

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 27/05/2023.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS 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

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