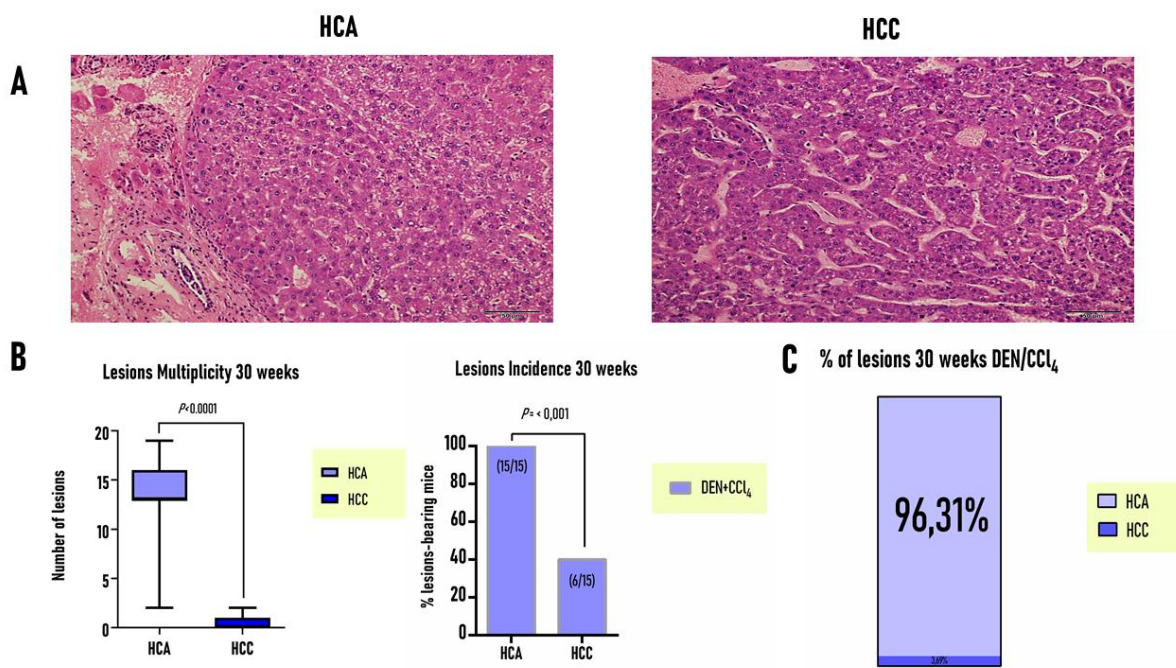


Figura 12. Diagnóstico das lesões neoplásicas protocolo DEN+CCl₄ médio (30 semanas). (A) Fotos representativas de HCA, HCC Coloração em HE (ampliação de 20x). (B) Multiplicidade e incidência de lesões. n = 10 (controle) e 15 (DEN+CCl₄) camundongos/grupo. (C) Proporção média de lesões. Os dados são expressos como *Box* e *Whiskers* para multiplicidade de lesões e Média $\pm$ desvio padrão para a proporção de camundongos portadores de lesões. A multiplicidade das lesões foi analisada pelo teste de Mann-Whitney. Os dados de incidência foram analisados pelo teste de Fisher, bem como os dados da proporção média ($P < 0,05$).

3.3 Dados gerais da última eutanásia DEN+CCl₄ interrompido (47 semanas)

Os animais do protocolo DEN+CCl₄, com interrupção da aplicação de CCl₄ na semana 29, apresentaram evolução de peso corpóreo similar ($P = 0,3248$) ao grupo controle durante o período entre as semanas 5 a 47 (Fig. 13A). Ao final deste período, o grupo DEN+CCl₄ interrompido apresentou peso corpóreo similar ($P = 0,1288$) ao do grupo controle, mas em relação aos pesos hepáticos absoluto ($P < 0,0001$) e relativo do fígado ($P = 0,0001$) mostrou valores médios maiores que os do grupo controle.

Todos os animais (100%) do grupo DEN-CCl₄ interrompido desenvolveram múltiplas lesões macroscópicas no fígado ($P = 0,0001$) (Figs. 13B e C) em relação ao grupo controle.

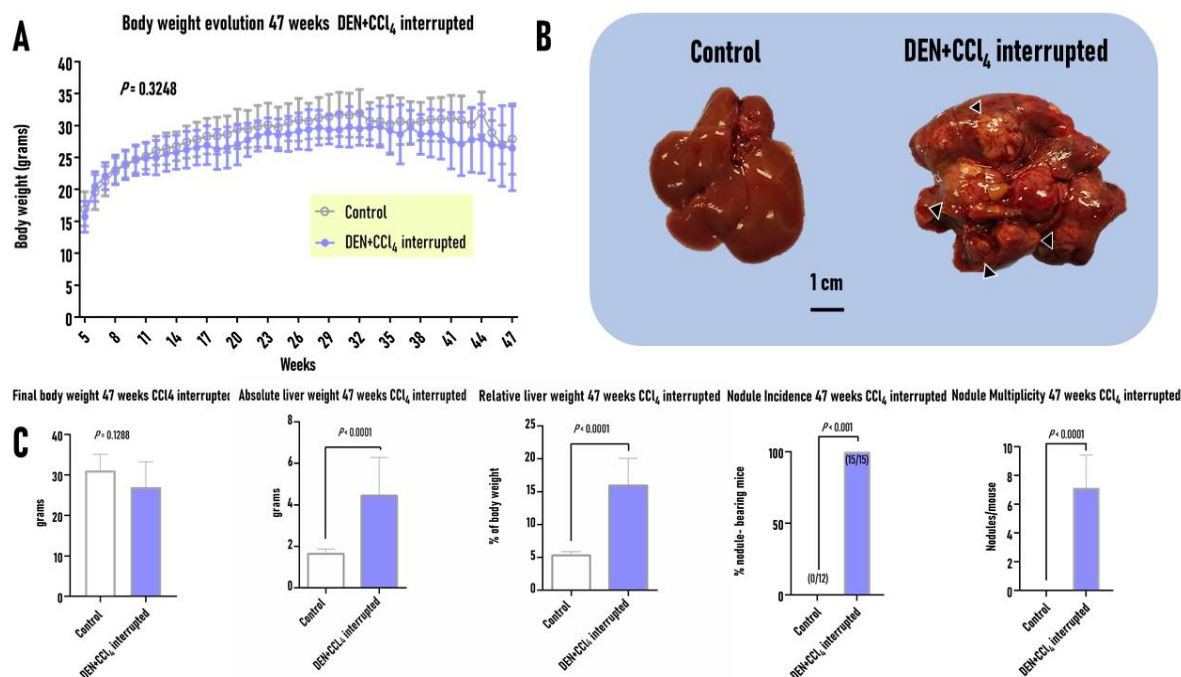


Figura 13. Dados gerais no protocolo tardio DEN+CCl₄ interrompido (47 semanas). (A) Curva de evolução de peso corpóreo das semanas 5 a 47; (B) Aspecto representativo macroscópico hepático, mostrando grandes nódulos macroscópicos (pontas de seta) em camundongos DEN/CCl₄ interrompido; (C) Dados sobre o peso corpóreo final, pesos absolutos e relativos do fígado, incidência e multiplicidade de nódulos macroscópicos. $n = 12$ (Controle) ou 15 (DEN/CCl₄ interrompido) camundongos/grupos. Os dados são expressos em Média $\pm$ desvio padrão ou a proporção de camundongos portadores de lesões. A curva de evolução do peso corporal foi analisada por ANOVA de duas vias e teste *post-hoc* Bonferroni. Os dados de incidência foram analisados pelo teste de Fischer, enquanto outros dados foram analisados por teste Student t ou teste de Mann-Whitney ($P < 0,05$).

3.3.1 Lesões neoplásicas no grupo DEN+CCl₄ interrompido

No grupo DEN+CCl₄ interrompido, todos os animais (100%) desenvolveram adenomas ($P < 0,001$) e 86,6% dos animais apresentaram CHC ($P < 0,001$). Não houve diferença significativa em relação à incidência entre adenomas e CHC nos animais submetidos a este protocolo ($P = 0,483$). Entretanto, a multiplicidade de adenomas foi significativamente maior ($P < 0,0029$) do que a de CHC (Figura 14B). Em relação a proporção total de lesões neste grupo, a maioria foi de adenomas (66%) e a minoria de CHC (34%) (Fig. 14C).

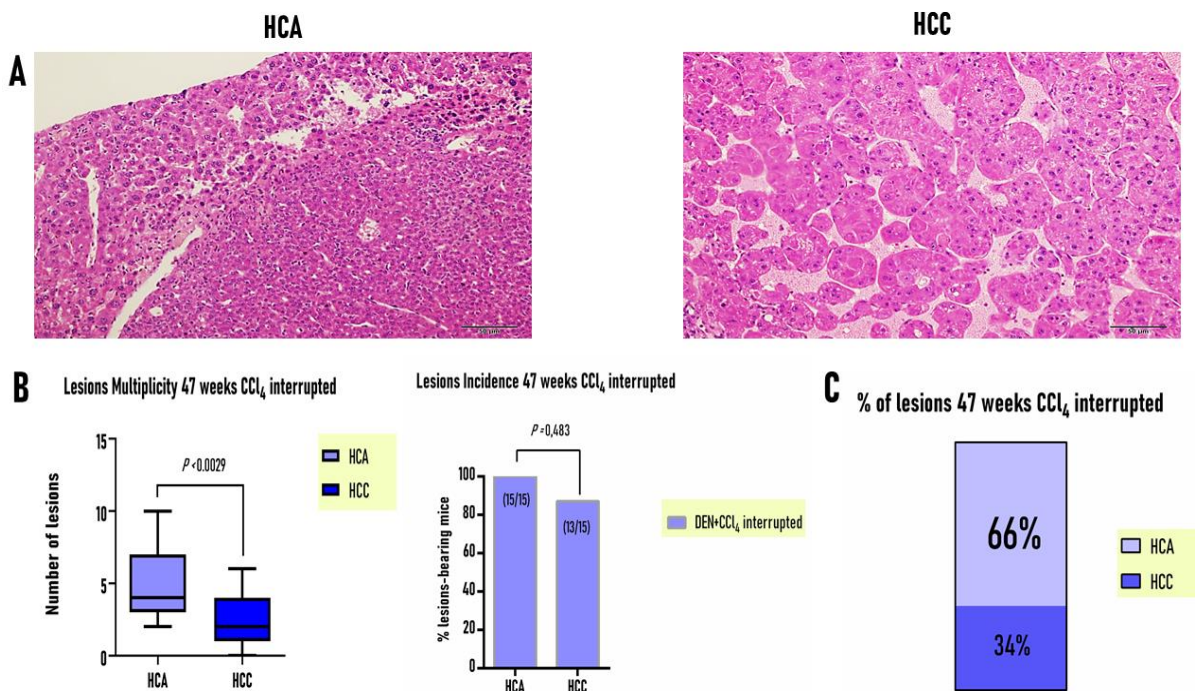


Figura 14. Diagnóstico das lesões neoplásicas protocolo tardio DEN+CCl₄ interrompido (47 semanas). (A) Imagens representativas de AHC, CHC coloração em HE (ampliação de 20x). (B) Multiplicidade e incidência de lesões. n = 12 (controle) e 15 (DEN+CCl₄ interrompido) camundongos/grupo. (C) Proporção média de lesões. Os dados são expressos como *Box* e *Whiskers* para multiplicidade de lesões e Média $\pm$ desvio padrão para a proporção de camundongos portadores de lesões. A multiplicidade das lesões foi analisada por Mann-Whitney. Os dados de incidência foram analisados pelo teste de Fisher, bem como os dados de proporção média ($P < 0,05$).

3.3.2 Dados gerais da última eutanásia DEN+CCl₄ contínuo (47 semanas)

O grupo DEN+CCl₄ contínuo (Fig. 15A) mostrou evolução do peso corporal, em geral, semelhante ao grupo controle nas semanas 5 a 47 ($P = 0,3248$), exceto nas semanas 31 ($P = 0,0022$) e 32 ($P = 0,0012$) onde apresentou peso corpóreo menor que a do grupo controle. Na semana 47, os pesos corpóreos finais dos dois grupos (controle e DEN/CCl₄) foram semelhantes ($P = 0,1686$) (Fig. 15C). Os pesos absolutos ($P < 0,0001$) e relativo ($P < 0,0001$) do fígado foram maiores no grupo DEN+CCl₄ contínuo em relação ao grupo controle (Fig. 15C). Todos os animais do grupo DEN+CCl₄ contínuo (100%) exibiram nódulos hepáticos macroscópicos ($P < 0,001$) com multiplicidade significativa ($P < 0,0001$) (Fig. 15C).

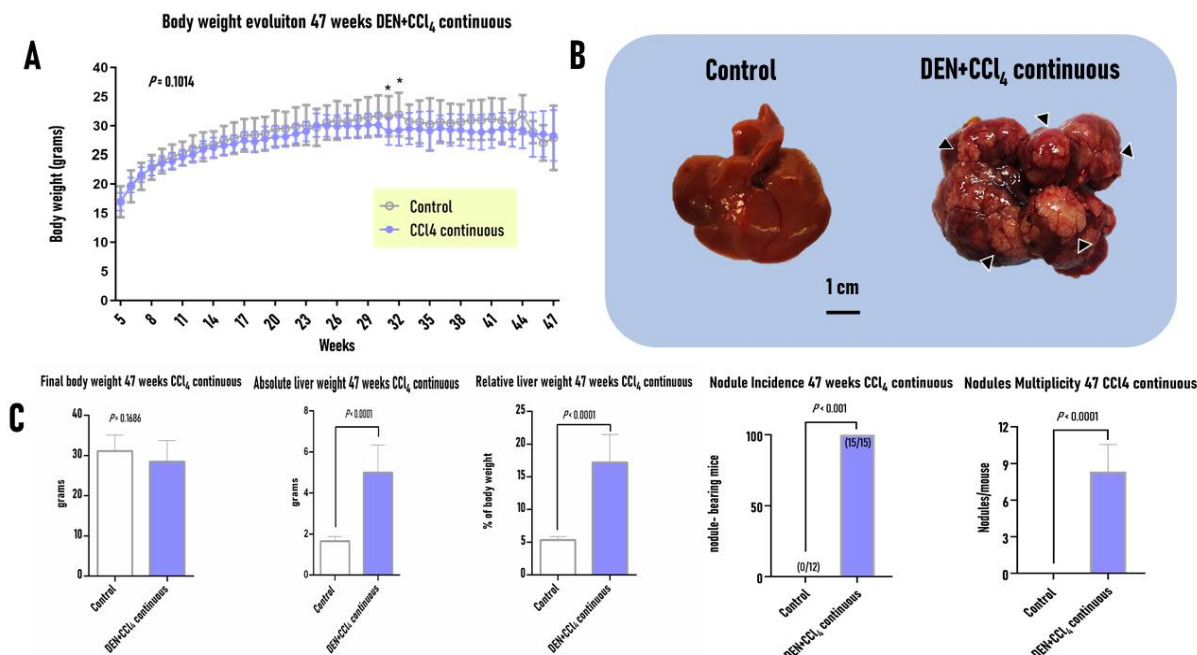


Figure 15. Dados gerais no protocolo tardio DEN+CCl₄ contínuo (47 semanas). (A) Curva de evolução do peso corpóreo das semanas 5 a 47; (B) Aspecto representativo macroscópico hepático, mostrando proeminentes nódulos macroscópicos (pontas de seta) em camundongos DEN/CCl₄ contínuos; (C) Dados sobre o peso corporal final, pesos absolutos e relativos do fígado, incidência e multiplicidade de nódulos macroscópicos. n = 12 (Controle) ou 15 (DEN/CCl₄ contínuo) camundongos/grupo. Os dados são expressos em Média ± desvio padrão ou a proporção de camundongos portadores de lesões. A curva de evolução do peso corpóreo foi analisada por ANOVA de duas vias e teste *post-hoc* Bonferroni. Os dados de incidência foram analisados pelo teste de Fisher, enquanto outros dados foram analisados pelo teste t Student ou teste de Mann-Whitney (P<0,05).

3.3.3 Lesões neoplásicas no grupo DEN+CCl₄ contínuo

Na semana 47, todos os animais (100%) do grupo DEN+CCl₄ contínuo desenvolveram adenomas (P<0,001) e 93,3% dos animais apresentaram CHC (P<0,001) (Fig. 16B), quando comparado com o grupo controle. Não houve diferença significativa entre a incidência de adenomas e carcinomas no grupo DEN+CCl₄ contínuo. Em relação a multiplicidade, os adenomas se apresentaram em maior número do que os CHC (P < 0,0086) (Fig. 16B). Em relação a proporção de lesões no grupo DEN/CCl₄ contínuo, a maioria das lesões diagnosticadas foram de adenomas (66,5%) e a minoria de CHC (33,5%) (Fig. 16C).

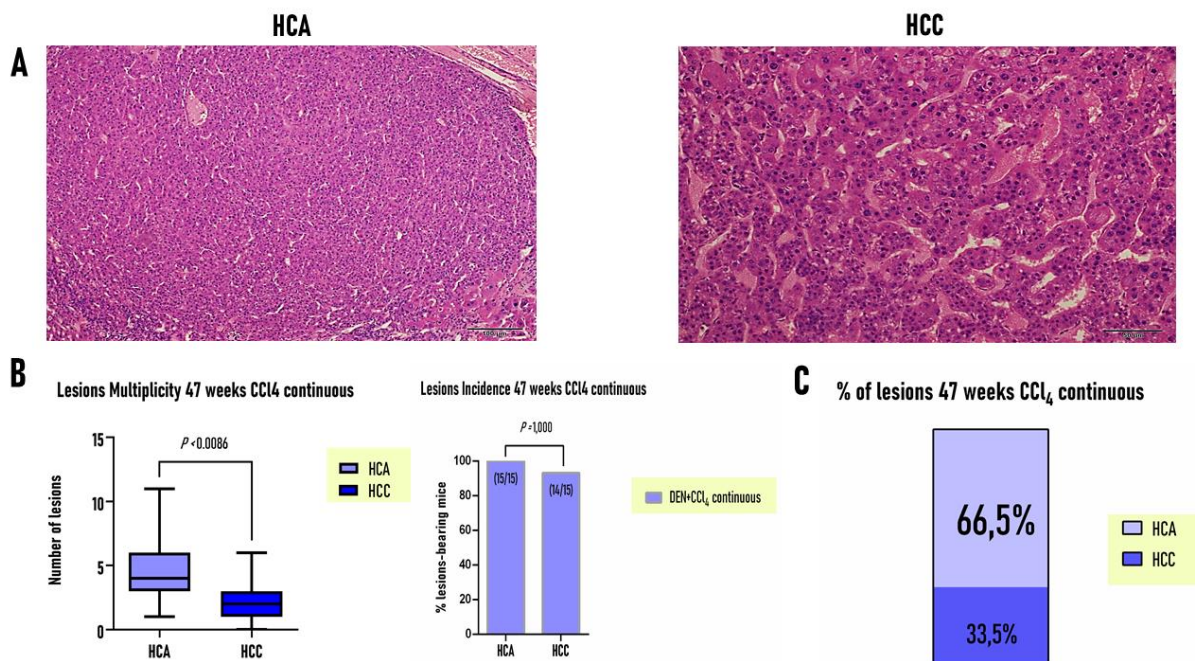


Figura 16. Diagnóstico das lesões neoplásicas protocolo tardio DEN+CCl₄ contínuo (47 semanas). (A) Imagens representativas coloração HE de AHC (ampliação de 10x), e CHC também em HE (ampliação de 20x). (B) Multiplicidade e incidência de lesões. n = 12 (controle) e 15 (DEN+CCl₄ contínuo) camundongos/grupo. (C) Proporção média de lesões. Os dados foram expressos como *Box* e *Whiskers* para multiplicidade de lesões e Média $\pm$ desvio padrão para a proporção de camundongos portadores de lesões. A multiplicidade das lesões foi analisada por teste t Student. Os dados de incidência foram analisados pelo teste de Fisher, bem como os dados de proporção média das lesões ($P < 0,05$).

3.4 Comparações dados lesões nodulares macroscópicas grupos DEN+CCl₄ (todos os períodos)

Em relação a multiplicidade de nódulos hepáticos, ambos os grupos DEN+CCl₄ (interrompido e contínuo) apresentaram número maior de nódulos macroscópicos ($P < 0,0001$) quando comparado com primeira eutanásia (17 semanas) (Fig. 17A). Além disso, ambos os grupos de 47 semanas apresentaram menor número de nódulos macroscópicos do que na eutanásia da 30ª semana ($P < 0,0001$). No entanto, quando se avalia as dimensões de tamanho dessas lesões, nota-se que o tamanho dos nódulos macroscópicos no grupo DEN+CCl₄ interrompido foram maiores do que do grupo da eutanásia na semana 30 ($P = 0,0101$), mas nenhuma diferença foi observada para o grupo CCl₄ contínuo ($P = 0,3999$). Ainda sobre tamanho das lesões nodulares, o grupo DEN+CCl₄ contínuo não apresentou diferença significativa em relação ao grupo da eutanásia da semana 30 ($P = 0,6049$) (Figura 17B). A incidência de nódulos macroscópicos foi similar em todos os períodos de eutanásia analisados ($P = 1.000$) dentro do grupo DEN/CCl₄ para cada comparação (Fig. 17C).

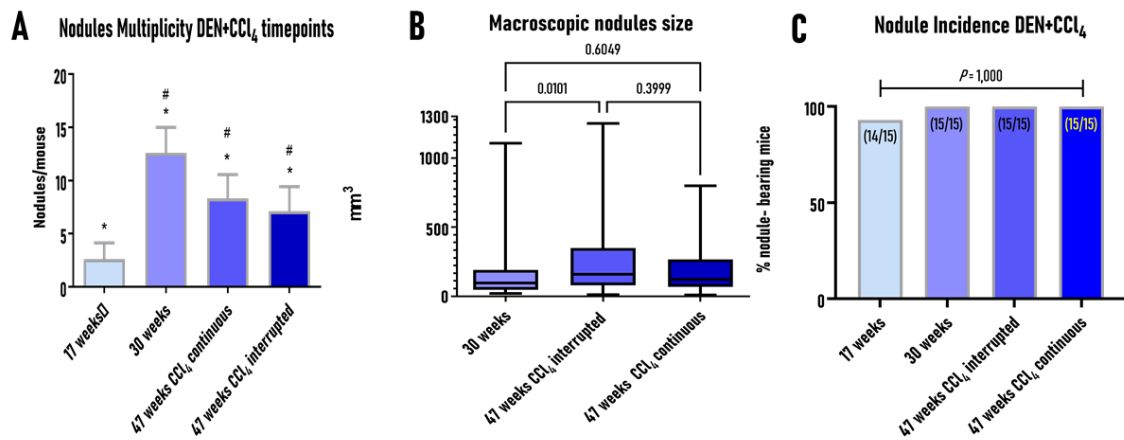


Figura 17. Comparações lesões nodulares macroscópicas grupos DEN+CCl₄ (A) Multiplicidade de nódulos grupos DEN+CCl₄; (B) Tamanho dos nódulos macroscópicos grupos DEN+CCl₄; (C) Incidência de nódulos grupos DEN+CCl₄. Os dados foram expressos em Média ± desvio padrão ANOVA de uma via seguido por teste *post-hoc* Tukey, teste de Kruskal-Wallis e teste *post-hoc* Dunn. Dados de Incidência analisados pelo teste de Fischer ($P < 0,05$).

3.4.1 Comparações dados de peso corpóreo grupos DEN+CCl₄ (todos os períodos)

O peso corporal não mostrou qualquer diferença significativa nas diferentes semanas de eutanásia ($P = 0,4177$) no grupo DEN/CCl₄ (Fig. 18A). Os pesos relativos e absolutos do fígado do grupo DEN+CCl₄ foi maior nos pontos de eutanásia das semanas 30 e 47 em relação a semana 17 ($P < 0,0001$ e $P < 0,0001$) (*) (Fig. 18B e 18C).

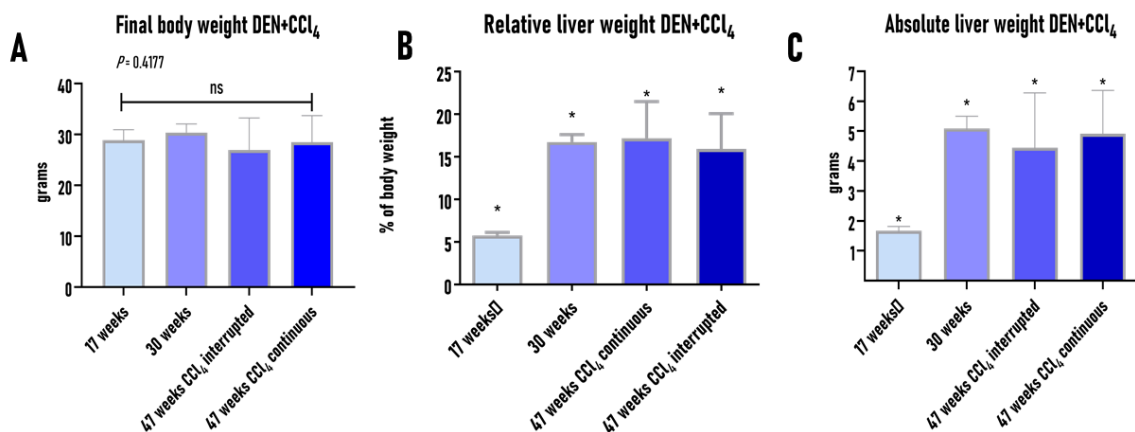


Figura 18. Comparações dados de peso corpóreo grupos DEN+CCl₄ (A) Peso corpóreo final grupos DEN+CCl₄. (B) Peso relativo do fígado grupos DEN+CCl₄ (C) Peso absoluto hepático grupos DEN+CCl₄. Os dados foram expressos em Média ± desvio padrão para peso final Kruskal-Wallis seguido por teste *post-hoc* Dunn. Para dados de peso relativo hepático e peso absoluto final, ANOVA de uma via e teste *post hoc* de Tukey ($P < 0,05$).

3.4.2 Comparativo de lesões neoplásicas grupo DEN+CCl₄ (todos os períodos)

Em relação à multiplicidade de adenomas, o grupo de eutanásia na semana 30 apresentou maior número médio quando comparado ao grupo de CCl₄ contínuo ($P < 0,0001$) e CCl₄ interrompido ($P = 0,0006$) na semana 47. Não houve diferença significativa na multiplicidade de adenomas quando comparados os grupos CCl₄ (interrompido e contínuo) na semana 47 ($P > 0,9999$). Com respeito o CHC, o grupo CCl₄ interrompido ($P = 0,0006$) e CCl₄ contínuo ($P = 0,0026$) exibiram maior número de lesões do que o grupo da semana 30, mas sem demonstrar diferença significativa quando comparados entre si ($P > 0,9999$). Em proporções médias, na eutanásia da semana 30 houve a predominância de adenomas com apenas 3,69% de CHC. Contudo, 34% de CHC foi observado no grupo CCl₄ interrompido e 33,5% em CCl₄ contínuo (Figura 19B).

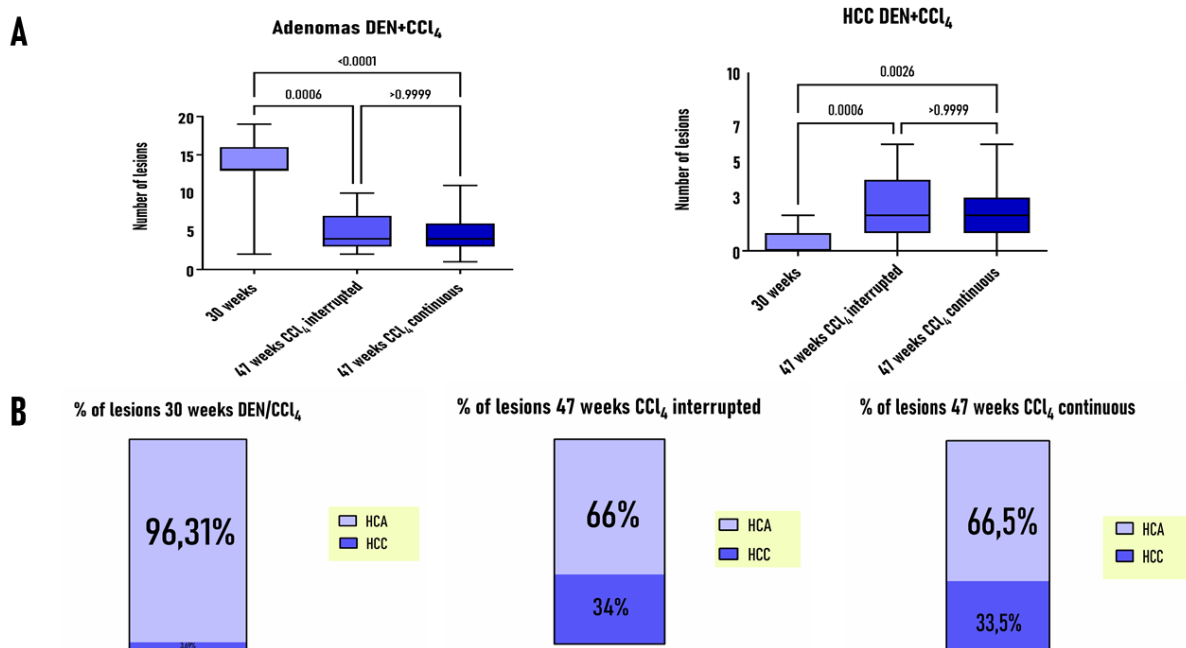


Figura 19. Comparativos lesões neoplásicas grupos DEN+CCl₄. (A) Multiplicidade de adenomas e CHC no grupo DEN+CCl₄ nos diferentes pontos de eutanásia. (B) Proporção das lesões nos diferentes pontos de eutanásia no grupo DEN+CCl₄. Dados expressos em Box e Whiskers para multiplicidade das lesões que foram analisadas por teste Kruskal-Wallis teste *post hoc* de Dunn $n = 15$ (DEN+CCl₄) camundongos/grupo. Proporção das lesões foi analisada pelo teste de Fisher ($P < 0,05$).

De uma maneira geral, nota-se que o tempo de tratamento não influenciou a incidência de nódulos macroscópicos ao longo dos períodos de eutanásia, mantendo-se sempre uma incidência alta e constante. Com relação a multiplicidade e tamanho destes nódulos, a influência do tempo de tratamento aparece de forma mais marcante nas eutanásias das semanas 30 e 47.

No entanto, a maior multiplicidade de nódulos observada em 30 semanas não reflete necessariamente a presença de lesões de maior gravidade, visto que as maiores porcentagens de CHC apareceram na últimas eutanásias da semana 47. O CCl_4 , devido a seu efeito fibrótico e promotor na hepatocarcinogênese, aumenta a incidência de tumores hepáticos (DRAGANI; MANENTI; DELLA PORTA, 1986). Porém, quando se considera o maior tempo de tratamento com o CCl_4 no grupo contínuo na semana 47, nota-se que o grupo CCl_4 interrompido também exibiu porcentagem próxima no que diz respeito a presença de CHC e adenomas, não evidenciando, até o momento, uma influência direta de uma maior exposição dos animais ao CCl_4 no surgimento de tumores hepáticos.

3.5 Análise suplementar de pulmão nas eutanásias da semana 47

Embora sem diferença na incidência (Figura 20B), no grupo DEN+ CCl_4 interrompido observamos maior número (multiplicidade) ($P=0,0482$) de lesões pulmonares do que no grupo contínuo. Não foram detectadas lesões pulmonares no grupo controle.

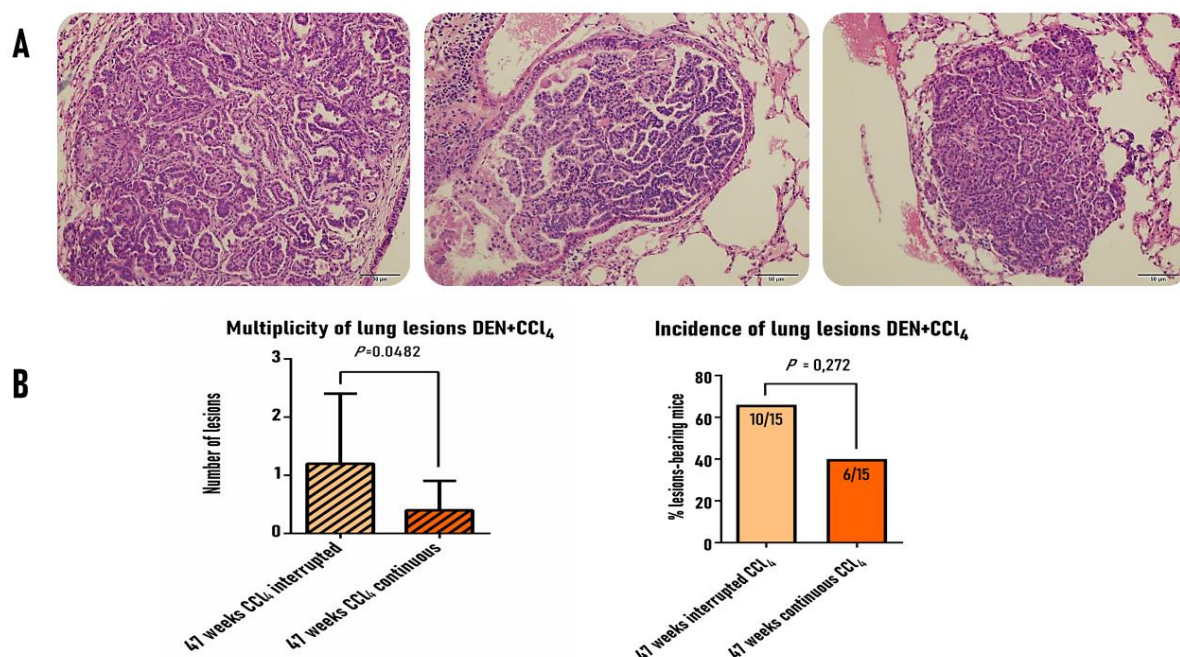


Figura 20. Análise suplementar pulmão (A) Fotos representativas de pulmão em HE (aumento 20x). (B) Multiplicidade e incidência das lesões pulmonares. Dados expressos em Média $\pm$ desvio padrão. Teste Mann-Whitney foi utilizado para multiplicidade e incidência foi calculada pelo teste de Fischer ($P<0.005$).

3.6 Resultados e discussão ALT

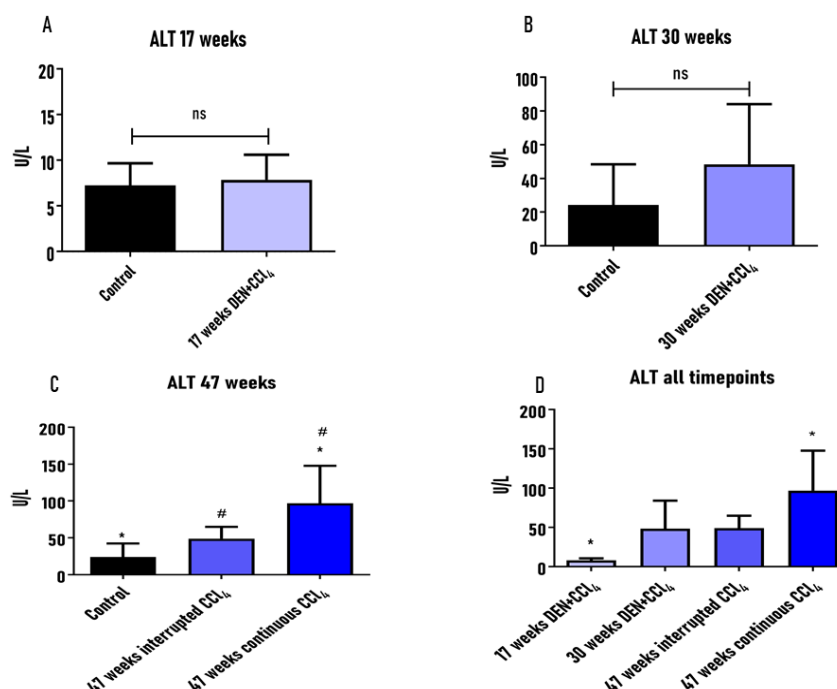


Figura 21. Análise ALT considerando timepoints (A) ALT considerando o período de eutanásia de 17 semanas DEN+CCl₄ vs controle. (B) ALT período de eutanásia de 30 semanas DEN+CCl₄ vs controle. (C) ALT período de eutanásia de 47 semanas DEN+CCl₄ vs controle. (D) ALT considerando todos os períodos de eutanásia DEN+CCl₄. Dados foram expressos em média $\pm$ desvio padrão. Mann-Whitney ou teste t não pareado para 2 grupos. Considerando 3 ou mais grupos, ANOVA uma via seguido por teste *post hoc* Holm-Sidak ($P < 0.005$). $n = 8$ camundongos/grupo.

Ao longo de décadas, níveis séricos de amino transferases como a alanina amino transferase (ALT) vem sendo utilizadas como confiáveis marcadores de dano hepático (SOOKOIAN; PIROLA, 2015). À respeito de dano hepático, o CCl₄ é metabolizado pela enzima CYP2E1 formando os radicais triclorometil (CCl₃) e o peróxil triclorometil (OOCCL₃), radicais que, por promoverem resposta inflamatória, peroxidação lipídica e morte de hepatócitos, constituem um quadro de dano no fígado (WEBER; BOLL; STAMPFL, 2003). Em relação as dosagens séricas de ALT neste trabalho, não foi observada diferença significativa nas comparações entre os grupos DEN+CCl₄ nos períodos de 17 e 30 semanas contra seus respectivos grupos controle. De maneira oposta, em (ROMUALDO et al., 2018), considerando 8 semanas de aplicação de CCl₄ pós iniciação com DEN, houve diferença significativa com maiores níveis séricos de ALT no grupo DEN+CCl₄ em 17 semanas contra o grupo controle, fato também observado em 8 semanas de aplicação de CCl₄ em camundongos no trabalho de (LIU et al., 2018) e em

(OTRUBOVÁ et al., 2018) utilizando 10 semanas de aplicação de CCl₄ em seus animais. Quando se observa os grupos CCl₄ interrompido e CCl₄ contínuo, nota-se uma diferença significativa com maiores níveis séricos de ALT em favor do grupo contínuo ($P= 0,0299$), fato mantido na comparação deste grupo contra o grupo controle ($P= 0,0033$). O grupo CCl₄ interrompido não manifestou diferença significativa quando comparado ao grupo controle. Por fim, considerando todos os timepoints DEN+CCl₄, houve diferença significativa apenas em 47 semanas CCl₄ contínuo contra 17 semanas. Este resultado, apesar de esperado devido a grande diferença de semanas de aplicações de CCl₄ demonstrou também que o estímulo inflamatório/danoso contínuo tenha sido necessário para expressar diferença significativa nesta análise, visto que os demais timepoints (CCl₄ interrompido e 30 semanas) não demonstraram qualquer diferença significativa em relação ao timepoint inicial de 17 semanas.

3.7. Resultados e discussão imunohistoquímica Ki-67 e Picro Sirius

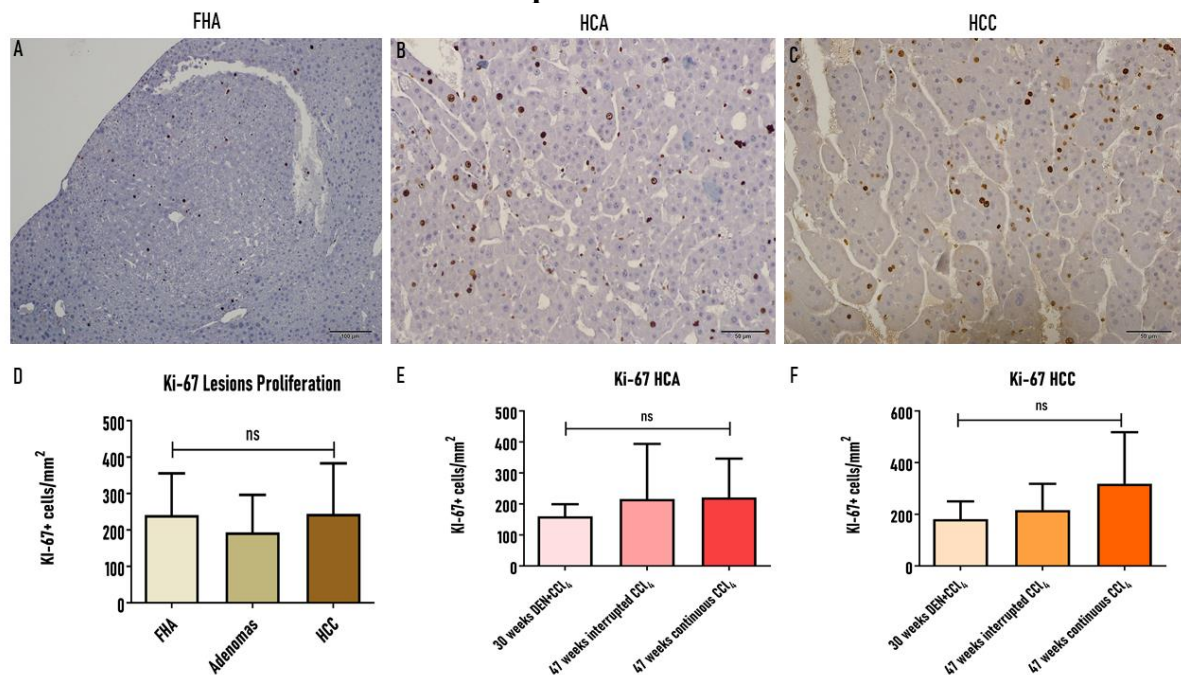


Figura 22. Ki-67 (proliferação celular) considerando lesões e períodos de eutanásia (A) Foco de hepatócito alterado com marcação Ki-67+ (FHA) (aumento 10x) (B), Adenoma hepatocelular com marcação Ki-67+ (aumento 20x), (C) Carcinoma hepatocelular com marcação Ki-67+ (aumento 20x), (D) análise semi-quantitativa Ki-67+ considerando todas as lesões. (E e F) análise semi-quantitativa considerando ao longo dos períodos de eutanásia somente adenomas e HCC, respectivamente. Dados foram expressos em média $\pm$ desvio padrão. Kruskal-Wallis seguido por teste *post hoc* de Dunn ou ANOVA de uma via e teste *post hoc* de Tukey ($P < 0.005$).

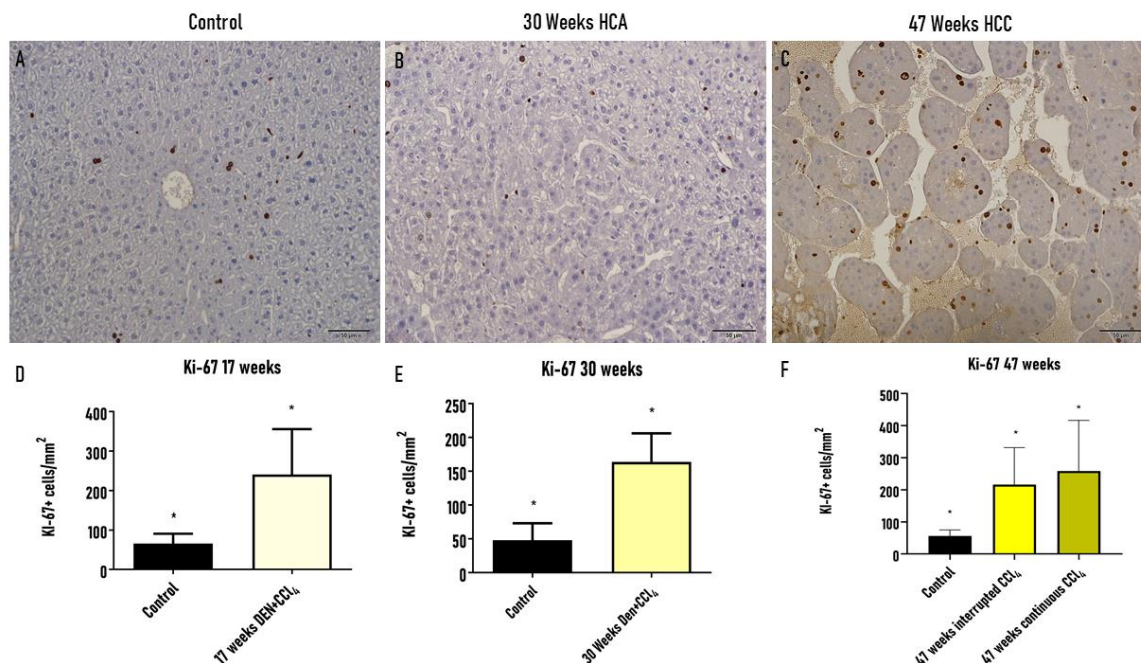


Figura 23. Ki-67 (proliferação celular) considerando apenas timepoints (A) Controle com marcação Ki-67+ (aumento 20x) (B), Adenoma hepatocelular timepoint 30 semanas com marcação Ki-67+ (aumento 20x), (C) Carcinoma hepatocelular timepoint 47 semanas com marcação Ki-67+ (aumento 20x), (D) análise semi-quantitativa Ki-67+ 17 semanas, (E) análise semi-quantitativa 30 semanas, (F) análise semi-quantitativa Ki-67+ 47 semanas. Dados foram expressos em média $\pm$ desvio padrão. Teste t não pareado ou teste de Mann-Whitney (2 grupos), Kruskal-Wallis (3 grupos) seguido pelo teste *post hoc* Dunn ($P < 0,005$).

O Ki-67 é um dos marcadores mais utilizados no que diz respeito a análises de proliferação celular em tecidos normais e em tumores (SCHWARTING et al., 1986; ENDL; HOLLMANN; GERDES, 2001). Considerando o índice de células Ki-67+ nas lesões, não houve diferença significativa considerando apenas lesões agrupando os diferentes períodos de eutanásia (Fig. 22 D), assim como considerando adenomas e HCC diagnosticados nas semanas 30 e 47 (Fig. 22 E e F, respectivamente). Especificamente este último resultado demonstra que o padrão de proliferação celular nas lesões neoplásicas (adenomas e HCC) não variou significativamente ao longo dos pontos de eutanásia mesmo interrompendo ou não as aplicações de CCl₄. Quando realizadas comparações considerando os pontos de eutanásia, observou-se maior número de hepatócitos Ki-67+ nos grupos DEN+CCl₄ nas semanas 17 ($P=0,0030$), 30 ($P=0,0005$) e 47 semanas nos grupos interrompido ($P=0,0040$) e contínuo ($P=0,0007$) quando comparado ao grupo controle nos mesmos períodos. Este resultado é esperado devido ao estabelecimento do processo de hepatocarcinogênese associado a fibrose, onde a proliferação celular aumentada está relacionada ao surgimento das lesões encontradas nesses períodos de eutanásia. O processo

de proliferação celular sustentada pode favorecer a expansão clonal daqueles hepatócitos iniciados pela DEN, contribuindo para o surgimento de lesões hepáticas pré-neoplásicas e, posteriormente, neoplásicas (KLAUNIG, 1999). Os achados na semana 17 no grupo DEN+CCl₄, a título de comparação, foram similares aos achados de nosso trabalho anterior (ROMUALDO et al., 2018, 2020).

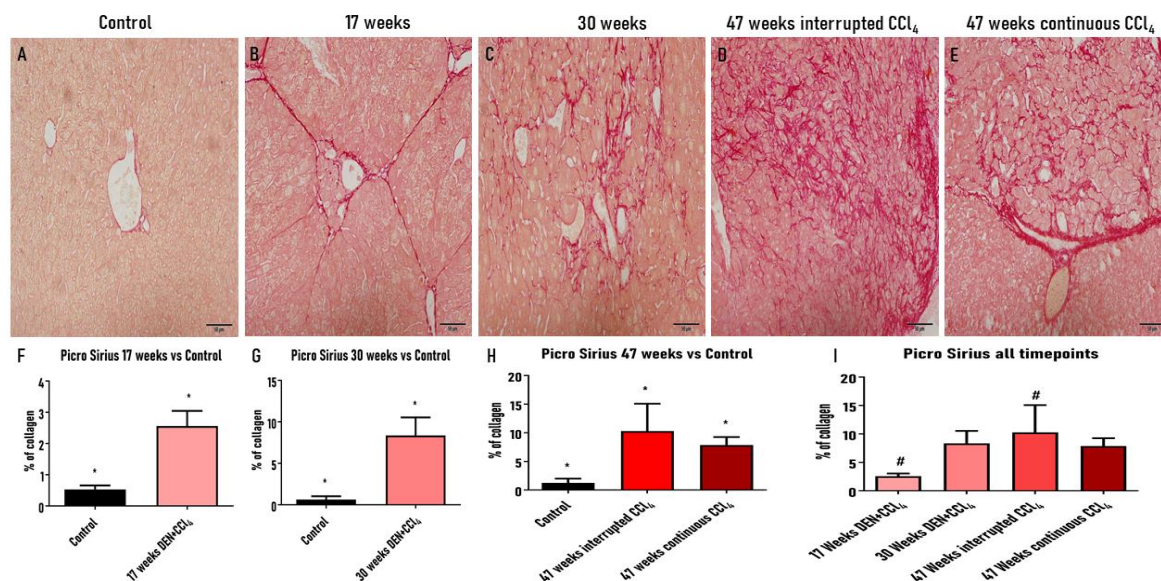


Figura 24. Picro Sirius (fibrose/colágeno) considerando timepoints (A) Controle (aumento 20x), (B) 17 semanas DEN+CCl₄ (aumento 20x), (C) 30 semanas DEN+CCl₄ (aumento 20x), (D) 47 semanas CCl₄ interrompido (aumento 20x), (E) 47 semanas CCl₄ contínuo (aumento 20x), (F) Picro Sirius 17 semanas DEN+CCl₄ vs controle, (G) Picro Sirius 30 semanas DEN+CCl₄ vs controle, (H) Picro Sirius 47 semanas vs controle (I) Picro Sirius todos os timepoints. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão. Teste t não pareado (2 grupos), ANOVA uma via (3 grupos) seguido por teste *post hoc* de Tukey ($P < 0.005$).

Ciclos repetidos de dano/proliferação regenerativa de hepatócitos seguido de reparo leva à um quadro inflamatório exacerbado e, por consequência, ativação de CEHs com deposição de colágeno e um quadro de fibrose hepática (KNIGHT et al., 2017). A fibrose avançada leva a substituição do tecido normal funcional do órgão por um tecido cicatricial, além de um microambiente favorável associado ao surgimento de tumores (KIM; POPOV; SCHUPPAN, 2017). Dessa maneira, considerando o insulto hepático causado pelas aplicações sucessivas de CCl₄, a porcentagem de deposição de colágeno nos grupos tratados foi maior que grupo controle nas semanas 17 ($P < 0.0001$), 30 ($P = 0.0002$), 47 no grupo interrompido ($P = 0.0080$) e contínuo ($P = 0.0355$). Considerando apenas protocolos de 8 semanas de administração de CCl₄ em camundongos, quando comparados estes grupos contra seus respectivos controles, resultados

semelhantes (maior porcentagem de colágeno no grupo tratado com CCl₄) foram observados em trabalhos prévios (KNIGHT et al., 2017; LIU et al., 2018; ROMUALDO et al., 2018, 2020). Estes resultados eram esperados devido ao modelo de tratamento a qual os animais foram submetidos, especialmente considerando as administrações contínuas de CCl₄. Administrações crônicas de CCl₄ contribuem para a necrose de hepatócitos, além da promoção e manutenção de um microambiente necroinflamatório, ativação de CEHs e deposição de colágeno (IWAISAKO et al., 2014). No entanto, quando comparado somente o grupo DEN/CCl₄, apenas o grupo interrompido na semana 47 (P=0,0348) mostrou diferença significativa com porcentagem maior de colágeno depositado quando comparado a semana 17. Nos demais períodos não houve diferença significativa.

4. Resultados e discussão imunofluorescência Conexinas e Panexina 1

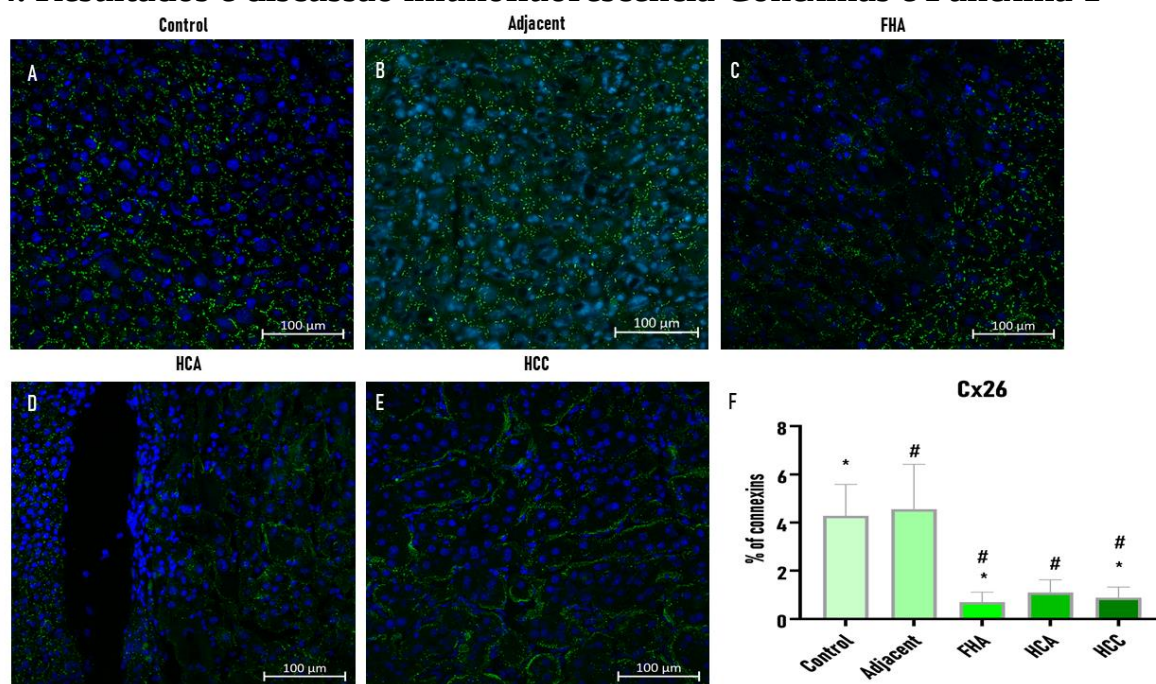


Figura 25. Imunofluorescência Cx26 considerando lesões, independentemente do período de eutanásia (A) Controle DAPI (azul) + FITC Cx26 (verde) (aumento 20x), (B) Adjacente DAPI (azul) + FITC Cx26 (verde) (aumento 20x), (C) FHA DAPI (azul) + FITC Cx26 (verde) (aumento 20x), (D) HCA DAPI (azul) + FITC Cx26 (verde) (aumento 20x), (E) HCC DAPI (azul) + FITC Cx26 (verde) (aumento 20x), (F) análise semi-quantitativa % de Cx26. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão. Teste de Kruskal-Wallis seguido por teste *post hoc* de Dunn (P<0.005). n=8.

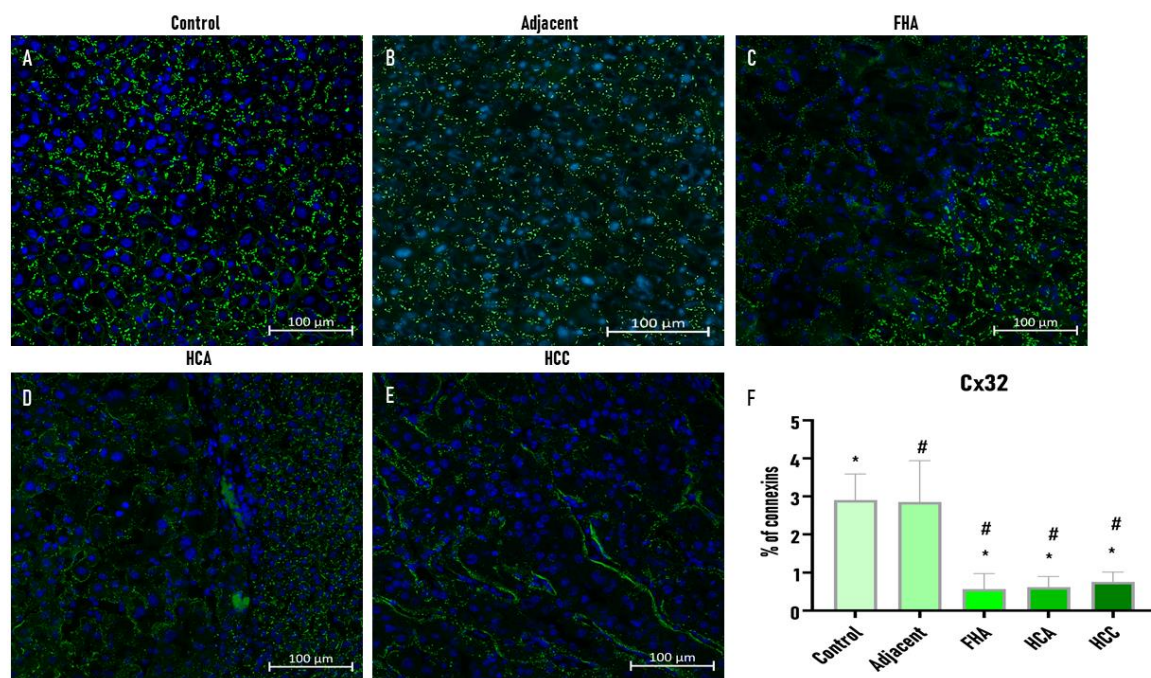


Figura 26. Imunofluorescência Cx32 considerando lesões, independentemente do período de eutanásia (A) Controle DAPI (azul) + FITC Cx32 (verde) (aumento 20x), (B) Adjacente DAPI (azul) + FITC Cx32 (verde) (aumento 20x), (C) FHA DAPI (azul) + FITC Cx32 (verde) (aumento 20x), (D) HCA DAPI (azul) + FITC Cx32 (verde) (aumento 20x), (E) HCC DAPI (azul) + FITC Cx32 (verde) (aumento 20x), (F) análise semi-quantitativa % de Cx32. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão. ANOVA uma via seguido por teste *post hoc* de Tukey ($P < 0.005$). $n = 8$.

As análises semi-quantitativas da Cx26 e Cx32 (Fig. 25 F e 26F) mostraram que nos FHAs, adenomas ou CHC ($P < 0.005$, e $P < 0.005$, respectivamente) a expressão destas conexinas foi menor em relação ao tecido normal do grupo controle (*). O tecido hepático adjacente também no grupo DEN+CCl₄ demonstrou maiores porcentagens de marcação de Cx26 e Cx32 quando comparado aos FHAs, adenomas e CHC ($P < 0.005$) (#). Foi considerado como tecido adjacente áreas hepáticas de animais que receberam tratamento DEN+CCl₄, mas que não demonstraram características histopatológicas de nenhuma das lesões caracterizadas neste trabalho. Não houve diferença significativa na expressão das Cxs 26 e 32 considerando comparações somente entre FHA, HCA e CHC no grupo DEN+CCl₄.

No fígado, as Cx32 e Cx26 são as maiores formadoras de junções GAP hepáticas, estando localizadas na membrana plasmática dos hepatócitos (STUTENKEMPER et al., 1992; VINKEN et al., 2008). A Cx32 está uniformemente distribuída em todas as regiões do fígado, enquanto a Cx26 está preferencialmente expressa na região periportal (KOJIMA et al., 1994). A expressão proteica de Cx26 foi sugerida como uma possível resposta compensatória a expressão reduzida da Cx32 em um microambiente hepático inflamatório (TEMME; TRAUB;

WILLECKE, 1998). Mesmo considerando a extensão das aplicações de CCl₄, nossos achados não comprovaram esta correlação, visto que os resultados relacionados a expressão proteica de Cx26 e Cx32 foram similares. Por outro lado, como sugerido por BALASUBRAMANIYAN et al. (2013) o ambiente hepático inflamatório em roedores levou a uma diminuição da expressão tanto da Cx26 e 32 e um aumento da expressão de Cx43. Também considerando um ambiente hepático inflamatório e desta vez utilizando aplicações de CCl₄ em roedores, níveis mais baixos de Cx32 foram detectados no tecido hepático quando comparado com o tecido normal dos animais controle (NAKATA et al., 1996). Além disso, em pacientes cirróticos, os níveis de Cx32 estariam diminuídos devido a translocação das proteínas de seu local característico na membrana plasmática de hepatócitos para o citoplasma celular (YAMAOKA et al., 1995). Fato também documentado por FISCHER et al. (2005), mas desta vez relacionado a diminuição da expressão da Cx26 em células endoteliais de sinusóides hepáticos.

Mais especificamente a respeito dos achados relacionados a expressão das Cxs, a depleção de junções GAP e consequentemente Cxs vem sendo observada em diferentes tumores sólidos, existindo uma correlação negativa entre o crescimento tumoral e expressão das mesmas (AASEN et al., 2016), onde estas observações serviram de base na literatura para a hipótese de que as Cxs pudessem exercer papel supressor tumoral (NALEWAJSKA et al., 2020) sendo que especialmente a Cx32 promoveu a inibição de invasão e metástase do CHC (YANG et al., 2017). Por fim, considerando as lesões pré-neoplásicas, adenomas e o CHC, TSUDA et al. (1995) demonstrou um decréscimo progressivo de Cx32 ao longo da progressão da hepatocarcinogênese até o estágio de CHC. Nota-se a partir dos principais relatos da literatura que os resultados encontrados a respeito da expressão das Cx26 e Cx32 foram, em partes, convergentes.

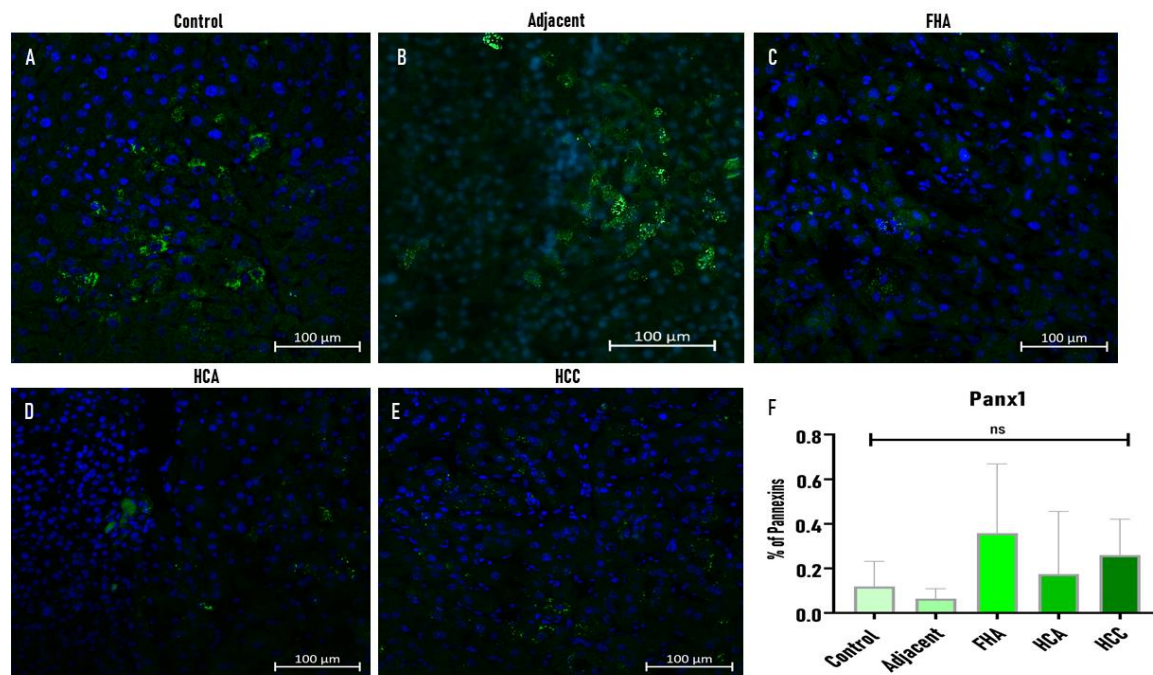


Figura 27. Imunofluorescência Panx1 considerando lesões (A) Controle DAPI (azul) + FITC Panx1 (verde) (aumento 20x), (B) Adjacente DAPI (azul) + FITC Panx1 (verde) (aumento 20x), (C) FHA DAPI (azul) + FITC Panx1 (verde) (aumento 20x), (D) HCA DAPI (azul) + FITC Panx1 (verde) (aumento 20x), (E) HCC DAPI (azul) + FITC Panx1 (verde) (aumento 20x), (F) análise semi-quantitativa % de Panx1. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão. Kruskal-Wallis seguido por teste *post hoc* de Dunn ($P < 0.005$) $n = 8$

Os resultados das análises semi-quantitativas de Panx1 (Fig. 27 F) não demonstraram diferença significativa nas comparações entre tecido hepático normal (controle) e adjacente e os FHAs, adenomas e CHC exibindo apenas um leve aumento de porcentagens de expressão da proteína nas lesões hepáticas.

Os canais de panexina se abrem tanto em condições fisiológicas como patológicas, sendo especificamente a Panx1 parecer estar envolvida com a ativação e/ou continuidade do processo inflamatório e de apoptose (CRESPO YANGUAS et al., 2017). Foi demonstrado por CRESPO YANGUAS et al. (2018) um aumento da expressão de Panx1 em camundongos pós aplicações de CCl₄. Mais especificamente no CHC, a alta expressão de Panx1 parece estar relacionada a um pior prognóstico desta neoplasia (SHI et al., 2019). No entanto, essas implicações parecem não demonstrar impacto no modelo DEN/CCl₄, visto que não houve diferença significativa na expressão desta proteína, mesmo em situações características de ambiente hepático fibrótico/inflamatório e nas lesões neoplásicas como os adenomas e CHC que foram majoritárias nas eutanásias das semanas 30 e 47.

5. Resultados, discussão e correlação das Cxs 26 e 32 e Panx1 com os níveis de Ki-67

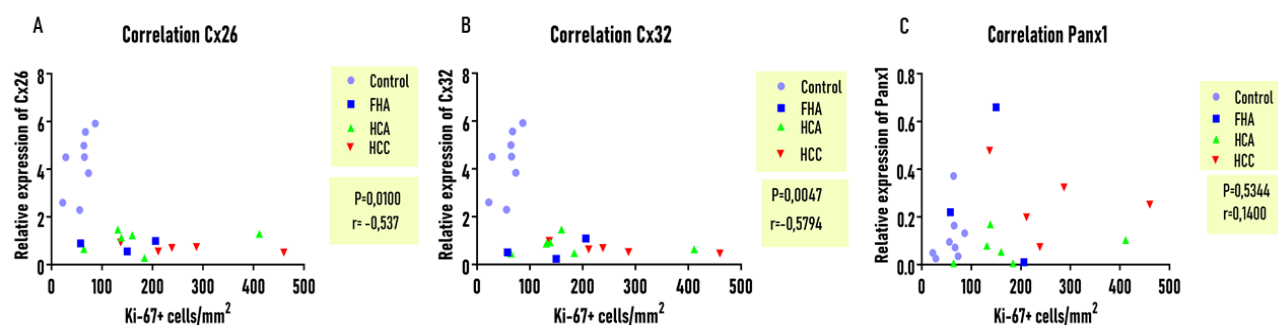


Figura 28. Correlação Conexinas, Panexina1 e Ki-67 (A) Correlação expressão relativa de Conexina 26 e células Ki-67+ (B) Correlação expressão relativa de Conexina 32 e células Ki-67+ (C) Correlação expressão relativa de Panexina 1 e células Ki-67+. Dados expressos por correlação de Pearson ($P<0.005$).

As análises das correlações indicaram uma correlação negativa moderada ($r=-0,537$) tanto para a Cx26 (Fig. 28 A) ($P=0,0100$) como para a Cx32 (Fig. 28 B) ($P=0,0047$) e ($r=-0,5794$), indicando, em ambas as situações, que quanto maior o índice de proliferação celular indicado pela quantidade de células hepáticas Ki-67+, menor foi a quantidade de Cxs expressas no tecido hepático.

Não está completamente claro como as conexinas modulam a proliferação celular (NALEWAJSKA et al., 2020). A capacidade das células de se comunicarem através das junções GAP é negativamente relacionada com as atividades de proliferação celular (RUCH, 1994). Além disso, a Cx43 é a mais estudada em termos de pontos de checagem do ciclo celular e desordens de proliferação, mas as Cxs 26, 30 e 32 também possuem envolvimento nesses processos (AASEN, 2015).

Sobre as interações entre as junções GAP e a proliferação celular, sabe-se que este processo é influenciado pelos níveis e alterações de Ca^{2+} e PH (GOODALL; MARO, 1986) além da ativação de vias de sinalização como a MAPK e PI3/Akt que afetam negativamente as junções GAP (KOJIMA et al., 2003; KOO et al., 1997). Estudos com linhagens de células

tumorais demonstram que uma hiperexpressão de Cxs leva a um prolongamento do ponto de checagem G1/S durante a divisão celular, resultando em uma diminuição da proliferação celular (GRAHAM; JIANG; MESNIL, 2018; VINKEN et al., 2012). Outro mecanismo possível de participação na proliferação celular por parte das Cxs seria uma interferência da porção da cauda C-terminal da conexina em outras proteínas da membrana plasmática ou citoplasma (GRAHAM; JIANG; MESNIL, 2018), modulando a permeabilidade dos canais e interferindo em sinalizações importantes para a proliferação celular (NALEWAJSKA et al., 2020).

Mais especificamente, a perda de expressão de Cxs é comumente observada no câncer (NALEWAJSKA et al., 2020). A perda de junções GAP favorece que as células tumorais escapem dos mecanismos regulatórios e adquiram independência de crescimento (VINKEN et al., 2006). Adicionalmente, ainda considerando o crescimento tumoral e a proliferação celular, foi observado na literatura que a perda de expressão de junções GAP em células com alto índice de proliferação celular é comumente observada (STEIN; BOONSTRA; BURGHARDT, 1992; VINKEN et al., 2006). Além disso, o fígado de roedores adultos, em condições normais, demonstra atividade proliferativa baixa (ANKOMA-SEY, 1999; STEER, 1995).

Os resultados encontrados neste projeto correlacionando a expressão das Cxs 26 e 32 com os índices de proliferação celular, são condizentes com os achados da literatura, principalmente considerando as lesões tumorais (adenomas e carcinomas), visto que as mesmas apresentam índices maiores de proliferação celular enquanto expressaram menor porcentagem de Cxs quando comparadas as amostras hepáticas normais de animais controle.

Sobre os resultados a respeito da correlação da expressão da Panx 1 com os índices de células Ki-67+ (Fig. 28 C), apesar de uma tendência de fraca correlação positiva ($r=0,1400$), nenhuma diferença significativa foi demonstrada ($P=0.5344$).

O papel das panexinas na proliferação celular parece variar em termos de contexto e tecido específico (AASEN, 2015). A hiperexpressão de Panx1 em linhagem de células de glioma diminui os níveis de proliferação celular nesta linhagem (LAI et al., 2007). Em queratinócitos de ratos, também quando hiperexpressas, a Panx1 e Panx3 reduziram os níveis de proliferação celular nessas células (CELETTI et al., 2010). De maneira oposta, foi relatado por WICKI-STORDEUR et al. (2012) que a Panx1 contribuiu positivamente para os níveis de proliferação celular em células tronco neurais através da liberação de ATP por meio dos canais desta panexina. Considerando os relatos da literatura e a não significância dos resultados obtidos na correlação dos níveis de Panx1 com a proliferação celular no presente trabalho, mais estudos são necessários afim de elucidar o possível mecanismo de participação da Panx1 no

processo de proliferação celular no fígado e nas lesões desenvolvidas no processo de hepatocarcinogênese.

6. Conclusão e Próximas etapas

Este trabalho teve como objetivo a condução de um delineamento experimental à longo prazo considerando aplicações contínuas de CCl₄ afim de se verificar uma possível diferença na incidência de adenomas e CHC em diferentes tempos de experimentação, além da caracterização da expressão das Cxs 26, 32 e Panx1 nas lesões obtidas neste modelo. Sobre as comparações referentes aos grupos CCl₄ interrompido e contínuo, os resultados demonstraram que a continuidade das aplicações de CCl₄ não influenciaram em ganho adicional na incidência ou multiplicidade das lesões macroscópicas, bem como no número de adenomas e CHC encontrados nos animais. Os dados de ALT referentes ao soro demonstraram, conforme o esperado, maiores valores séricos do grupo CCl₄ contínuo. Quanto as análises imunohistoquímicas de Ki-67, o perfil de proliferação celular nos adenomas e CHC não demonstrou alteração ao longo da interrupção ou não das aplicações de CCl₄. Por fim, sobre as Cxs, os resultados foram condizentes com os achados na literatura, notando-se através da imunofluorescência, uma expressão menor tanto da Cx26 quanto da Cx32 nos FHAs, adenomas e CHC em comparações com tecido hepático normal e adjacente, além de uma correlação negativa de ambas as Cxs com os valores de células Ki-67+. A respeito da Panx1, não houve diferença significativa na expressão dessa proteína tanto nos valores de imunofluorescência, bem como uma correlação não significativa com os valores de Ki-67+. As próximas etapas a serem realizadas e que serão inclusas no artigo a ser publicado, consistem na realização e análise da expressão gênicas das Cxs e Panexina 1 em amostras de RNA extraídas a partir de microdissecção a laser já realizada de áreas de FHA, adenomas e CHC e tecido hepático normal, além da quantificação de imunofluorescência da Cx43.

7. Referências

- AASEN, T. Connexins: junctional and non-junctional modulators of proliferation. **Cell and Tissue Research**, v. 360, n. 3, p. 685–699, jun. 2015.
- AASEN, T. et al. Gap junctions and cancer: communicating for 50 years. **Nature Reviews Cancer**, v. 16, n. 12, p. 775–788, 21 dez. 2016.
- AFFO, S.; YU, L.-X.; SCHWABE, R. F. The Role of Cancer-Associated Fibroblasts and Fibrosis in Liver Cancer. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 12, n. 1, p. 153–186, 24 jan. 2017.
- ALLY, A. et al. Comprehensive and Integrative Genomic Characterization of Hepatocellular Carcinoma. **Cell**, v. 169, n. 7, p. 1327–1341.e23, jun. 2017.
- AMANN, T. et al. Activated hepatic stellate cells promote tumorigenicity of hepatocellular carcinoma. **Cancer Science**, v. 100, n. 4, p. 646–653, abr. 2009.
- AMBROSI, C. et al. Pannexin1 and Pannexin2 Channels Show Quaternary Similarities to Connexons and Different Oligomerization Numbers from Each Other. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 32, p. 24420–24431, 6 ago. 2010.
- ANGELILLO-SCHERRER, A. et al. Connexin 37 Limits Thrombus Propensity by Downregulating Platelet Reactivity. **Circulation**, v. 124, n. 8, p. 930–939, 23 ago. 2011.
- ANKOMA-SEY, V. Hepatic Regeneration—Revisiting the Myth of Prometheus. **Physiology**, v. 14, n. 4, p. 149–155, ago. 1999.
- ANSTEE, Q. M. et al. From NASH to HCC: current concepts and future challenges. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 16, n. 7, p. 411–428, 26 jul. 2019.
- ARAVALLI, R. N.; CRESSMAN, E. N. K.; STEER, C. J. Cellular and molecular mechanisms of hepatocellular carcinoma: an update. **Archives of Toxicology**, v. 87, n. 2, p. 227–247, 25 fev. 2013.
- ARAVALLI, R. N.; STEER, C. J.; CRESSMAN, E. N. K. Molecular mechanisms of hepatocellular carcinoma. **Hepatology**, v. 48, n. 6, p. 2047–2063, dez. 2008.
- BAKIRI, L.; WAGNER, E. F. Mouse models for liver cancer. **Molecular Oncology**, v. 7, n. 2, p. 206–223, abr. 2013.
- BALASUBRAMANIAN, V. et al. Importance of Connexin-43 based gap junction in cirrhosis and acute-on-chronic liver failure. **Journal of Hepatology**, v. 58, n. 6, p. 1194–1200, jun. 2013.
- BANNASCH, P. Preneoplastic lesions as end points in carcinogenicity testing I. Hepatic preneoplasia. **Carcinogenesis**, v. 7, n. 5, p. 689–695, 1986.

- BANNASCH, P.; KLIMEK, F.; MAYER, D. Early bioenergetic changes in hepatocarcinogenesis: preneoplastic phenotypes mimic responses to insulin and thyroid hormone. **Journal of bioenergetics and biomembranes**, v. 29, n. 4, p. 303–13, ago. 1997.
- BENNETT, M. V. L. et al. Gap junctions: New tools, new answers, new questions. **Neuron**, v. 6, n. 3, p. 305–320, mar. 1991.
- BISHAYEE, A. The Inflammation and Liver Cancer. In: **Advances in Experimental Medicine and Biology**. [s.l: s.n.]. v. 816p. 401–435.
- BOASSA, D. et al. Pannexin1 Channels Contain a Glycosylation Site That Targets the Hexamer to the Plasma Membrane. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 43, p. 31733–31743, 26 out. 2007.
- BOND, S. R.; NAUS, C. C. The pannexins: past and present. **Frontiers in Physiology**, v. 5, n. February, p. 1–24, 2014.
- BRALET, M.-P. et al. Hepatocellular carcinoma occurring in nonfibrotic liver: Epidemiologic and histopathologic analysis of 80 French cases. **Hepatology**, v. 32, n. 2, p. 200–204, ago. 2000.
- BUCHMANN, A. et al. Mutations at codon 61 of the Ha-ras proto-oncogene in precancerous liver lesions of the B6C3F1 mouse. **Molecular Carcinogenesis**, v. 2, n. 3, p. 121–125, 1989a.
- BUCHMANN, A. et al. Mutations at codon 61 of the Ha-ras proto-oncogene in precancerous liver lesions of the B6C3F1 mouse. **Molecular Carcinogenesis**, v. 2, n. 3, p. 121–125, 1989b.
- BUDHU, A.; WANG, X. W. The role of cytokines in hepatocellular carcinoma. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 80, n. 6, p. 1197–1213, 2006.
- CAILLOT, F. et al. Transient and etiology-related transcription regulation in cirrhosis prior to hepatocellular carcinoma occurrence. **World Journal of Gastroenterology**, v. 15, n. 3, p. 300, 2009.
- CELETTI, S. J. et al. Implications of pannexin 1 and pannexin 3 for keratinocyte differentiation. **Journal of Cell Science**, v. 123, n. 8, p. 1363–1372, 15 abr. 2010.
- CERAMI, E. et al. The cBio Cancer Genomics Portal: An Open Platform for Exploring Multidimensional Cancer Genomics Data: Figure 1. **Cancer Discovery**, v. 2, n. 5, p. 401–404, maio 2012.
- CHAPPELL, G. et al. Genetic and epigenetic changes in fibrosis-associated hepatocarcinogenesis in mice. **International Journal of Cancer**, v. 134, n. 12, p. 2778–2788, 2014.
- CHIDAMBARANATHAN-REGHUPATY, S.; FISHER, P. B.; SARKAR, D. Hepatocellular carcinoma (HCC): Epidemiology, etiology and molecular classification. In: **Advances in**

Cancer Research. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2021. v. 149p. 1–61.

CIEPLY, B. et al. Unique phenotype of hepatocellular cancers with exon-3 mutations in beta-catenin gene. **Hepatology**, v. 49, n. 3, p. 821–831, mar. 2009.

COGLIATI, B. et al. Morphological and molecular pathology of CCL4-induced hepatic fibrosis in connexin43-deficient mice. **Microscopy Research and Technique**, v. 74, n. 5, p. 421–429, maio 2011.

COTRINA, M. L.; LIN, J. H.-C.; NEDERGAARD, M. Adhesive properties of connexin hemichannels. **Glia**, v. 56, n. 16, p. 1791–1798, dez. 2008.

CRAIG, A. J. et al. Tumour evolution in hepatocellular carcinoma. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 17, n. 3, p. 139–152, 2 mar. 2020.

CRESPO YANGUAS, S. et al. Pannexin1 as mediator of inflammation and cell death.

Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, v. 1864, n. 1, p. 51–61, jan. 2017.

CRESPO YANGUAS, S. et al. Genetic ablation of pannexin1 counteracts liver fibrosis in a chemical, but not in a surgical mouse model. **Archives of Toxicology**, v. 92, n. 8, p. 2607–2627, 9 ago. 2018.

DARVESH, A. S.; BISHAYEE, A. Chemopreventive and therapeutic potential of tea polyphenols in hepatocellular cancer. **Nutrition and Cancer**, v. 65, n. 3, p. 329–344, 2013.

DAVIES, M. et al. Transforming growth factor- β enhances invasion and metastasis in Ras-transfected human malignant epidermal keratinocytes. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 93, n. 2, p. 148–156, abr. 2012.

DRAGANI, T. A.; MANENTI, G.; DELLA PORTA, G. Enhancing effects of carbon tetrachloride in mouse hepatocarcinogenesis. **Cancer Letters**, v. 31, n. 2, p. 171–179, maio 1986.

EL-SERAG, H. B.; RUDOLPH, K. L. Hepatocellular Carcinoma: Epidemiology and Molecular Carcinogenesis. **Gastroenterology**, v. 132, n. 7, p. 2557–2576, jun. 2007.

ENDL, E.; HOLLMANN, C.; GERDES, J. Chapter 18 Antibodies against the Ki-67 protein: Assessment of the growth fraction and tools for cell cycle analysis. In: **Methods in Cell Biology**. [s.l.: s.n.]. v. 63p. 399–418.

FAN, G.; WEI, X.; XU, X. Is the era of sorafenib over? A review of the literature.

Therapeutic Advances in Medical Oncology, v. 12, n. 6, p. 175883592092760, 26 jan. 2020.

FINEGOLD, M. J.; GELLER, S. A.; GERBER, M. A. Terminology of nodular hepatocellular lesions. **Hepatology**, v. 22, n. 3, p. 983–993, set. 1995.

- FISCHER, R. et al. Intercellular communication via gap junctions in activated rat hepatic stellate cells. **Gastroenterology**, v. 128, n. 2, p. 433–448, fev. 2005.
- FRENZEL, E. M.; JOHNSON, R. G. Gap Junction Formation between Cultured Embryonic Lens Cells Is Inhibited by Antibody to N-Cadherin. **Developmental Biology**, v. 179, n. 1, p. 1–16, out. 1996.
- 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.
- GAO, J. et al. Integrative Analysis of Complex Cancer Genomics and Clinical Profiles Using the cBioPortal. **Science Signaling**, v. 6, n. 269, p. p11–p11, 2 abr. 2013.
- GLAUERT, H. P. et al. Dietary antioxidants in the prevention of hepatocarcinogenesis: A review. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 54, n. 7, p. 875–896, 28 maio 2010.
- GOLABI, P. et al. Mortality assessment of patients with hepatocellular carcinoma according to underlying disease and treatment modalities. **Medicine**, v. 96, n. 9, p. e5904, mar. 2017.
- GOODALL, H.; MARO, B. Major loss of junctional coupling during mitosis in early mouse embryos. **Journal of Cell Biology**, v. 102, n. 2, p. 568–575, 1 fev. 1986.
- GRAHAM, S.; JIANG, J.; MESNIL, M. Connexins and Pannexins: Important Players in Tumorigenesis, Metastasis and Potential Therapeutics. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 6, p. 1645, 1 jun. 2018.
- HAN, Y.-P. et al. Essential Role of Matrix Metalloproteinases in Interleukin-1-induced Myofibroblastic Activation of Hepatic Stellate Cell in Collagen. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 6, p. 4820–4828, fev. 2004.
- HASHEM B. EL-SERAG, M.D., M. P. H. Hepatocellular Carcinoma. **The new england journal of medicine**, p. 1118–1127, 2011.
- HERRMANN, S. S.; GRANBY, K.; DUEDAHL-OLESEN, L. Formation and mitigation of N-nitrosamines in nitrite preserved cooked sausages. **Food Chemistry**, v. 174, p. 516–526, maio 2015.
- HONG, E.-J. et al. Loss of estrogen-related receptor promotes hepatocarcinogenesis development via metabolic and inflammatory disturbances. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 44, p. 17975–17980, 29 out. 2013.
- HÜBSCHER, S. G. What is the long-term outcome of the liver allograft? **Journal of Hepatology**, v. 55, n. 3, p. 702–717, set. 2011.
- IARC. Biological Agents. In: **Occupational Hygiene**. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd, 2008. v. 100p. 344–359.
- IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans: some

N-nitroso compounds. **IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to man**, v. 17, p. 1–349, maio 1978.

IWAISAKO, K. et al. Origin of myofibroblasts in the fibrotic liver in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 32, 12 ago. 2014.

JENNE, C. N.; KUBES, P. Immune surveillance by the liver. **Nature Immunology**, v. 14, n. 10, p. 996–1006, 18 out. 2013.

Jl, J. et al. Hepatic stellate cell and monocyte interaction contributes to poor prognosis in hepatocellular carcinoma. **Hepatology**, v. 62, n. 2, p. 481–495, 17 ago. 2015.

JIANG, J. X.; PENUOLA, S. Connexin and pannexin channels in cancer. **BMC Cell Biology**, v. 17, n. S1, p. S12, 24 dez. 2016.

JONGEN, W. M. et al. Regulation of connexin 43-mediated gap junctional intercellular communication by Ca²⁺ in mouse epidermal cells is controlled by E-cadherin. **The Journal of Cell Biology**, v. 114, n. 3, p. 545–555, 1 ago. 1991.

KAESTNER, B. et al. Effects of sorafenib and cisplatin on preneoplastic foci of altered hepatocytes in fetal turkey liver. **Toxicology Research**, v. 6, n. 1, p. 54–62, 2017.

KALLURI, R.; WEINBERG, R. A. The basics of epithelial-mesenchymal transition. **Journal of Clinical Investigation**, v. 119, n. 6, p. 1420–1428, 1 jun. 2009.

KAPOSI-NOVAK, P. et al. Central Role of c-Myc during Malignant Conversion in Human Hepatocarcinogenesis. **Cancer Research**, v. 69, n. 7, p. 2775–2782, 1 abr. 2009.

KIM, H.-Y.; KIM, S.-J.; LEE, S.-M. Activation of NLRP3 and AIM2 inflammasomes in Kupffer cells in hepatic ischemia/reperfusion. **FEBS Journal**, v. 282, n. 2, p. 259–270, jan. 2015.

KIM, Y. O.; POPOV, Y.; SCHUPPAN, D. Optimized Mouse Models for Liver Fibrosis. In: **Methods in Molecular Biology**. [s.l: s.n.]. v. 1559p. 279–296.

KLAUNIG, J. Mechanisms of cancer chemoprevention in hepatic carcinogenesis: modulation of focal lesion growth in mice. **Toxicological Sciences**, v. 52, n. 2, p. 101–106, 1 dez. 1999.

KNIGHT, V. et al. Cytoplasmic domain of tissue factor promotes liver fibrosis in mice. **World Journal of Gastroenterology**, v. 23, n. 31, p. 5692, 2017.

KOBAYASHI, T. et al. Patients with early recurrence of hepatocellular carcinoma have poor prognosis. **Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International**, v. 16, n. 3, p. 279–288, jun. 2017.

KOJIMA, T. et al. Effects of oxygen radical scavengers on connexins 32 and 26 expression in primary cultures of adult rat hepatocytes. **Carcinogenesis**, v. 17, n. 3, p. 537–544, 1996.

KOJIMA, T. et al. Role of the p38 MAP-Kinase Signaling Pathway for Cx32 and Claudin-1

- in the Rat Liver. **Cell Communication & Adhesion**, v. 10, n. 4–6, p. 437–443, 11 jan. 2003.
- KOO, S. K. et al. PKC phosphorylation disrupts gap junctional communication at G0/S phase in clone 9 cells. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 167, n. 1–2, p. 41–49, 1997.
- KOPANJA, D. et al. p19Arf inhibits aggressive progression of H-ras-driven hepatocellular carcinoma. **Carcinogenesis**, v. 39, n. 3, p. 318–326, 8 mar. 2018.
- KRYSKO, D. V. et al. Gap junctions and the propagation of cell survival and cell death signals. **Apoptosis**, v. 10, n. 3, p. 459–469, maio 2005.
- KUMAR, N. M.; GILULA, N. B. The Gap Junction Communication Channel. **Cell**, v. 84, n. 3, p. 381–388, fev. 1996.
- KUSHIDA, M. et al. Dose-related induction of hepatic preneoplastic lesions by diethylnitrosamine in C57BL/6 mice. **Toxicologic Pathology**, v. 39, n. 5, p. 776–786, 2011.
- LACHENMAYER, A. et al. Molecular approaches to treatment of hepatocellular carcinoma. **Digestive and Liver Disease**, v. 42, n. SUPPL. 3, p. S264–S272, jul. 2010.
- LACHENMAYER, A. et al. Wnt-Pathway Activation in Two Molecular Classes of Hepatocellular Carcinoma and Experimental Modulation by Sorafenib. **Clinical Cancer Research**, v. 18, n. 18, p. 4997–5007, 15 set. 2012.
- LAHM, H. et al. Diethylnitrosamine induces long-lasting re-expression of insulin-like growth factor II during early stages of liver carcinogenesis in mice. **Growth Hormone & IGF Research**, v. 12, n. 1, p. 69–79, fev. 2002.
- LAI, C. P. K. et al. Tumor-Suppressive Effects of Pannexin 1 in C6 Glioma Cells. **Cancer Research**, v. 67, n. 4, p. 1545–1554, 15 fev. 2007.
- LAIRD, D. W. Life cycle of connexins in health and disease. **Biochemical Journal**, v. 394, n. 3, p. 527–543, 15 mar. 2006.
- LE BAIL, B. et al. Prevalence of liver cell dysplasia and association with HCC in a series of 100 cirrhotic liver explants. **Journal of Hepatology**, v. 27, n. 5, p. 835–842, 1997.
- LEE, G.-H.; NOMURA, K.; KITAGAWA, T. Comparative study of diethylnitrosamine-initiated two-stage hepatocarcinogenesis in C3H, C57BL and BALB mice promoted by various hepatopromoters. **Carcinogenesis**, v. 10, n. 12, p. 2227–2230, 1989.
- LEE, H. C. Wnt/frizzled signaling in hepatocellular carcinoma. **Frontiers in Bioscience**, v. 11, n. 1, p. 1901, 2006.
- LIJINSKY, W. N-Nitroso compounds in the diet. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 443, n. 1–2, p. 129–138, jul. 1999.
- LIU, Y. et al. Breviscapine ameliorates CCl4-induced liver injury in mice through inhibiting inflammatory apoptotic response and ROS generation. **International Journal of Molecular**

Medicine, v. 42, n. 2, p. 755–768, 2 maio 2018.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, dez. 2001.

LLOVET, J. M. et al. Molecular therapies and precision medicine for hepatocellular carcinoma. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 15, n. 10, p. 599–616, 30 out. 2018.

LOCOVEI, S.; WANG, J.; DAHL, G. Activation of pannexin 1 channels by ATP through P2Y receptors and by cytoplasmic calcium. **FEBS Letters**, v. 580, n. 1, p. 239–244, 2006.

LOEWENSTEIN, W. R.; KANNO, Y. Intercellular Communication and the Control of Tissue Growth: Lack of Communication between Cancer Cells. **Nature**, v. 209, n. 5029, p. 1248–1249, mar. 1966.

MA, X.-D. Expression of gap junction genes connexin 32 and connexin 43 mRNAs and proteins, and their role in hepatocarcinogenesis. **World Journal of Gastroenterology**, v. 8, n. 1, p. 64, 2002.

MAES, M. et al. Roles of connexins and pannexins in digestive homeostasis. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 72, n. 15, p. 2809–2821, 18 ago. 2015.

MAES, M. et al. Involvement of connexin43 in acetaminophen-induced liver injury.

Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease, v. 1862, n. 6, p. 1111–1121, jun. 2016.

MARQUARDT, J. U.; ANDERSEN, J. B.; THORGEIRSSON, S. S. Functional and genetic deconstruction of the cellular origin in liver cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 15, n. 11, p. 653–667, 23 nov. 2015.

MCGLYNN, K. A.; PETRICK, J. L.; EL-SERAG, H. B. Epidemiology of Hepatocellular Carcinoma. **Hepatology**, v. 73, n. S1, p. 4–13, 24 jan. 2021.

MCLACHLAN, E. et al. Connexins act as tumor suppressors in three-dimensional mammary cell organoids by regulating differentiation and angiogenesis. **Cancer Research**, v. 66, n. 20, p. 9886–9894, 2006.

MEŞE, G.; RICHARD, G.; WHITE, T. W. Gap Junctions: Basic Structure and Function. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 127, n. 11, p. 2516–2524, nov. 2007.

NAKAGAWA, H. et al. Serum IL-6 levels and the risk for hepatocarcinogenesis in chronic hepatitis C patients: An analysis based on gender differences. **International Journal of Cancer**, v. 125, n. 10, p. 2264–2269, 15 nov. 2009.

NAKASHIMA, Y. et al. Expression of gap junction protein connexin32 in chronic hepatitis, liver cirrhosis, and hepatocellular carcinoma. **Journal of Gastroenterology**, v. 39, n. 8, p.

763–768, 2004.

NAKATA, Y. et al. Prolonged decrease in hepatic connexin32 in chronic liver injury induced by carbon tetrachloride in rats. **Journal of Hepatology**, v. 25, n. 4, p. 529–537, out. 1996.

NALEWAJSKA, M. et al. Connexins—Therapeutic Targets in Cancers. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 23, p. 9119, 30 nov. 2020.

NAUGLER, W. E. et al. Gender Disparity in Liver Cancer Due to Sex Differences in MyD88-Dependent IL-6 Production. **Science**, v. 317, n. 5834, p. 121–124, 6 jul. 2007.

NAUGLER, W. E.; KARIN, M. The wolf in sheep's clothing: the role of interleukin-6 in immunity, inflammation and cancer. **Trends in Molecular Medicine**, v. 14, n. 3, p. 109–119, mar. 2008a.

NAUGLER, W. E.; KARIN, M. The wolf in sheep's clothing: the role of interleukin-6 in immunity, inflammation and cancer. **Trends in Molecular Medicine**, v. 14, n. 3, p. 109–119, mar. 2008b.

NAULT, J.-C. et al. Molecular Classification of Hepatocellular Adenoma Associates With Risk Factors, Bleeding, and Malignant Transformation. **Gastroenterology**, v. 152, n. 4, p. 880–894.e6, mar. 2017a.

NAULT, J.-C. et al. Molecular classification of hepatocellular adenoma in clinical practice. **Journal of Hepatology**, v. 67, n. 5, p. 1074–1083, nov. 2017b.

NAULT, J.-C. et al. The role of telomeres and telomerase in cirrhosis and liver cancer. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 16, n. 9, p. 544–558, 28 set. 2019.

NAULT, J.; BIOULAC-SAGE, P.; ZUCMAN-ROSSI, J. Hepatocellular Benign Tumors—From Molecular Classification to Personalized Clinical Care. **Gastroenterology**, v. 144, n. 5, p. 888–902, maio 2013.

NAUS, C. C.; LAIRD, D. W. Implications and challenges of connexin connections to cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 10, n. 6, p. 435–441, jun. 2010.

NEJAK-BOWEN, K. N.; MONGA, S. P. S. Beta-catenin signaling, liver regeneration and hepatocellular cancer: sorting the good from the bad. **Seminars in cancer biology**, v. 21, n. 1, p. 44–58, fev. 2011.

NIESSEN, H.; WILLECKE, K. Strongly decreased gap junctional permeability to inositol 1,4,5-trisphosphate in connexin32 deficient hepatocytes. **FEBS Letters**, v. 466, n. 1, p. 112–114, 21 jan. 2000.

OGAWA, K. Molecular pathology of early stage chemically induced hepatocarcinogenesis. **Pathology International**, v. 59, n. 9, p. 605–622, 2009.

OTRUBOVÁ, O. et al. Therapeutic effects of N-acetyl-L-cysteine on liver damage induced

by long-term CCl₄ administration. **General physiology and biophysics**, v. 37, n. 01, p. 23–31, dez. 2018.

OVERMEYER, J. H. Death pathways triggered by activated Ras in cancer cells. **Frontiers in Bioscience**, v. 16, n. 1, p. 1693, 2011.

OYAMADA, M. et al. Aberrant expression of gap junction gene in primary human hepatocellular carcinomas: Increased expression of cardiac-type gap junction gene connexin 43. **Molecular Carcinogenesis**, v. 3, n. 5, p. 273–278, 1990.

OYAMADA, Y. et al. Aberrant expression, function and localization of connexins in human esophageal carcinoma cell lines with different degrees of tumorigenicity. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 120, n. 8, p. 445–453, ago. 1994.

PANCHINA, Y. et al. A ubiquitous family of putative gap junction molecules. **Current Biology**, v. 10, n. 13, p. R473–R474, jun. 2000.

PELEGRIN, P.; SURPRENANT, A. Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1 β release by the ATP-gated P2X₇ receptor. **The EMBO Journal**, v. 25, n. 21, p. 5071–5082, 1 nov. 2006.

PENUELA, S. et al. Pannexin 1 and pannexin 3 are glycoproteins that exhibit many distinct characteristics from the connexin family of gap junction proteins. **Journal of Cell Science**, v. 120, n. 21, p. 3772–3783, 9 out. 2007.

PETRICK, J. L. et al. Have incidence rates of liver cancer peaked in the United States? **Cancer**, v. 126, n. 13, p. 3151–3155, 15 jul. 2020.

PITOT, H. C. Adventures in Hepatocarcinogenesis. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 2, n. 1, p. 1–29, fev. 2007.

PLANTE, I.; CHARBONNEAU, M.; CYR, D. G. Decreased gap junctional intercellular communication in hexachlorobenzene-induced gender-specific hepatic tumor formation in the rat whereas only a small percentage of males are responsive . in carcinogenesis . Gap junctions are composed of proteins decre. **Carcinogenesis**, v. 23, n. 7, p. 1243–1249, 2002.

POON, D. et al. Management of hepatocellular carcinoma in Asia: consensus statement from the Asian Oncology Summit 2009. **The Lancet Oncology**, v. 10, n. 11, p. 1111–1118, nov. 2009.

PROTZER, U.; MAINI, M. K.; KNOLLE, P. A. Living in the liver: hepatic infections. **Nature Reviews Immunology**, v. 12, n. 3, p. 201–213, 24 mar. 2012.

QI, Y. et al. Two-dimensional differential gel electrophoresis/analysis of diethylnitrosamine induced rat hepatocellular carcinoma. **International Journal of Cancer**, v. 122, n. 12, p. 2682–2688, 15 jun. 2008.

- QIN SU; BANNASCH, P. Relevance of Hepatic Preneoplasia for Human Hepatocarcinogenesis. **Toxicologic Pathology**, v. 31, n. 1, p. 126–133, 2 jan. 2003.
- QIU, W. et al. PUMA-mediated apoptosis drives chemical hepatocarcinogenesis in mice. **Hepatology**, v. 54, n. 4, p. 1249–1258, out. 2011.
- REN, Z. et al. Diagnosis, Therapy, and Prognosis for Hepatocellular Carcinoma. **Analytical Cellular Pathology**, v. 2020, p. 1–2, 3 fev. 2020.
- RINGELHAN, M. et al. The immunology of hepatocellular carcinoma. **Nature Immunology**, v. 19, n. 3, p. 222–232, 29 mar. 2018.
- ROMUALDO, G. R. et al. An integrative analysis of chemically-induced cirrhosis-associated hepatocarcinogenesis: Histological, biochemical and molecular features. **Toxicology Letters**, v. 281, n. June, p. 84–94, 2017.
- ROMUALDO, G. R. et al. Fibrosis-associated hepatocarcinogenesis revisited: Establishing standard medium-term chemically-induced male and female models. **PLOS ONE**, v. 13, n. 9, p. e0203879, 13 set. 2018.
- ROMUALDO, G. R. et al. Drinking for protection? Epidemiological and experimental evidence on the beneficial effects of coffee or major coffee compounds against gastrointestinal and liver carcinogenesis. **Food Research International**, v. 123, n. April, p. 567–589, set. 2019.
- ROMUALDO, G. R. et al. The combination of coffee compounds attenuates early fibrosis-associated hepatocarcinogenesis in mice: involvement of miRNA profile modulation. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 85, p. 108479, nov. 2020.
- RUCH, R. J. The role of gap junctional intercellular communication in neoplasia. **Annals of Clinical and Laboratory Science**, v. 24, n. 3, p. 216–231, 1994.
- RUTKOWSKI, R. et al. [Structure and physiological function of connexin proteins]. **Postepy higieny i medycyny doswiadczalnej (Online)**, v. 62, n. Cl, p. 632–41, 20 nov. 2008.
- S DE MITRI, I. M. et al. HCV-associated liver. **Seminars in Liver Disease**, p. 413–415, 1995.
- SÁEZ, P. J. et al. Regulation of Hemichannels and Gap Junction Channels by Cytokines in Antigen-Presenting Cells. **Mediators of Inflammation**, v. 2014, p. 1–23, 2014.
- SANTHEKADUR, P. K.; KUMAR, D. P.; SANYAL, A. J. Preclinical models of non-alcoholic fatty liver disease. **Journal of Hepatology**, v. 68, n. 2, p. 230–237, fev. 2018.
- SCHLAGETER, M. et al. Histopathology of hepatocellular carcinoma. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 43, p. 15955–15964, 2014.
- SEPTER, S. et al. Yes-associated protein is involved in proliferation and differentiation

- during postnatal liver development. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 302, n. 5, p. G493–G503, 1 mar. 2012.
- SHEEN, I.-S. Are gap junction gene connexins 26, 32 and 43 of prognostic values in hepatocellular carcinoma A prospective study. **World Journal of Gastroenterology**, v. 10, n. 19, p. 2785, 2004.
- SHI, G. et al. Panx1 promotes invasion-metastasis cascade in hepatocellular carcinoma. **Journal of Cancer**, v. 10, n. 23, p. 5681–5688, 2019.
- SHI, J.-Y. et al. Inferring the progression of multifocal liver cancer from spatial and temporal genomic heterogeneity. **Oncotarget**, v. 7, n. 3, p. 2867–2877, 19 jan. 2016.
- SINGAL, A. G.; EL-SERAG, H. B. Hepatocellular Carcinoma From Epidemiology to Prevention: Translating Knowledge into Practice. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 13, n. 12, p. 2140–2151, nov. 2015.
- SLATER, T. F.; CHEESEMAN, K. H.; INGOLD, K. U. Carbon tetrachloride toxicity as a model for studying free-radical mediated liver injury. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences**, v. 311, n. 1152, p. 633–645, 17 dez. 1985.
- SONG, B. et al. Screening for lymphatic metastasis-associated genes in mouse hepatocarcinoma cell lines Hca-F and Hca-P using gene chip. **Ai zheng = Aizheng = Chinese journal of cancer**, v. 24, n. 7, p. 774–780, 2005.
- SOOKOIAN, S.; PIROLA, C. J. Liver enzymes, metabolomics and genome-wide association studies: From systems biology to the personalized medicine. **World Journal of Gastroenterology**, v. 21, n. 3, p. 711, 2015.
- STEER, C. J. Liver regeneration. **The FASEB Journal**, v. 9, n. 14, p. 1396–1400, nov. 1995.
- STEIN, L. S.; BOONSTRA, J.; BURGHARDT, R. C. Reduced cell-cell communication between mitotic and nonmitotic coupled cells. **Experimental Cell Research**, v. 198, n. 1, p. 1–7, jan. 1992.
- STOWELL, R. E. et al. Histochemical and microchemical changes in experimental cirrhosis and hepatoma formation in mice by carbon tetrachloride. **Cancer research**, v. 11, n. 5, p. 345–54, maio 1951.
- SUI, G. et al. Study of the correlation between H-ras mutation and primary hepatocellular carcinoma. **Oncology Letters**, v. 4, n. 4, p. 779–782, out. 2012.
- TEMME, A.; TRAUB, O.; WILLECKE, K. Downregulation of connexin32 protein and gap-junctional intercellular communication by cytokine-mediated acute-phase response in immortalized mouse hepatocytes. **Cell and Tissue Research**, v. 294, n. 2, p. 345–350, 8 out. 1998.

- THOMPSON, R. J. Ischemia Opens Neuronal Gap Junction Hemichannels. **Science**, v. 312, n. 5775, p. 924–927, 12 maio 2006.
- TORRE, L. A. et al. Global cancer statistics, 2012. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 65, n. 2, p. 87–108, mar. 2015.
- TRICKER, A. R.; KUBACKI, S. J. Review of the occurrence and formation of non-volatile N-nitroso compounds in foods†. **Food Additives and Contaminants**, v. 9, n. 1, p. 39–69, jan. 1992.
- TSUCHIDA, T.; FRIEDMAN, S. L. Mechanisms of hepatic stellate cell activation. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 14, n. 7, p. 397–411, 10 jul. 2017.
- TSUDA, H. et al. Cell proliferation and advancement of hepatocarcinogenesis in the rat are associated with a decrease in connexin 32 expression. **Carcinogenesis**, v. 16, n. 1, p. 101–105, 1995.
- TSUDA, S. DNA Damage Induced by Red Food Dyes Orally Administered to Pregnant and Male Mice. **Toxicological Sciences**, v. 61, n. 1, p. 92–99, 1 maio 2001.
- 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, ago. 2014.
- UEHARA, T. et al. Molecular Mechanisms of Fibrosis-Associated Promotion of Liver Carcinogenesis. **Toxicological Sciences**, v. 132, n. 1, p. 53–63, mar. 2013.
- UEHARA, T.; POGRIBNY, I. P.; RUSYN, I. The DEN and CCl₄ -Induced Mouse Model of Fibrosis and Inflammation-Associated Hepatocellular Carcinoma. **Current Protocols in Pharmacology**, v. 66, n. 1, p. 14.30.1-14.30.10, 2 set. 2014.
- VALERY, P. C. et al. Projections of primary liver cancer to 2030 in 30 countries worldwide. **Hepatology**, v. 67, n. 2, p. 600–611, 23 fev. 2018.
- VESSELINOVITCH, S. D. et al. Carcinogenicity of diethylnitrosamine in newborn, infant, and adult mice. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 108, n. 1, p. 60–65, jul. 1984.
- VESSELINOVITCH, S. D. Certain Aspects of Hepatocarcinogenesis in the Infant Mouse Model. **Toxicologic Pathology**, v. 15, n. 2, p. 221–228, 25 fev. 1987.
- VILCHEZ, V. Targeting Wnt/ β -catenin pathway in hepatocellular carcinoma treatment. **World Journal of Gastroenterology**, v. 22, n. 2, p. 823, 2016.
- VILLANUEVA, A. et al. Combining Clinical, Pathology, and Gene Expression Data to Predict Recurrence of Hepatocellular Carcinoma. **Gastroenterology**, v. 140, n. 5, p. 1501-1512.e2, maio 2011.
- VINKEN, M. et al. Connexins and their channels in cell growth and cell death. **Cellular**

Signalling, v. 18, n. 5, p. 592–600, maio 2006.

VINKEN, M. et al. Non-channel functions of connexins in cell growth and cell death.

Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, v. 1818, n. 8, p. 2002–2008, ago. 2012.

VINKEN, M. Gap junctions and non-neoplastic liver disease. **Journal of Hepatology**, v. 57, n. 3, p. 655–662, set. 2012.

WANG, Z.-S. et al. Connexin-43 can delay early recurrence and metastasis in patients with hepatitis B-related hepatocellular carcinoma and low serum alpha-fetoprotein after radical hepatectomy. **BMC Cancer**, v. 13, n. 1, p. 306, 24 dez. 2013.

WEBER, L. W. D.; BOLL, M.; STAMPFL, A. Hepatotoxicity and Mechanism of Action of Haloalkanes: Carbon Tetrachloride as a Toxicological Model. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 33, n. 2, p. 105–136, 29 jan. 2003.

WEGHORST, C. M.; PEREIRA, M. A.; KLAUNIG, E. Strain differences in hepatic tumor promotion by phenobarbital in diethylnitrosamine- and dimethylnitrosamine-initiated infant male mice. **Carcinogenesis**, v. 10, n. 8, p. 1409–1412, 1989.

WICKI-STORDEUR, L. E. et al. Pannexin 1 regulates postnatal neural stem and progenitor cell proliferation. **Neural Development**, v. 7, n. 1, p. 11, 4 dez. 2012.

WILSON, M. R.; CLOSE, T. W.; TROSKO, J. E. Cell population dynamics (apoptosis, mitosis, and cell-cell communication) during disruption of homeostasis. **Experimental Cell Research**, v. 254, n. 2, p. 257–268, 2000.

WONG, V. W.-S. et al. High serum interleukin-6 level predicts future hepatocellular carcinoma development in patients with chronic hepatitis B. **International Journal of Cancer**, v. 124, n. 12, p. 2766–2770, 15 jun. 2009.

YAMAMOTO, M. et al. Role of the BrafV637E mutation in hepatocarcinogenesis induced by treatment with diethylnitrosamine in neonatal B6C3F1 mice. **Molecular Carcinogenesis**, v. 56, n. 2, p. 478–488, 2017.

YAMAMOTO, T. et al. IL-1 β regulates expression of Cx32, occludin, and claudin-2 of rat hepatocytes via distinct signal transduction pathways. **Experimental Cell Research**, v. 299, n. 2, p. 427–441, out. 2004.

YAMAOKA, K. et al. Expression of gap junction protein connexin 32 and E-cadherin in human hepatocellular carcinoma. **Journal of Hepatology**, v. 22, n. 5, p. 536–539, maio 1995.

YANG, J. D. et al. Cirrhosis Is Present in Most Patients With Hepatitis B and Hepatocellular Carcinoma. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 9, n. 1, p. 64–70, jan. 2011.

YANG, Y. et al. Downregulated connexin32 promotes EMT through the Wnt/ β -catenin

pathway by targeting Snail expression in hepatocellular carcinoma. **International Journal of Oncology**, v. 50, n. 6, p. 1977–1988, jun. 2017.

YE, Q. et al. Cytochrome P450 2E1 inhibition prevents hepatic carcinogenesis induced by diethylnitrosamine in alcohol-fed rats. **Hepatobiliary surgery and nutrition**, v. 1, n. 1, p. 5–18, dez. 2012.

YU, M. C.; YUAN, J.-M.; LU, S. C. Alcohol, cofactors and the genetics of hepatocellular carcinoma. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 23, n. s1, p. S92–S97, mar. 2008.

ZALATNAI, A.; LAPIS, K. Decreased hepatocarcinogenic effect of diethylnitrosamine in experimentally induced liver cirrhosis in rat: delay or inhibition? **Cancer Letters**, v. 79, n. 1, p. 1–7, abr. 1994.

ZHANG, L. et al. Role for nitric oxide in permeability of hippocampal neuronal hemichannels during oxygen glucose deprivation. **Journal of Neuroscience Research**, v. 86, n. 10, p. 2281–2291, 1 ago. 2008.

ZHANG, X.; EL-SERAG, H. B.; THRIFT, A. P. Sex and Race Disparities in the Incidence of Hepatocellular Carcinoma in the United States Examined through Age–Period–Cohort Analysis. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 29, n. 1, p. 88–94, jan. 2020.

ZHAO, B. et al. Connexin32 regulates hepatoma cell metastasis and proliferation via the p53 and Akt pathways. **Oncotarget**, v. 6, n. 12, p. 10116–10133, 2015.

ZHAO, W. et al. Activated hepatic stellate cells promote hepatocellular carcinoma development in immunocompetent mice. **International Journal of Cancer**, v. 129, n. 11, p. 2651–2661, 1 dez. 2011.

8. Anexo I

CERTIFICADO Nº 1345/2020 – CEUA

Certificamos que o projeto intitulado: **“Expressão da conexina 43 (Cx43) e panexina 1 (Panx1) nas diferentes etapas da hepatocarcinogênese química associada à fibrose em camundongos C3H/Hej”**, conduzido pela Pesquisadora: **Luis Arthur Sensulini** – Orientador: Prof. Dr. Luis Fernando Barbisan – Coorientador: Prof. Dr. Bruno Cogliati, registrada com o nº **1345/2020**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (e xceto humanos), para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei n. 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto n. 6.899, de 15 de julho de 2009, com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi APROVADA pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Botucatu, em reunião extraordinária de 04 de março de 2020.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	02/04/2022
Espécie/Linhagem/Raça	Camundongo Isogênico
Nº de animais	45
Idade/Peso	02 semanas – 06 gramas
Sexo	Machos
Origem	Biotério da USP



Sara Rosa Stanley Sampaio
Secretária da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP



Profa. Associada Bertha Furlan Polegato
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE BOTUCATU
FACULDADE DE MEDICINA



Comissão de Ética no Uso de Animais

Criada através da Portaria DFM nº 611 de 13/12/2012