ALEXANDRO DOS SANTOS RODRIGUES

**Expressão e distribuição
da conexina 32
em fígados com fibrose
experimentalmente
induzida**

São Paulo

2004

ALEXANDRO DOS SANTOS RODRIGUES

**Expressão e distribuição da
conexina 32 em fígados com
fibrose experimentalmente
induzida**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Departamento:

Cirurgia

Área de concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Prof. Dr. Francisco Javier Hernandez-Blazquez

São Paulo

2004

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 1440
FMVZ

Rodrigues, Alexandro dos Santos

Expressão e distribuição da conexina 32 em fígados com fibrose experimentalmente induzida / Alexandro dos Santos Rodrigues. – São Paulo : A. S. Rodrigues, 2004.
106 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, 2004.

Programa de Pós-graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Javier Hernandez-Blazquez.

1. Dimetilnitrosamina. 2. Fibrose hepática. 3. Conexina 32. I.
Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Expressão e distribuição da conexina 32 em fígados com fibrose experimentalmente induzida", protocolo nº337/2003, utilizando 30 ratos albinos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Francisco Javier Hernandez Blazquez, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado "ad referendun".

(We certify that the Research "Expression and distribution of connexin 32 liver with experimentally induced fibrosis" protocol number 337/2003, utilizing 30 rats, under the responsibility of Prof. Dr. Francisco Javier Hernandez Blazquez, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendun").

São Paulo, 19 de outubro de 2004

Profª Drª Julia Maria Matera
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: RODRIGUES, Alexandro dos Santos.

Título: Expressão e distribuição da conexina 32 em fígados com fibrose experimentalmente induzida.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Data: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof.(a) Dr.(a) _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof.(a) Dr.(a) _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

A ti, meu **DEUS** e meu eterno pai celeste, pela sua glória e ajuda manifestadas neste trabalho.

As duas mulheres mais importantes da minha vida: **A R M I N D A & S I L V I A**, mais do que isto, vocês são o presente o mais valioso que **DEUS** me concedeu, a luz que ilumina em meu caminho, a alegria que se faz presente no brilho do meu olhar e o motivo de minha felicidade na existência desde plano. O seu afeto sem limites e a sua manifestação de carinho, fazem de vocês a personificação viva da palavra amor. Amor este que me zelou, me cuidou e me amparou sempre e em todos os momentos, ainda que eu, em meio à este trabalho tenha falhado em lhes dar a atenção merecida, me tornando ausente em muitos momentos. Motivo este pelo qual peço o vosso perdão e mostro o desejo de dedicar-lhes a essência deste trabalho, bem como cada parte do meu empenho nele empregado.

À VOCÊS MANIFESTO MINHA ETERNA GRATIDÃO.

AGRADECIMENTOS I

“Cada pessoa equivale a um grão de areia, mas uma multidão é como uma pedra de ouro.”

(Provérbio Chinês)

Este provérbio elucida que a busca do meu aprimoramento teve como principal vertente o auxílio que recebi nesta jornada. DEUS que com suas infinitas provisões tocou o coração destas pessoas as quais agradeço com muito carinho e respeito manifestando meus sinceros agradecimentos:

À minha família:

Pai e Mãe, pelo apoio prestado.

Meu **Mano** e minhas **Sobrinhas**, pelos momentos de alegria.

Aos meus familiares:

Nelson e Eulália, pelo apoio e a grande ajuda que me deram não só a mim, mas também à minha mãe, sem os quais este trabalho não seria concluído.

Tio Brito, por ter me recebido muito bem em sua casa, pela amizade e preocupação, fazendo com que eu me sentisse um de seus filhos.

Márcio, Lais e Filhas, pelo amor e o carinho com que tratam a minha **Vó**, o que contribui para a minha tranquilidade nos momentos de ausência.

Primos Cristina Menezes e Waldinei, pela grande ajuda que prestaram à minha família, O que muito contribuiu para o bom andamento do meu trabalho aqui em São Paulo.

Aos Amigos:

Si, a amiga que me fez conhecer a frase: “Não leiam meus poemas aqueles que não forem poetas”. Você não só procurou ler meus poemas, como também escreveu alguns dos mais importantes de minha vida. Seu carinho, preocupação e amizade jamais serão esquecidos, ao contrário serão eternizados como todos os nossos poemas.

Valéria, Sheila (Sheilinha) e Maria Tereza, cuja lembrança de nossa amizade me trouxeram alegria nos momentos de aflição.

Robson, pela nossa sólida amizade e pelo valioso auxílio com a parte de informática e a **Auxilia & Família**, pelas agradáveis tardes de sábado.

Dra. Wânia e Nicolas e as Dras. Andressa e Cristina, pela amizade, apoio e interação profissional.

Nilsa, uma amiga que muitos gostariam de ter, mas que DEUS felizmente concedeu à minha mãe. Sua preocupação, dedicação e carinho, jamais serão esquecidos.

Família Casale (Ana, Antônio, Marco, Rhandia, Claudia) e seus “filhos adotivos”: **Atena** (*in memorian*), **Nenê, Erus, Thor, Perseu, Puc, Muk e Fênix**. Pela nossa satisfatória convivência e nossas gostosas conversas.

Cristian, Herbert, Carlos (Carlão), Antônio (Bandeiras), Igor, Caio (Bob esponja), Álvaro, Iejus (Torto), Patrícia (Patilene), Carla e Jô, algumas pessoas que compartilhei o mesmo teto, experiências de vida e uma valiosa troca cultural e de conhecimentos.

Aos meus mestres de artes marciais: **Gustavo Castilhos, Paulo Nakamura & Família Shinwa, Thomas Pinheiro & Família Lo e Alexandre Moutran**, pelos princípios de vida e os valiosos ensinamentos, que põem a integridade e a disciplina acima da violência.

AGRADECIMENTOS II

“Um alqueire de trigo é constituído de muitos grãos”

..... (Thomas Fuller)

Este pensamento demonstra a importância de toda a colaboração que tive neste trabalho, refletida no sucesso não de apenas uma, mas de todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para o seu êxito. A vocês eu demonstro a minha gratidão:

Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo – FAPESP, pelo apoio científico e financeiro, sem os quais, este trabalho sequer iniciaria.

Prof. Dr. Francisco Javier Hernandez Blazquez, pela sua competente orientação, seu exemplo profissional e por ter acreditado desde o começo em minha capacidade para a realização deste trabalho.

Profa. Dra. Arani Nanci Bomfim Mariana, pela amizade e por ter desencadeado o processo que me levou ao meio científico.

Profa. Dra. Maria Angélica Miglino, por sua competência profissional e pela oportunidade do meu ingresso no departamento.

Profa. Titular Maria Lúcia Zaidan Dagli, por toda a sua ajuda e o seu grande exemplo, que em minha concepção fizeram dela um ícone profissional.

Profs. Drs. Paula Papa de Carvalho e José Roberto Kifoury Junior, pelo auxílio profissional.

Profa. Dra. Irvênia, pela sua conduta humana e profissional, que muito me inspira.

Prof. Dr. Antônio Augusto Coppi Maciel Ribeiro, por compartilhar seu vasto conhecimento e pelas viagens, junto com o companheiro **Ednaldo (Índio)**, em busca do saber.

Prof. Dr. Eduardo Cunha Farias, pelo seu exemplo didático e seu carisma, que levaram muitos alunos a lotarem suas salas de aula.

Profs. Drs. Miguel Cavalcanti e Gilson Luiz Volpato, pela sua motivação e transmissão do conhecimento, que mantenho comigo até os dias de hoje.

Acredito que não somente meus colegas de departamento, mas todas as pessoas que conheci em outros setores, bem como os funcionários da FMVZ marcaram de alguma forma meus dias na pós-graduação, mas algumas delas merecem um destaque especial:

Meus companheiros de laboratório: **Diogo, Ricardo, Bruno, Vivian** e a todos que contribuem de alguma forma para que o laboratório do prof. Francisco (Franciscolândia) seja um lugar onde se cultiva o conhecimento, o companheirismo e a amizade trazendo a este recinto a fama de um prazeroso ambiente de trabalho.

Aos meus “vizinhos” do LITIAN (Balcaverna): **Lílian & Cia**, pelo companheirismo e pela boa vontade que sempre manifestaram em meu auxílio.

Aos meus colegas de Departamento:

- **Hildebrando (Hil), Lucas, André. Dulcinéia, Emerson, Karina, Roberto Gameira, Gisele e Rose**, pela alegria que trouxeram ao departamento;
- **Naiane**, pela sua preciosa amizade;
- **Laura**, pelo coleguismo e preocupação com a minha dissertação;
- **Edson Beneti**, pelos divertidos dias de “escritório”;
- **Helder de Moraes**, pela colaboração que prestou ao meu trabalho;
- **Ivana**, pela ajuda profissional e nossos dias de Imunohistoquímica.
- **Ronaldo e Wanderley**, pelo auxílio técnico;
- **Maicon, Patrícia (Paty) e Kasui**, pela preciosa ajuda burocrática e pela nossa boa convivência.
- **Jaqueline e Gracieva**, pela admiração que vocês têm pela minha pessoa o que muito envaideceu meus dias no departamento;
- **Ana Lúcia, Ana Paula e Elizete**, pela importante contribuição que deram mantendo limpo o nosso lugar de trabalho.

Aos meus colegas do Departamento de Patologia Veterinária:

- **Ivone**, pela ajuda profissional e a divisão de conhecimentos que se mostraram tão úteis quanto a sua valiosa amizade;

- **Elizabeth Teodorov**, pela grande ajuda profissional e pessoal, sem as quais este trabalho não seria finalizado. À você, a minha eterna gratidão;
- **Claúdia Madalha Cabreira Mori**, pela grande ajuda com os animais do biotério;
- **José Luis Avanzo e Cyntia Esteves de Lima**, pela participação de suas mentes brilhantes o que tornou possível a realização deste trabalho;
- **Tereza, Silvia, Héidge & Cia**, pela paciência e ajuda prestada enquanto tive neste departamento;
- **Emerson Flávio Freitas Mota (Prof. de Patologia Veterinária da Uniabc)**, pelo auxílio com a interpretação das lâminas;
- **Silvia**, secretária de pós-graduação, pela ajuda profissional e pela amizade.

As minhas colegas bibliotecárias: que formam não só uma verdadeira equipe modelo, como também motivam os alunos à pesquisa e os estudos. A vocês, minha consideração e meu carinho que manifesto na satisfação de ter conhecido profissionais aptas e capazes como vocês. Recebam meus agradecimentos:

- ♦ **Helza**, pela sua atenção e seu empenho no meu sucesso com a dissertação;
- ♦ **Rosa Zani**, pela indispensável atenção e interesse na resolução de meus problemas bibliográficos;
- ♦ **Margerete**, pela dedicação e boa vontade na correção das normas técnicas deste trabalho;
- ♦ **Ana Cristina**, pelo valiosa ajuda com as minhas pesquisas;
- ♦ **Elena**, por sempre me atender de forma cordial e atenciosa;
- ♦ **Alexandre, Bráz, Claudia, Cristiane, Dirce. Eraldo, Felipe, Mara, Rose, Solange** e a todos os outros profissionais não citados, mas que fazem da biblioteca da FMVZ um perfeito ambiente na busca da informação.

Esta é a parte mais difícil deste trabalho, não por apresentar algum grau de complexidade, mas por correr o risco de esquecer alguém que de alguma maneira, tenha contribuído para a conclusão deste trabalho, por isto, desde já, aqueles que não inclui nestas listas, não foi por ingratidão. A eles peço o meu perdão.

O APRENDIZ E O LÁPIS

Um dia me perguntaram:

_ Alex, todos se espelham em uma ou várias pessoas para conseguirem alcançar seus objetivos na vida. Em quem você se espelha?

Como conheço muitas pessoas e li uma quantidade considerável de livros, me senti incapaz de responder a pergunta, pois eu não queria responder de uma forma incompleta.

Passado algum tempo, enquanto fazia a parte de agradecimentos desta dissertação lembrei-me novamente desta pessoa e da pergunta que tinha me feito. Em um momento de devaneio, meu olhar vagou por sobre a minha mesa de trabalho, e olhando um lápis, pude observar o quanto este objeto era útil em meio a toda sua simplicidade. Então recordei-me de uma valiosa lição que aprendi na vida: “Uma simples resposta pode ofuscar a mais complexa das perguntas”, logo, encontrei a resposta para a pergunta que tinha sido feita:

_ Para alcançar meus objetivos na vida, eu me espelho em um simples LÁPIS, pois ele me faz lembrar de cinco preceitos muito importantes:

1- Eu posso fazer grandes coisas, mas não devo esquecer que existe uma mão que guia meus “traços”. Esta mão eu chamo de DEUS, e ela me conduz em direção à sua Vontade;

2- De vez em quando é preciso parar o que estou escrevendo, e usar o apontador. Isso faz com que o lápis sofra um pouco, mas no final, ele estará mais afiado. Portanto, procuro suportar algumas dores, porque elas me farão ser uma pessoa melhor;

3- O lápis sempre permite que seja usada uma borracha para apagar aquilo que estava errado. Com isto, busco entender que corrigir um erro cometido, não é necessariamente algo mau, mas algo importante que vai me manter longe deste e de muitos outros erros;

4- O que realmente importa no lápis não é a madeira ou sua forma exterior, mas o grafite que está em seu interior. Em vista disso, sempre almejo cuidar daquilo que acontece dentro de meu ser;

5- O lápis sempre deixa uma marca. Da mesma maneira, sei que tudo o que eu fizer na vida, irá deixar marcas, sendo assim, procuro ser consciente de cada ação efetuada por minhas mãos.

RESUMO

RODRIGUES, A. S. **Expressão e distribuição da conexina 32 em fígados com fibrose experimentalmente induzida.** [Expression and distribution of connexin 32 in liver with experimentally induced fibrosis]. 2004. 106 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

A conexina 32 (Cx32) é uma estrutura protéica que constitui os canais que promovem as comunicações intercelulares via junções comunicantes (GJIC), permitindo difusão de pequenas moléculas citoplasmáticas de uma célula à outra. Este trabalho objetivou os estudos destas estruturas devido a sua importância em processos hepáticos, mais especificamente, a fibrose hepática. O presente estudo foi realizado através da administração oral da droga hepatotóxica dimetilnitrosamina (DMN) em ratas Wistar duas vezes por semana em dias consecutivos no prazo de cinco semanas. A necropsia destes animais foi realizada após cinco semanas da última administração da droga e revelou um quadro de fibrose hepática, em contrapartida aos resultados obtidos em um grupo controle com a mesma quantidade de animais. O material fibrótico foi submetido à análise imunohistoquímica que revelou uma presença preferencial de Cx32 dispersa no citoplasma, o que pode levar à hipótese de problemas no mecanismo de transporte citoplasmático destas estruturas, em contrapartida ao material pertencente ao grupo controle que evidenciou a presença das Cx32 na membrana plasmática formando placas juncionais. Quando submetido à análises moleculares o fígado fibrótico revelou uma diminuição da expressão gênica embora o produto protéico deste material quando comparado ao grupo controle não tenha se mostrado diminuído.

Palavras-chave: Dimetilnitrosamina. Fibrose hepática. Conexina 32

ABSTRACT

RODRIGUES, A. S. **Expression and distribution of connexin 32 in liver with experimentally induced fibrosis.** [Expressão e distribuição da conexina 32 em fígados com fibrose experimentalmente induzida]. 2004. 106 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

The connexin 32 (Cx32) is a proteic structure that constitute the channels that promote the cell communication by means of the gap junction (GJIC), allowing the diffusion of short cytoplasmic molecules from a cell to another. This work aimed to study these structures due to their importance in the hepatic metabolic processes. The hepatic fibrosis was triggered by the oral administration of dimethylnitrosamine (DMN) in the female rat Wistars twice a week in consecutive days during five weeks. The necropsy of these animals was carried out after the last drug administration. They presented a hepatic fibrosis state. The fibrotic material was submitted to the imunohistochemical analysis, which showed a preferencial presence of Cx32 in the cytoplasm, whereas in the control group the Cx32 was located at the membranes, in the junctional plaques. The molecular analysis showed a decrease of the genic expresson of the fibrotic material, however the proteic product wasn' t reduced in comparison with the control group as it was shown by western blot. We concluded that the fibrotic state introduced a disturbance in the intracellular distribution and genic expression of the connexin 32.

Key words: Dimethylnitrosamine. Hepatic fibrosis. Connexin 32

Lista das abreviaturas e termos em inglês utilizados neste trabalho.

Existem termos na literatura científica que uma vez traduzidos, mudam o seu sentido. Por este motivo, estes termos foram preferencialmente mantidos em inglês, mas têm seu significado descrito abaixo juntamente com a lista de abreviaturas usadas neste trabalho.

Ct	Ciclo Limiar.
CTGF	Fator de Crescimento do Tecido de Conexão.
Cx	Conexina.
Cxs	Conexinas.
Cx26	Conexina 26.
Cx32	Conexina 32.
Cx43	Conexina 43.
DEPC	Dietil Pirocarbonato.
DTT	Ditiotreitol.
DMN	Dimetilnitrosamina.
Gap	Fenda.
GJIC	Comunicações Intercelulares via Junções Comunicantes.
HE	Hematoxilina Eosina.
HSC	Células Hepáticas Estreladas.
MEC	Matrix Extracelular.
mRNA	RNA Mensageiro.
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase.

Primer	Origem, ou ponto inicial para a replicação do DNA. Sequência curta (Geralmente de RNA), que se liga a uma porção de DNA, na qual se inicia a síntese da cadeia de desoxirribonucleotídeos.
RNA	Ácido Ribonucleico
RT	Transcrição Reversa.
RT-PCR	Transcrição Reversa Combinada com a Reação em Cadeia da Polimerase.
SDS	Dodecilsulfato de Sódio.
TGF- β	Fator de Crescimento Transformante β .
TTBS	Tris Buffer Salina Twenty.
Western Blot	Método para a identificação de proteínas, baseado em extração, eletroforese, transferência e identificação através de anticorpos e sistema de revelação.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	OBJETIVOS	23
3	REVISÃO DE LITERATURA	25
3.1	O Órgão Fígado	26
3.1.1	Regeneração Hepática	28
3.1.2	A Histologia Hepática	31
3.2	A Fibrose (ou Fibroplasia) Hepática	34
3.2.1	As Fibras do Tecido Conjuntivo	34
3.2.2	A Inflamação Crônica na Fibroplasia Hepática	36
3.2.2.1	A Importância das Células Hepáticas Estreladas	37
3.2.3	O Mecanismo da Fibrose Hepática	39
3.2.4	Fibrose e Cirrose	42
3.3	A Dimetilnitrosamina (DMN)	44
3.3.1	Dimetilnitrosamina e Fibrose	45
3.4	As Conexinas 32	47
3.4.1	As Junções Tipo <i>Gap</i>	47
3.4.2	As Conexinas	49
3.4.3	As Conexinas 32 e seu Relacionamento com o Fígado	51
4	MATERIAL E MÉTODOS	55
4.1	Animais	56
4.2	Procedimentos Experimentais	56
4.3	Processamento do Fígado para Histologia	57
4.4	Fixação e Inclusão do Material	57
4.5	Colorações para Microscopia de Luz	58
4.6	Imuno-Histoquímica	58
4.7	Western Blot	59
4.8	Real Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)	60
4.8.1	Extração RNA Total pelo Método do Trizol	60

4.8.2	Quantificação RNA Total	61
4.8.3	Tratamento do RNA Total com Dnase I	62
4.8.4	Transcrição Reversa (RT)	63
4.8.5	PCR em Tempo Real no Abiprism® 7000 Sequence Detection Systems (Applied Biosystems)	63
4.8.6	Primers e Sondas	65
4.8.7	Condições da Reação de Real Time PCR (RT-PCR)	67
4.8.8	Interpretação dos Resultados Obtidos no Sistema de Real Time PCR (RT-PCR)	68
4.8.8.1	Método Comparativo do $2^{-\Delta\Delta C_t}$ para a Quantificação Relativa (Livak; Schmittgen, 2001)	68
4.8.8.1.1	Derivação da Fórmula	68
5	RESULTADOS	72
5.1	Análises por Microscopia de Luz	73
5.2	Análises Imuno-Histoquímicas	78
5.3	Análises Moleculares	80
5.3.1	RT-PCR	80
5.2.2	Western Blot	83
6	DISCUSSÃO	84
6.1	Cirrose e Fibrose	85
6.2	Microscopia de Luz	86
6.3	Fibrose Hepática	87
6.4	Imuno-Histoquímica	88
6.5	RT-PCR e Western Blot	89
7	CONCLUSÕES	92
	REFERÊNCIAS	94

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Entre os processos degenerativos que acometem o homem e outras espécies, a cirrose hepática é um dos que causa mais preocupação, tanto à sua incidência global quanto ao seu prognóstico. Uma pesquisa revelou, que dos casos de hepatopatias submetidos à biópsias, 15% acusaram cirrose hepática (JOHNSON, 1997). No homem, além dos casos de cirrose hepática por alcoolismo e hepatopatias crônicas (entre outras), ainda existe um dado atual relatado pela Organização Mundial da Saúde (HEPATITE, 2000) mostrando que de 2,5% a 4,9% da população brasileira e pelo menos, 1,5% a 2% da população mundial (SILVA, 2000), são portadoras do VHC, o vírus da hepatite C, que é um RNA vírus de única fita, com genoma clonado e seqüenciado em 1989, pertencente à família *Flaviviridae*. O estágio final desta atual doença, que constitui um grave problema de saúde pública se manifesta basicamente por carcinoma hepatocelular, precedido de cirrose e antecedido por fibrose hepática. Santos (1986), cita que a cirrose hepática ocorre nas diferentes espécies domésticas, sendo mais freqüente no cão (CORNELIUS, 1996), no suíno e no cavalo; onde no cão apresenta uma incidência muito elevada.

A fibrose hepática ocorre em resposta a inflamação ou insulto tóxico direto ao fígado. A diferença entre todas as outras respostas agressões consiste no fato da fibrose hepática geralmente ser uma consequência irreversível da lesão hepática

(CRAWFORD, 2000). Este mesmo autor cita que a continuidade da fibrose leva à mudanças na arquitetura hepática, culminando no patológico denominado cirrose.

Além das causas citadas, as diversas hepatopatias em estágio terminal podem ser decorrentes de várias causas, entre elas o câncer, a lesão imunológica e a hipóxia. Johnson (1997) cita episódios crônicos ou repetidos de lesão hepática pela exposição às toxinas ou medicamentos (ex.: terapia com medicamentos anticonvulsivantes). Uma lesão hepática crônica pode resultar num estágio terminal caracterizado por fibrose ou cirrose hepática.

O hepatócito, como todas as células de organismos multicelulares, necessita estar em contacto com outras células. Dentre os vários pontos de contactos célula-célula, existem as comunicações intercelulares via junções comunicantes, ou junções do tipo *gap*, que são estruturas que permitem a comunicação citosólica entre as células.

Naves e Moreno (2000), citam que as junções *gap* têm uma importância fundamental na manutenção da homeostase dos tecidos e no controle da diferenciação e proliferação celulares. Elas são formadas por canais transmembranosos denominados conexos (hemicanais), que são constituídos por seis subunidades de proteínas denominadas Cxs, cuja localização se dá ao redor de um poro central. Yamaoka et al. (1995, 1999), relatam que este tipo de comunicação celular parece ter um importante papel na carcinogênese. As junções comunicantes permitem manter a célula “iniciada” (com dano irreversível no material genético) inalterada, em comunicação juncional com as células não-transformadas no tecido adjacente. Desta forma, as junções comunicantes funcionam como um canal condutor de sinais que regulam a proliferação da célula normal para a célula

“iniciada”, provavelmente suprimindo sua transformação neoplásica (YAMASAKI, 1991). Isto se confirma em 7 espécies de carcinomas hepatocelulares humanos, onde Yamaoka et al. (1995) descrevem que o número de Cx32 encontradas por mm² de fígado carcinomatoso é significativamente menor do que em tecidos cirróticos não-carcinomatosos.

Em cirroses hepáticas e hepatites virais crônicas, o número de junções comunicantes também se mostrou menor que o observado em fígados normais (NAKATA et al., 1996; YAMAOKA, 1999). Nakata et al. (1996) observaram que ocorre redução da Cx32 em fígados com lesão crônica induzida por tetracloreto de carbono, embora tivessem notado um aumento de seu mRNA e imagens de placas atípicas. Recentemente foi verificado em um estudo *in vitro*, que as Cxs podem ser expressas sem formarem junções comunicantes, sendo acumuladas no citoplasma, se seu mecanismo de transporte citoplasmático estiver defeituoso (HERNANDEZ-BLAZQUEZ et al., 2001; YANO et al., 2001) ou se a E-caderina não estiver presente, o que poderia explicar as placas atípicas e o aumento de mRNA sem aumento das junções comunicantes descritas por Nakata et al. (1996).

Considerando que a fibrose culmina no importante processo patológico conhecido como cirrose (CRAWFORD, 2000; FRIEDMAN, 1999; LEE; YOON; MOON, 2004; PARADIS et al., 1999; PINES et al., 1997; YASUDA et al., 1999) e aparece secundariamente à lesões hepáticas graves, podendo contribuir significativamente para a doença e o óbito (CHEVILLE, 2004), juntamente ao fato das Cx32 apresentarem uma co-relação importante com as injúrias que ocorrem no

fígado, resolvemos investigar os efeitos dos processos fibróticos no fígado sobre a expressão da Cx32.

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

Visto que as proteínas da membrana que formam os canais intercelulares, ou conexinas, apresentam sua distribuição alterada em tecidos que demonstram processos patológicos, este trabalho objetivou estudar:

1. A expressão da conexina 32 em cortes histológicos de fígados de ratas que apresentaram fibrose experimentalmente induzida pela DMN;
2. A distribuição citoplasmática da conexina 32 nos hepatócitos de fígados de ratas que apresentaram fibrose experimentalmente induzida pela DMN;
3. A expressão do gene para conexina 32 e a análise do produto protéico.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3 REVISÃO DE LITERATURA

Devido a quantidade de informações adquiridas pertinente ao assunto abordado, houve a necessidade da divisão deste capítulo para um melhor entendimento deste trabalho.

3.1 O ÓRGÃO FÍGADO

Os sistemas corpóreos podem ser definidos como um grupo ou série de partes interconectadas ou interdependentes, que atuam em conjunto com um propósito comum. Esse grupo ou série de partes são ditos como órgãos. Definida como a parte diferenciada de um organismo, adaptada a uma função definida (DICIONÁRIO MÉDICO BLAKISTON, s.d), a palavra órgão, também é definida por parte corporal mais ou menos independente que desempenha uma função especial (DORLAND, DICIONÁRIO MÉDICO, 1997). Tortora e Grabowski (2002), e Spence (1991), definem órgão como parte do corpo formada por dois ou mais tipos de tecidos, para cumprir uma função especializada. Dentre os vários órgãos que compõe os sistemas corpóreos, com suas diversas e complexas funções, destaco o fígado.

A importância do fígado para o desenvolvimento dos processos vitais é tão significativa que, a sua retirada pode ocasionar a morte rapidamente. Os mamíferos morrem algumas horas após a hepatectomia total. As aves morrem em 24-36 h. A letalidade decorre da queda brusca da glicemia e do aparecimento de substâncias

tóxicas no sangue que normalmente são metabolizadas no fígado (KOLB, 1984). Ainda com relação à importância do fígado perante as espécies, Kolb (1984) cita que uma vaca que tenha uma produção de leite de 20 litros diários, precisa que seu fígado sintetize e secrete 1500-1800g de glicose, 300-350g de proteínas plasmáticas, 300-600g de gorduras e 180-200g de uréia. Nas aves, durante o período de postura, o fígado de uma galinha forma diversas proteínas transportadoras que têm importância no transporte de cálcio, fosfato, ácidos graxos e gorduras no ovário e no oviducto. Além do fato das gorduras e lipoproteínas da gema serem em sua maioria produzidas no fígado. Em cães e gatos, as enfermidades hepáticas são razoavelmente comuns principalmente por deficiências alimentares (proteínas, metionina, colina, entre outras), por parasitoses (larvas migratórias de ascarídeos no porco, fasciolose em ruminantes), por intoxicações e por infecções (como a tuberculose e a leucose) (CENTER, 1997; CORNELIUS, 1996; KOLB, 1984; SHAW e IHLE, 1999).

Sendo a glândula mais pesada do corpo (GANONG, 1989; HAM, 1967; TORTORA; GRABOWSKI, 2002) e considerado por muitos autores o laboratório central do corpo, calcula-se que no fígado ocorrem mais de cinco mil reações químicas (TOMITA, 2003). Em 1967, Ham cita que o fígado possui mais de 100 funções diferentes. Trinta anos mais tarde (1997), Center menciona que este órgão realiza pelo menos 1500 funções bioquímicas vitais. Dentre estas funções podem-se destacar as numerosas funções metabólicas (como: metabolismo de carboidratos, de proteínas e participação no metabolismo de lipídios, além da regulação do metabolismo hormonal), um grande número de biossínteses, a capacidade de transformar inúmeros compostos do sangue e da bile, ação

desintoxicante para determinadas substâncias, formação de depósito de várias vitaminas (A, B₁₂, D, E e K) e oligoelementos, e secreção da bile (GUYTON, 1997; HAM, 1967; KOLB, 1984; TORTORA; GRABOWSKI, 2002).

3.1.1 Regeneração Hepática

Apesar de ser um órgão cujas células se renovam muito lentamente, quando há perda de tecido hepático, por lesão química ou cirúrgica, o fígado apresenta uma grande capacidade de regeneração (BOGLIOLO, 1981; CENTER, 1997; CRAWFORD, 2000; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999) que desempenha um papel central nas funções metabólicas que são essenciais para a sobrevivência (FAUSTO; WEBBER, 1994). Embora o termo regeneração seja comumente usado, é biologicamente incorreto, pois a resposta induzida pela ressecção do tecido hepático não é verdadeiramente regenerativa. Os lóbulos retirados não apresentam recuperação; isto se dá pelo fato da restauração hepática ocorrer por hiperplasia celular compensatória nos lóbulos remanescentes (CENTER, 1997; RAMALHO, 1993), com conseqüente aumento em suas dimensões. Isto sugere que o crescimento do tecido hepático pode ser controlado por fatores funcionais ao invés de fatores anatômicos. Qualquer que seja a natureza destes fatores, eles parecem ser bastante precisos, pois quando o crescimento do fígado cessa, atinge seu peso original, embora possam ocorrer variações de 5 a 10% (RAMALHO, 1993).

O tecido hepático responde a influências geradas tanto fora do organismo como a sinais metabólicos originados em outros órgãos transmitidos através de

hormônios, citocinas, fatores de crescimento e estimulação neural. A resposta funcional pode requerer adaptações que assegurem a sobrevivência de maneira rápida ou crônica, mas não age simplesmente como uma resposta passiva para os comandos externos, ao contrário, isto gera sinais internos que finalmente determinam a natureza e a extensão da resposta. Déficits funcionais extensos criados por perda de tecido ou morte celular podem eventualmente serem desencadeantes de fatores que provocam a restauração da arquitetura e da função hepática. Isto é alcançado unicamente quando existe a coordenação precisa entre os hepatócitos e vários tipos de células não-parênquimais e os componentes da MEC (FAUSTO; WEBBER, 1994). Parra et. al. (1996), comentam que o processo de regeneração em hepatectomia parcial apresenta uma diferença de velocidade na reprodução de seus elementos histológicos onde os hepatócitos irão apresentar um crescimento mais rápido e o colágeno da MEC mais lento. Talvez tal fato ocorra devido à população de hepatócitos, pois estes constituem 90% da massa hepática e 60 % do número total de células envolvidas no processo regenerativo (ALISON, 1986).

Em ratos, a remoção de 75% do parênquima hepático provoca um processo de regeneração, que se completa em um mês (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999). Bogliolo (1981), cita que em ratos, após a destruição de hepatócitos, a regeneração se inicia 14-16 horas após a destruição. Em humanos a regeneração hepática após a hepatectomia parcial se dá num prazo que varia de dois a seis meses (MCDERMOTT et al., 1963; PACK et al., 1962). Em casos de necrose hepatocelular, em que a estrutura de tecido conjuntivo permanece intacta, pode ocorrer uma restituição quase perfeita da estrutura hepática, mesmo quando a

necrose se apresenta de forma maciça ou submaciça (CRAWFORD, 2000). Embora Ham (1967) cite que em casos de lesão celular, tanto de causas alimentares, como pela presença de substâncias tóxicas no sangue, o problema de regeneração se torna muito mais complicado do que quando um fragmento é removido por processos cirúrgicos (hepatectomia parcial).

Junqueira e Carneiro (1999), elucidam que a provável regeneração de vários tecidos é controlada por substâncias de natureza protéica normalmente produzidas pelo próprio tecido, denominadas calonas. Essas proteínas efetuam sua ação inibindo a divisão mitótica das células. Quando um tecido é lesado ou removido parcialmente, as calonas têm sua produção diminuída, o que causa um conseqüente aumento na atividade mitótica no tecido em questão. Conforme vai ocorrendo a regeneração, a produção de calona do tecido aumenta e com isto, diminui a atividade mitótica, caracterizando desta forma um processo auto-regulável.

Usualmente o tecido hepático regenerado é igual ao preexistente. Porém, se a lesão for contínua ou se repetir com freqüência, simultaneamente à regeneração ocorre um considerável aumento do tecido conjuntivo, que pode desorganizar a regeneração (BOGLIOLO, 1981; HAM, 1967; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999), e levar o fígado à um processo patológico conhecido como fibrose que, se persistente evoluirá para cirrose hepática.

3.1.2 A Histologia Hepática

Estima-se que 60% da população celular do fígado de um homem adulto seja de hepatócitos (250 milhões de células), o que compreende cerca de 80% do volume hepático (HAM, 1967; MIYAI, 1994). Sendo uma célula poliédrica (que possui muitas superfícies), cujos limites estão em geral bem definidos (BANKS, 1992), o hepatócito é constituído por um núcleo; às vezes dois, disposto(s) centralmente, apresentando formato arredondado e com um ou dois nucléolos bem evidentes. A organela mais evidente do hepatócito é o retículo endoplasmático, tanto em sua forma lisa como na rugosa. Na forma rugosa aparece, na célula hepática como acúmulos dispersos no citoplasma, formando os corpos basófilos. É nesta organela que transcorre a síntese das várias proteínas plasmáticas produzidas pelo fígado, dentre elas, a albumina e o fibrinogênio (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999).

A célula hepática é muito versátil, pois têm uma função secretora não só exócrina, como também endócrina. A secreção exócrina do fígado é a bile, onde na espécie humana, aproximadamente de 500 a 1000 ml são formados e eliminados para a luz intestinal diariamente. (HAM, 1967).

As várias funções das células hepáticas no metabolismo ocorrem graças a um grande abastecimento de ribossomos, mitocôndrias e enzimas. Com uma medida individual de 20 a 30 microns em sua maior dimensão, o hepatócito têm aproximadamente 1000-1500 enzimas diferentes, 2000-3000 mitocôndrias e 5-6 milhões de ribossomos (principalmente polirribossomos) (KOLB, 1984).

O fígado têm como unidade funcional o lóbulo hepático (ARGENZIO, 1996; GUYTON, 1997), cuja quantidade varia de espécie para espécie. O termo

lóbulo significa pequeno lobo, expressão esta que foi empregada inicialmente em anatomia para a descrição de qualquer porção ou estrutura arredondada e saliente. Quando usado em relação aos órgãos glandulares, o termo lobo passou a ser empregado para designar qualquer porção que se projeta da massa central de um órgão, ou é separada de outras partes do órgão por fissuras, septos ou depressões. Sendo assim, a expressão lóbulo foi inicialmente usada para designar pequenas divisões no lobo por meio de fissuras, septos ou depressões menores. Posteriormente, com o advento do microscópio, os lóbulos de tecido glandular, não eram áreas somente delimitadas por partições de tecido conjuntivo, mas também nas quais, um grupo de unidades secretoras adjacentes eram drenadas por um canal comum ou por um sistema de canais. Este fato leva à uma mais refinada definição para o termo lóbulo, que passa a ser descrito como: pequena divisão de um órgão, constituída de grupos de unidades secretoras intimamente adjacentes, que são drenadas por um canal comum ou por um sistema de canais (HAM, 1967).

Construído ao redor de uma veia central, que deságua nas veias hepáticas e, a seguir, na veia cava, o lóbulo é constituído principalmente por numerosas placas ou lâminas de células hepáticas, dispostas como se fossem cordões, que irradiam da veia central em direção centrífuga, semelhante aos raios de uma roda. Cada placa hepática apresenta uma espessura geralmente formada por duas células, e entre as células adjacentes, encontram-se pequenos canalículos biliares que deságuam nos dutos biliares dos septos fibrosos que separam os lóbulos hepáticos adjacentes. Nestes septos, existem pequenas vênulas porta que recebem seu sangue principalmente a partir do fluxo venoso do trato gastrintestinal, através das veias porta. Por intermédio dessas vênulas, o sangue flui para os sinusóides

hepáticos, que são os espaços entre os cordões ou lâminas hepáticas e, daí, para a veia central. Nos septos interlobulares, além das vênulas porta, encontram-se também as arteríolas hepáticas, que vão suprir os tecidos do septo com sangue arterial entre os lóbulos adjacentes. Muitas destas arteríolas também deságuam nos sinusóides hepáticos. O fato dos lóbulos hepáticos terem um ramo da veia porta, um ramo da artéria hepática e um duto biliar, faz com que estas três estruturas sejam denominadas de tríade hepática. Além das células hepáticas, os sinusóides hepáticos são revestidos por dois outros tipos de células: as células reticuloendoteliais, antes chamadas de células de *von Kupffer* (ou somente células de Kupffer), que pertencem ao sistema de monócitos-fagócitos e se encontram fixadas à face luminal das células endoteliais e as células de Ito ou células estreladas hepáticas (antigo nome do qual também eram conhecidas as células de Kupffer), que contêm gordura de origem mesênquimal no espaço perissinusoidal e atuam nos processos hepáticos inflamatórios e na fibrose hepática. Abaixo do revestimento endotelial dos sinusóides, entre as células endoteliais e as células hepáticas, existe um estreito espaço tecidual, denominado espaço perissinusoidal (ou espaço de Disse). Milhões desses espaços perissinusoidais são conectados com os vasos linfáticos nos septos interlobulares, que removem o excesso de líquido desses espaços. Devido a ocorrência de grandes poros no endotélio (alguns com o diâmetro de quase 1 micron), as substâncias no plasma, inclusive grande parte das proteínas plasmáticas, movem-se livremente para o espaço perissinusoidal e desse para as células hepáticas (BANKS, 1992; CENTER, 1997; CRAWFORD, 2000; GUYTON, 1997; HAM, 1967; HERDT, 1999; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999; MIYAI, 1994; TORTORA; GRABOWSKI, 2002; REECE, 1996; SPENCE, 1991).

3.2 A FIBROSE (OU FIBROPLASIA) HEPÁTICA

Para um melhor esclarecimento dos fatores que envolvem a fibrose e a cirrose hepática, serão elucidados os componentes envolvidos nestes processos.

3.2.1 As Fibras do Tecido Conjuntivo

São três os principais tipos de fibras que formam o tecido conjuntivo: as fibras elásticas, as fibras reticulares e as fibras colágenas.

Sendo abundantes na pele, nas paredes dos vasos sanguíneos e no tecido pulmonar, as fibras elásticas apresentam-se longas, ramificadas, filiformes e com diâmetro menor que as fibras colágenas.. Com frequência formam redes entrelaçadas. Têm como principal proteína a elastina, circundada por uma glicoproteína, chamada fibrina, essencial para a estabilidade da fibra elástica. A elastina confere às fibras a capacidade de retornar ao seu comprimento original logo após ter sido estirada (CHEVILLE, 1994; SPENCE, 1991). Tortora e Grabowski (2002), citam que devido à sua estrutura molecular especial, as fibras elásticas são tão resistentes que podem ser distendidas até 150% do seu comprimento relaxado sem se romper.

As fibras reticulares participam na formação da membrana basal e são consideravelmente mais finas que as fibras colágenas, além de serem curtas e formadas por colágeno, com uma capa de glicoproteína. Através de suas ramificações formam uma rede firme chamada retículo. Produzidas pelos

fibroblastos, as fibras reticulares dão suporte e resistência formando o estroma ou arcabouço de sustentação de muitos órgãos moles como o baço e os linfonodos, além de também fornecerem suporte às paredes dos vasos sanguíneos. Sendo composta principalmente por um tipo de colágeno chamado reticulina, as fibras reticulares têm como destaque a sua propriedade inelástica (SPENCE, 1991; TORTORA; GRABOWSKI, 2002).

As fibras colágenas, às vezes referidas como fibras brancas, são o tipo de fibras que se encontram em maior abundância, representando cerca de 25% da proteína total do corpo. Cada fibra é formada por feixes paralelos de fibrilas muito finas. Sendo encontradas na maioria dos tecidos conjuntivos, as fibras colágenas são fortes e inelásticas (SPENCE, 1991; TORTORA; GRABOWSKI, 2002).

Quimicamente as fibras colágenas consistem a proteína colágeno, que é o arcabouço extracelular de todos os organismos multicelulares. A importância desta proteína é tamanha, que sem ela, o ser humano seria reduzido a um conglomerado de células interconectadas por alguns neurônios (COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2000). Os colágenos são formados por uma hélice tripla de três cadeias polipeptídicas α , com seqüências repetidas gly-x-y (PROCKOP; KIVIRIKKO, 1995). Aproximadamente 30 cadeias α formam pelo menos 14 tipos distintos de colágeno dos quais os principais são os tipos: I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX (COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2000). Estes mesmos autores citam os tipos I, II e III como mais abundantes, que são os colágenos intersticiais ou fibrilares, enquanto que os tipos IV, V e VI são colágenos não-fibrilares ou amorfos, que são encontrados no tecido intersticial e nas membranas basais (COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2000).

3.2.2 A Inflamação Crônica na Fibroplasia Hepática

Visto que a inflamação crônica atua como coadjuvante no processo da fibroplasia, se faz necessário comentar à seu respeito.

Sendo um produto comum de seqüela nas várias formas de injúria aos tecidos do fígado, a fibroplasia hepática é encontrada principalmente em inflamações resultantes de doenças hepáticas crônicas, cuja evolução é um componente essencial no desenvolvimento da cirrose (CRAWFORD, 2000; FRIEDMAN, 1999; LEE; YOON; MOON, 2004; PINES et al., 1997; YASUDA et al., 1999). Embora a necrose de hepática possa parecer no início da inflamação, o inverso também é fato. O ataque a células hepáticas viáveis por células T sensibilizadas é dito como uma causa comum na lesão hepática. A inflamação pode ser limitada ao local de entrada dos leucócitos, que são os tratos portais, ou expandir-se ao parênquima (CRAWFORD, 2000).

Uma das características fundamentais na inflamação é a destruição tecidual, com lesão das células parenquimatosas e do arcabouço do estroma. Em consequência, o reparo não pode ser feito somente através da regeneração das células parenquimatosas, o que acarreta em tentativas de reparo da lesão tecidual através da substituição das células parenquimatosas não-regeneradas por tecido conjuntivo, o qual, com o decorrer do tempo, produz fibrose e formação de cicatriz. Esse mecanismo é constituído dos seguintes componentes: formação de novos vasos sangüíneos (ou angiogênese), migração e proliferação dos fibroblastos, deposição da MEC e maturação com organização do tecido fibroso, também chamada de remodelamento (COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2000). Estes mesmos

autores postulam que o processo de reparo começa logo no início da inflamação (às vezes em apenas 24 horas após a lesão), onde se não houver resolução os fibroblastos e as células endoteliais vasculares começam a se proliferar com o objetivo de formar (em 3 a 5 dias) um tecido especializado conhecido com tecido de granulação.

3.2.2.1 A Importância das Células Hepáticas Estreladas

Lee et al. (2003), afirmam que o conhecimento do mecanismo de ativação das células hepáticas estreladas (HSC) é essencial para o desenvolvimento de terapias efetivas contra a fibrose hepática.

Localizadas no espaço perissinusoidal (ou espaço de Disse) e tendo várias sinonímias (lipócitos, células de Ito, células armazenadoras de gorduras e células perissinusoidais) (TADA et al., 2001a; YASUDA et al., 1999), as HSC além de exercerem um importante papel no armazenamento e metabolismo da vitamina A e lipídios, são consideradas as células alvo para o estímulo inflamatório na injúria hepática. As HSC têm sido identificadas como a fonte primária do acúmulo dos componentes da MEC na fibrose hepática (CRAWFORD, 2000; FRIEDMAN, 1999), visto que transformam-se em miofibroblastos produtores de colágeno quando ocorre inflamação e fibrose hepática (GAÇA; ZHOU; BENYON, 2002; LEE; YOON; MOON, 2004). A aquisição de miofibras pelas HSC e sua transformação em células produtoras de colágeno também ocasiona um aumento da resistência vascular dentro do parênquima hepático, devido à contração tônica desses “miofibroblastos”, causa a constrição dos canais vasculares sinusoidais (CRAWFORD, 2000). Embora alguns autores asseverem a transformação das HSC em células que apenas se

assemelhem à miofibroblastos, não confirmando que a metamorfose dessas células seja em miofibroblastos verdadeiros (CRAWFORD, 2000); preferindo chama-las apenas de células produtoras de colágeno.

Além da participação de células inflamatórias, diversos fatores são responsáveis pela ativação das HSC, entre eles: fator de crescimento derivado das plaquetas, fator de crescimento epidermal, fator de crescimento de hepatócitos, fator de crescimento insulina-semelhante, fator de crescimento transformante β (TGF- β , que consiste numa importante citocina na regulação da produção e acúmulo da MEC), interleucinas (IL-1, IL-6, IL-10, TNF) e outros peptídeos, quimiocinas (como a interleucina-8), substâncias vasoativas (trombina, arginina-vasopressina e angiotensina II) (ALCOLADO; ARTHUR; IREDALE, 1997; BATALLER; BRENNER, 2001; LI; FRIEDMAN, 1999; ROCKEY, 2000; TOSTES, 2003; ZARNEGAR; MICHALOPOULOS, 1995), acúmulo anormal de ferro, esteatose, hepatites virais, maciça necrose hepática e também em outras manifestações patológicas como: mucopolissacaridose, doenças hematológicas de caráter maligno, doenças biliares, leishmaniose, rejeição em aloenxertos, a abuso no uso de drogas como overdose de paracetamol (FRIEDMAN, 1999).

Lee, Yoon e Moon, (2004), relatam que um flavonóide (substância achada largamente sob a forma de um pigmento nos vegetais superiores como algumas frutas e nos tomates) chamado *Naringenin*, têm um efeito hepatoprotetor e antifibrótico contra injúrias hepáticas experimentalmente induzidas em ratos tratados com DMN, por exercer um papel de proteção contra a ativação das HSC.

KANG Lu-Ping et al. (2001), citam que *Genistein* e *Queretin*, dois componentes de alta atividade anti-oxidante, que são empregados em medicina chinesa no tratamento de diversas doenças, como artériosclerose, câncer e moléstias hepáticas; empregados experimentalmente em HSC de ratos, inibem a proliferação das HSC e a síntese de colágeno intracelular. Estes resultados foram associados com a diminuição da expressão do pró-colágeno tipo I, também relatados pelos referidos autores.

3.2.3 O Mecanismo da Fibrose Hepática

A fibrose hepática consiste de uma resposta comum à injúrias hepáticas de diversas origens; a saber: virais, metabólicas e tóxicas. Caracterizada pelo aumento da produção de componentes da MEC protéica, particularmente de colágenos, que são depositados nos espaços perissinusoidais (CHEVILLE, 1994; FRIEDMAN, 1999; CRAWFORD, 2000; GRESSNER; BACHEM, 1990; LEE; YOON; MOON, 2004; TOSTES, 2003). O depósito continuado de colágeno nos espaços perissinusoidais dentro do parênquima preservado é acompanhado de perda das fenestrações nas células endoteliais sinusoidais. No processo, o espaço sinusoidal passa a assemelhar-se a um capilar ou invés de um canal onde eram efetuadas as trocas de solutos entre os hepatócitos e o plasma. A secreção hepatocelular de proteínas, como a albumina, os fatores de coagulação e as lipoproteínas passam a ficar comprometidas assim como o transporte de sangue até os hepatócitos. (CRAWFORD, 2000).

Num fígado considerado normal, encontram-se todos os tipos de colágeno (I,III,IV,V e VI), mas, durante o processo de fibroplasia ocorre um aumento destes colágenos (SCHUPPAN; RUHLMANN; HAHN, 1985), dos quais o tipo I e o tipo III, são colágenos intersticiais e sua ocorrência é de 80% a 95% de todo o colágeno hepático (ROJKIND; PEREZ-TAMAYO, 1983). Embora a liberação de grande parte do colágeno seja creditada aos fibroblastos intersticiais, os hepatócitos também podem sintetizar e liberar colágeno. O colágeno do tipo IV (para as membranas basais) é sintetizado no início da injúria hepática, enquanto os tipos I e III são produzidos nas fases posteriores da lesão (CHEVILLE, 1994). Contudo esta posição não é compartilhada por alguns autores como Center (1997), que cita haver o predomínio de colágeno tipo I na fase inicial da fibrose hepática, enquanto que o predomínio do tipo III ocorre na fase avançada do processo.

Shiba et. al (1998), citam que após três dias da indução experimental de fibrose hepática em ratos Wistar, houve uma maior intensidade da imunoreação de colágeno tipo I em áreas necróticas perto das veias centrais do fígado, ao ponto que, decorridos mais 6 dias foi constatado que a imunodeposição do colágeno tipo III estava mais evidente; porém, no 14º dia do experimento foi constatado que tanto o colágeno tipo I quanto o tipo III estavam equiparados, porém mais altos que no período inicial do experimento. A expressão do gene referente aos níveis de procolágeno (um precursor da molécula de colágeno, sintetizado no fibroblasto e clivado para formar o colágeno extracelularmente) tipo I e tipo III, também se mostrou mais evidente no 14º dia do experimento.

O desenvolvimento da fibrose hepática pode ser associado com um número de alterações bioquímicas que conduzem à anormalidades estruturais do metabolismo hepático. Algumas dessas alterações são caracterizadas por mudanças nos níveis de vários produtos metabólicos, que são liberados no sangue e posteriormente excretados pela urina. Importantes alterações nos parâmetros metabólicos e anormalidades bioquímicas ocorrem durante a indução de danos hepáticos experimentalmente induzidos. Estas alterações são compatíveis com a deterioração das funções hepáticas durante a patogênese da fibrose hepática, que está relacionada ao fator de crescimento do tecido de conexão (CTGF) (GEORGE; CHANDRAKASAN, 1996, 2000). Outros autores também associam o CTGF ao mecanismo de fibrose hepática (GEORGE; CHANDRAKASAN, 1996, 2000; PARADIS et al., 1999; RACHFAL; BRIGSTOCK, 2003).

O CTGF é conceituado com uma proteína multifuncional produzida por vários tipos de células e age pelas vias autócrina e parócrina para regular várias funções celulares incluindo: crescimento, proliferação, apoptoses, adesão, migração, produção da MEC e diferenciação (LAU; LAM, 1999), além de desempenhar diversos processos biológicos como angiogênese, condrogênese, embriogênese, implantação, desenvolvimento, função biológica, tumorigênese e fibrose (RACHFAL; BRIGSTOCK, 2003). Alguns estudos demonstraram que o CTGF pode ser um dos efetores que diminuem o TGF- β . Isto tem feito do CTGF um componente bem aceito no processo da fibrogênese (PARADIS et al., 1999). O fato do CTGF ser produzido pelas HSC (RACHFAL; BRIGSTOCK, 2003), também ressalta a importância de ambos, do CTGF e das HSC nos trâmites que elucidam a fibrose hepática.

Várias substâncias e mecanismos têm sido mencionados como bloqueadores ou componentes que influenciam positivamente no bloqueio da fibrose hepática, entre eles: a *pirfenidone* (um agente antifibrótico) (TADA et al.; 2001b), o estradiol (YASUDA; SHIMIZU; SHIBA; ITO, 1999), o alcalóide *halofuginone* (PINES et al., 1997), bloqueio do TFG- β (ZHE QI et al., 1999) e inibição do TFG- β (NAKURA et al., 2000).

Muitas descobertas e estudos a respeito da fibrose hepática, bem como dos fatores que a envolve foram realizados, mas alguns de seus mecanismos, como o que esclarece o aumento do colágeno no fígado durante a patologia, ainda não foram totalmente esclarecidos (SHIBA et al., 1998), porém o fator mais importante na fibrose hepática é a sua irreversibilidade (CRAWFORD, 2000) e o seu aspecto mais preocupante consiste no fato de que o momento exato desta irreversibilidade é desconhecido tanto em termos histológicos, como nas mudanças específicas na composição da matrix e de seu conteúdo (FRIEDMAN, 1999).

3.2.4 Fibrose e Cirrose

A cirrose hepática encontrar-se entre as 10 maiores causas de morte no mundo ocidental (CRAWFORD, 2000). Em cães, a ocorrência da cirrose é atribuída a 15% das moléstias hepáticas desenvolvidas nestes animais (TWEDT, 1985). Em cavalos e suínos esta patologia também é relatada, porém sua maior incidência ainda acomete a espécie canina (SANTOS, 1986). Afirmações como estas, aliadas ao fato da fibrose hepática advir de um processo fibrótico (CRAWFORD, 2000;

FRIEDMAN, 1999; LEE; YOON; MOON, 2004; PARADIS et al., 1999; PINES et al., 1997; YASUDA et al., 1999), conferem à cirrose hepática um espaço neste trabalho.

O termo cirrose deriva do grego “kirrhós”, que significa cor amarela ou alaranjada. Este termo foi erroneamente empregado, pois nem todos os tipos de fígados cirróticos apresentam esta cor (BOGLIOLO, 1981; ROBBINS, 1965).

A progressão de uma lesão hepática e da fibrose fazem com que os hepatócitos remanescentes sejam estimulados a regenerar-se. Como resultado deste processo regenerativo os hepatócitos acabam por proliferar-se como nódulos esféricos dentro dos limites dos septos fibrosos; isto aliado ao fato do estreitamento do espaço sinusoidal e do conseqüente comprometimento do transporte de sangue e substâncias aos hepatócitos bem como do fluxo biliar intra-hepático, carreta na desorganização generalizada da arquitetura hepática (BOGLIOLO, 1981; CHEVILLE, 1994; CRAWFORD, 2000; GOODMAN; ISHAK, 1999). Como a função é altamente dependente da estrutura organizacional do tecido, alterações na estrutura conseqüentemente levarão a alterações na função e vice-versa (ROJKIND, 1994), este fato, coligado as alterações já mencionadas, levam o fígado a um estágio irreversível, mesmo que a sua causa subjacente seja eliminada (CHEVILLE, 1994; JOHNSON, 1997).

Uma vez que a arquitetura hepática original sofre mudanças é correto afirmar que uma nova forma é originada. Em detrimento a estas mudanças, é possível observar degeneração dos hepatócitos, a deposição dos colágenos tipos I e III no lóbulo, criando tratos septais delicados ou espessos (no fígado normal os colágenos intersticiais tipos I e III concentram-se nos tratos portais e ao redor das

veias centrais, com feixes eventuais no espaço perissinusoidal) e obliteração dos canais biliares. A etapa final deste mecanismo é caracterizada por insuficiência hepáticas progressiva, complicação relacionada à hipertensão portal ou o desenvolvimento de carcinoma hepatocelular (CRAWFORD, 2000). Nas vítimas acometidas pela cirrose hepática, pode-se observar alterações como: estado de coma (resultante do progresso da insuficiência hepática), icterícia e ascite (JOHNSON, 1997; BOGLIOLO, 1981). A intensidade e a ocorrência de outros sintomas e sinais clínicos variam muito, uma vez que existem vários tipos de cirrose e várias etiologias atribuídas a esta moléstia (ROBBINS, 1965), porém este autor cita que um aumento da consistência do fígado é o único fator comuns a todas as formas de cirrose.

Como é considerada uma conseqüência da fibrose hepática, basicamente, todos os fatores que podem ocasionar os mecanismos de uma fibrose, se perpetuantes, levaram o fígado ao quadro cirrótico, porém alguns fatores como alcoolismo, hepatite crônica, doença biliar e a sobrecarga de ferro merecem destaque (CRAWFORD, 2000).

3.3 A DIMETILNITROSAMINA (DMN)

Tendo sua hepatotoxicidade reportada pela primeira vez por Barnes and Magee (1954), pela investigação de um acidente industrial, a DMN é considerada uma potente droga hepatotóxica (GEORGE et al., 2001), carcinogênica e mutagênica (HAGGERTY; HOLSAPPLE, 1990; LEE; YOON; MOON, 2004). Sua

toxicidade é mediada pela reação de seus metabólitos e não pela matrix de seus componentes. Sendo que estes metabólitos são liberados no sangue e excretados pela urina (GEORGE; CHANDRAKASAN, 2000), e têm uma meia-vida menor que 10 minutos em roedores e cerca de 20 minutos em primatas não-humanos (ANDERSON et al., 1992). A DMN têm como alvo primário o fígado, pois este contém as enzimas necessárias para a ativação dos seus metabólitos. O seu metabolismo no fígado se dá pela enzima microssômica citocromo P-450IIE1 (YANG et al., 1985, 1990; YOO et al., 1988). Além de seu efeito tóxico sobre o tecido hepático, a DMN têm sido usada em muitos modelos devido a sua capacidade de provocar lesões em animais simulando moléstias que ocorrem no organismo de seres humanos (FRIEDMAN, 1993; JEZEQUEL et al., 1987; YASUDA et al., 1999), como por exemplo, a reprodução de fibrose alcoólica (JENKINS et al. 1985). O modelo da indução de danos hepáticos pela DMN também têm sido bem usado para testar os efeitos de agentes farmacológicos na progressão de injúrias hepáticas a no desenvolvimento de fibrose (ALA-KOKKO et al., 1989).

3.3.1 Dimetilnitrosamina e Fibrose

Optamos por usar a DMN devido sua grande eficácia em induzir injurias hepáticas, principalmente a fibrose, embora os fatores patobioquímicos e citofisiológicos das alterações provocadas pela DMN na fibrose hepática ainda não tenham sido esclarecidos (GEORGE; CHANDRAKASAN, 2000).

Hashimoto et al. (1989), citam que doses pequenas, como 20 mg/kg causam maciça necrose hepática e morte em várias espécies. Exposições repetidas, ainda que em baixas doses de DMN, causam injúrias hepáticas subagudas e crônicas com variados graus de necrose, fibrose e regeneração nodular (MAGEE; BARNES, 1967).

Tada et al. (2001b), obtiveram fibrose hepática em ratos, através da administração intraperitoneal de DMN nos primeiros três dias de quatro semanas consecutivas, usando uma dose de 10 mg/kg.

Pereira (2003), administrou 1 ml de solução aquosa de DMN, na concentração de 200 mg/l (valor este que corresponde à dose de 10 mg/kg), em ratas wistar, através de sonda esofagogástrica, duas vezes por semana (em dias consecutivos), num período de cinco semanas. Após cinco semanas da última administração de DMN, este autor constatou fibrose hepática pela realização de biopsias no material obtido, onde foi observado a presença de nódulos regenerativos difusos e irregularmente disseminados, com formação de pontes provenientes de tecido conjuntivo fibroso circundando esses nódulos, assim como fibrose periportal acentuada, ocorrência de infiltrado inflamatório multifocal no espaço porta, presença de células ovais, proliferação de ductos biliares e megalocitose.

3.4 AS CONEXINAS 32

Antes de um aprofundamento no assunto pertinente às conexinas 32 (Cx32), serão descritas as estruturas envolvidas com a sua anatomia microscópica e molecular.

3.4.1 As Junções Tipo Gap

A maioria das células epiteliais e algumas células musculares e nervosas permanecem unidas através de unidades funcionais denominadas junções celulares, que consistem de pontos de contato entre as membranas plasmáticas das células teciduais (TORTORA; GRABOWSKI, 2002). As comunicações intercelulares via junções comunicantes (*gap junctions intercelular communication* - GJIC), também conhecidas como junções abertas, junções comunicantes e junções do tipo *gap* ou *nexus*, são as junções celulares mais encontradas na maioria dos tecidos animais em quase todas as espécies (DAGLI, 2000; GUERRA, 2003; SILVA, 2003) e recebem esta denominação porque as camadas de membranas plasmáticas adjacentes convergem, deixando, entre elas, um pequeno espaço intercelular. Este espaço consiste de canais transmembranosos que são dispostos em pares de hemicanais hexagonais chamados *conexons*, que podem ser homoméricos (formados por apenas um tipo protéico ou de Cx) ou heteroméricos (constituídos por mais de um tipo protéico ou de Cx), os quais são constituídos por seis subunidades proteicas denominadas conexinas (Cxs), cuja localização se dá ao redor de um poro

central (BOYER; NATHANSON, 1999; GUERRA, 2003; KUMAR; GILULA, 1996; NAVES; MORENO, 2000; TORTORA; GRABOWSKI, 2002).

Através das GJIC, se difundem pequenas moléculas citossômicas, (moléculas que pertencem ao líquido citoplasmático) de 1 Kda (ou 1000 Dalton) (SHIBATA et al.; 2001), e íons de uma célula para a seguinte. As GJIC permitem a comunicação de células, em um tecido, o que lhes confere uma importância fundamental como veiculadores de fatores para a manutenção da homeostase dos tecidos e controle da diferenciação e proliferação celulares (GUERRA, 2003; NAVES; MORENO, 2000; TORTORA; GRABOWSKI, 2002). As GJIC também são responsáveis pela passagem rápida dos impulsos nervosos e musculares de célula a célula, processo que é crucial para a operação normal de algumas partes do sistema nervoso e para a contração muscular, no coração e no trato gastrointestinal. No embrião em desenvolvimento, alguns dos sinais químicos e elétricos, reguladores do crescimento e da diferenciação celular, passam por meio das GJIC, que também são essenciais na nutrição de tecidos avascularizados como a córnea e o cristalino do olho (TORTORA; GRABOWSKI, 2002; YAMASAKI, 1990).

As GJIC têm ocupado uma importante posição no estudo de manifestações patológicas como a carcinogênese.

Yamasaki (1990) observou que quase todos os cânceres sólidos manifestam uma anormal capacidade de comunicação intercelular.

Cheville (1994), elucida que as GJIC geralmente se desfazem em neoplasmas, onde, a ausência desta comunicação intercelular tem efeitos

significativos no crescimento neoplásico, visto que quando as GJIC são perdidas, o comportamento do tecido como uma unidade homogênea apresenta-se modificado. Este mesmo autor cita que o fato de algumas células neoplásicas apresentarem poucas GJIC, a incapacidade de enviar e receber moléculas sinalizadoras se faz presente, o que pode levar ao crescimento celular descontrolado mesmo que algumas células cancerosas possuam GJIC, pois estas estruturas podem apresentar defeitos internos na sua capacidade de responder normalmente às moléculas sinalizadoras transferidas.

Uma mudança seqüencial das GJIC no parênquima hepático foi relatada como sendo substancial durante os múltiplos estágios da hepatocarcinogênese provocada em ratos (KRUTOVSKIKH; OYAMADA; YAMASAKI, 1991).

Afirmativas como estas, retratam a necessidade do esclarecimento dos mecanismos que envolvem as GJIC, uma vez que estes ainda não foram totalmente esclarecidos (GOODENOUGH; GOLIGER,; PAUL, 1996).

3.4.2 As Conexinas

O nome conexina (Cx) corresponde a um termo usado para generalizar uma família de proteínas, constituída de pelo menos treze membros, que já foram caracterizados em diversos tecidos de roedores e com vários genes homólogos identificados em vertebrados de diversas espécies (BRUZZONE; WHITE; PAUL, 1996). Em contra partida, Goodenough, Goliger e Paul (1996), citam a existência de

16 tipos de Cxs. e Shibata et al. (2001), citam que a família das conexinas em mamíferos apresenta no mínimo dezoito membros. Os membros pertencentes à família das Cxs foram alvo de estudos referentes ao mRNA que as codificam (GOODENOUGH; GOLIGER; PAUL, 1996), e são distinguidos através de seus sufixos numéricos, que designam a massa molecular estimada em KDa (kilodaltons) (BRUZZONE; WHITE; PAUL, 1996) e que de uma forma geral têm sua variação entre 26 a 57 Kda. Eis os representantes desta família: Cx26, Cx30, Cx30,3, Cx31, Cx31,1, Cx32, Cx33, Cx36, Cx37, Cx40, Cx43, Cx45, Cx46, Cx46,6, Cx49, Cx50, Cx56 e Cx57. Embora suas expressões sejam específicas não somente em termos de tecido e tipos celulares, mas também em termos funcionais e em estados de desenvolvimento (SHIBATA et al., 2001), a maioria delas têm expressão presente em mais de um tipo de tecido (NAVES; MORENO, 2000; YAMASAKI; NAUS, 1996). Algumas destas expressões multitecduais citadas por Yamasaki e Naus (1996) são exemplificadas nos seguintes órgãos:

- Baço: Cx26, Cx32, Cx37;
- Coração: Cx37, Cx40, Cx43, Cx45, Cx50;
- Cérebro: Cx26, Cx32, Cx37, Cx43, Cx45;
- Estômago: Cx26, Cx32, Cx37, Cx43,
- Fígado: Cx26, Cx32, Cx37;
- Pulmões: Cx26, Cx32, Cx37, Cx40, Cx43, Cx45;
- Rins: Cx26, Cx32, Cx37, Cx40, Cx43, Cx45, Cx46.

Estudos em diferentes tecidos mostram a existência de uma família multigênica de Cxs na qual suas propriedades físico-químicas específicas (referentes a tamanho, carga ou conformação molecular) determinam uma grande

diversidade de composição dos canais, gerando diversas características de condutibilidade, permeabilidade e regulação, que têm como consequência diversas respostas aos sinais de transdução intercelulares (BRUZZONE; WHITE; PAUL, 1996; KUMAR; GILULA, 1996).

As Cxs possuem similaridade estrutural entre si que pode variar de 35 a 65% (NAVES; MORENO, 2000).

Resultados otimistas alcançados nos estudos das GJIC, bem como a sua associação à descobertas de doenças co-relacionadas a mutações genéticas em genes que codificam para as Cxs (PAUL, 1995), apontam um potencial considerável das GJIC na prevenção e controle de moléstias (KUMAR; GILULA, 1996).

3.4.3 As Conexinas 32 e seu Relacionamento com o Fígado

Em algumas vezes se fará necessário a menção da Cx26 ainda que este tópico aborde a Cx32. Isto se dá pelo fato da Cx26 também estar localizada no fígado e apresentar uma homologia de 65% em relação a Cx32 (NAVES; MORENO, 2000), motivos pelos quais também levam vários autores a mencionar estas duas proteínas quando abordam as GJIC hepáticas.

A Cx32 foi a primeira Cx a ser clonada (KUMAR; GILULA, 1996). Considera a mais abundante das GJIC, a Cx32 aparece no fígado juntamente com a Cx26, porém é mais abundante que a segunda onde esta relação é estabelecida na proporção de 1:10 respectivamente, em fígados de ratos (NICHOLSON et al., 1987).

Jun Yang, Ichikawa e Tsuchiya (2003), citam que as GJIC do fígado além de contarem com a presença das Cx26 e Cx32, também têm a Cx43 na estrutura hepática. Estes mesmos autores citam que a localização destas proteínas no fígado, depende do tipo de célula e da posição desta célula no lóbulo hepático. Por exemplo, *in vivo*, a Cx32 e a Cx26 são expressas nos hepatócitos parenquimatosos. Deve-se considerar também que a distribuição de algumas Cxs é diferente dentro dos próprios lóbulos hepáticos; enquanto que as Cx26 são localizadas preferencialmente na zona periportal dos lóbulos, as Cx32 situam-se em maior número nos hepatócitos e por todos os lóbulos hepáticos (JUN YANG; ICHIKAWA; TSUCHIYA, 2003; ROENBERG; SPRAY; REID, 1992; TRAUB et al., 1989).

Vários estudos têm destacado e importância das Cx32 no fígado e o seu relacionamento com as anormalidades hepáticas sobretudo em processos patológicos como a hepatocarcinogênese.

Sakamoto et al. (1992), relatam que houve uma diminuição na expressão da Cx32 e da Cx26, em ratos com carcinomas hepatocelulares. Estes autores comentam que as expressões das Cx32 e da Cx26 são diferentemente reguladas durante a hepatocarcinogênese, onde o decréscimo da expressão na Cx32 ocorre antes quando comparada a expressão da Cx26, que ocorre mais tarde em associação com a promoção e a progressão da carcinogênese. Resultados semelhantes foram obtidos por Xiang-Dong Ma et al. (2002), elucidando que a o mRNA das Cx32 e suas proteínas foram altamente expressadas em tecidos hepáticos normais, mas teve um decréscimo significativo em tecidos hepáticos carcinomatosos. Os mesmos resultados foram obtidos com a Cx43. Temme et al.

(1997), também evidenciaram que a Cx32, juntamente com a Cx43, são expressadas em um alto grau em células hepáticas normais mas em um baixo nível em carcinomas hepatocelulares. Moennikes et al. (1999), demonstraram que quando o gene da Cx32 é funcionalmente deletado, aumenta os efeitos hepatocarcinogênicos em ratos. Estes mesmos autores comentam que se este referido gene apresentar problemas, pode ser um futuro desencadeador de câncer hepático em ratos com alta predisposição para hepatocarcinogêneses.

Outros estudos também elucidam a importância das Cx32 no contexto hepático.

Yamaoka et al. (2000), relatam que a expressão da Cx32 diminui significativamente em doenças virais hepáticas e cirroses crônicas, quando comparada com um fígado normal. Estes autores elucidam ainda que se a injúria progredir, o decréscimo da expressão referente a Cx32 tende a diminuir ainda mais.

Após a hepatectomia parcial em ratos, Tsuda et al. (1995), citam através de estudo imunohistoquímico que os pontos representando as Cx32 diminuem rapidamente. Tais pontos são a apresentação visual destas proteínas visualizadas através da técnica de imunohistoquímica.

Kojima et al. (1997), evidenciaram em ratos, diferenças na mudança da expressão e função da Cx32 em hepatócitos durante a estimulação e a re-estimulação da síntese de DNA. Os mesmos resultados foram obtidos usando a Cx26.

Nakata et al. (1996), citam através de evidências imunohistoquímicas, que a Cx32 é transitoriamente diminuída em injúrias hepáticas agudas após uma única administração de agentes hepatotóxicos em ratos. Contudo, os referidos autores mencionam que o mRNA das referidas Cx32 não apresentava-se diminuído. Diante desses resultados, os autores concluíram que embora os níveis de mRNA das Cx32 fossem sustentados, o decréscimo prolongado das Cx32 contidas nestes fígados pode ter ocorrido, devido uma mudança pós-transcricional que causa um decréscimo na síntese protéica ou um transtorno nos controles pós-translacionais.

Muitas pesquisas sobre Cx32 estão em andamento, mas a ciência ainda deverá trilhar um longo caminho para a obtenção de respostas como a expressão das referidas Cxs na progressão de doenças hepáticas crônicas; questão esta que ainda não foi totalmente respondida (Yamaoka et al. 2000).

4 MATERIAL & MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

O material e os métodos utilizados neste trabalho são descritos abaixo.

4.1 ANIMAIS

Foram utilizadas 30 ratas albinas (Wistar), pesando aproximadamente 200g. Os animais foram obtidos do biotério do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, identificados e distribuídos em 2 lotes de 15 animais. Os animais foram acondicionados em gaiolas de polipropileno com uma camada de maravalha de aproximadamente 3 cm e em sala com temperatura controlada por meio de aparelho de ar condicionado ($22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) e fotoperíodo de claro-escuro de 12 horas (luzes acessas as 7:00 horas). Água e ração foram fornecidos *ad libitum* durante todo o procedimento experimental.

4.2 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram divididos em dois lotes:

LOTE Nº 1

Neste grupo 15 animais foram experimentalmente induzidos à fibrose hepática pela administração de 10 mg/Kg de DMN dissolvida em água destilada, em

uma solução de 200 mg/l correspondendo à aproximadamente 1 ml de solução aquosa de DMN por animal. O produto foi administrado com sonda esofagogástrica (técnica de gavagem) com cateter de polietileno, duas vezes por semana em dias consecutivos (2^{as} e 3^{as} feiras), durante 5 semanas. Após este período, os animais ficaram mais cinco semanas em observação e em seguida foram sacrificados.

LOTE Nº 2

Este grupo controle, consta de 15 animais que receberam água e alimento à vontade. Tais animais foram sacrificados junto com os animais que receberam DMN.

4.3 PROCESSAMENTO DO FÍGADO PARA HISTOLOGIA

As amostras coletadas foram dissecadas de maneira a nunca ultrapassar o diâmetro de 5 mm para microscopia de luz. Para tanto, utilizou-se Microscópio Nikon Eclipse E800.

4.4 FIXAÇÃO E INCLUSÃO DO MATERIAL

Para a microscopia de luz, o material foi incluído em parafina (JUNQUEIRA, 1995), onde foram obtidos cortes histológicos de 4 a 5 micrômetros de espessura. Este material foi fixado em líquido metacarn (60% metanol, 30% clorofórmio e 10% de ácido acético glacial). Amostras de cada grupo experimental

também foram colhidas para o processamento por congelamento, no qual, o material coletado foi envolvido por papel alumínio e em seguida mergulhado ao nitrogênio, para posteriormente ser congelado à uma temperatura de $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Após 24 horas, deste material foram obtidos cortes de 7 micrômetros de espessura feitos em micrótomo para criocorte à uma temperatura de $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$. Após a fixação, que também foi realizada em metacarn, este material foi destinado à realização das reações de imunohistoquímicas, visando a evidenciação Cx32.

4.5 COLORAÇÕES PARA MICROSCOPIA DE LUZ

Para a verificação dos aspectos morfológicos do fígado, foram utilizados a Hematoxilina Eosina (BANCROFT ; STEVENS, 1982).

4.6 IMUNO-HISTOQUÍMICA

Foram empregados anticorpos policlonais primários de coelho anti-conexina 32, utilizados em concentrações 1:500 e anticorpos policlonais secundários cabra, anti-coelho biotilado nas concentrações de 1:300, utilizados em cortes congelados.

Este material foi revelado pelo kit de amplificação pela fluoresceína ou TSA-Renaissance kit (NEN Life Science Inc®) e contrastado por uma solução de Iodeto de Propídio (Sigma®) na concentração de $10\text{ }\mu\text{g/ml}$, com os núcleos

fluorescendo em vermelho. As lâminas foram analisadas ao microscópio de fluorescência com filtros adequados.

4.7 WESTERN BLOT

Para este procedimento, 40 mg de tecido hepático, previamente acondicionado a -80°C foi submetido à lise celular por meio de homogeneização em Tissue Teator^{tu} na velocidade máxima. Todas as etapas foram realizadas com as amostras mantidas à 4°C . A homogeneização foi realizada em Tris-HCl 1 M, pH 6,8, contendo SDS 10% e glicerol 10% e, então, centrifugado à 15.000 rpm por 1 minuto. O sobrenadante foi retirado e acrescido de Tris-HCl 1 M, pH 6,8; contendo SDS 10%; glicerol 10%; DTT 1M; e Fenilmetilsulfonil (PMSF) 10 mM, centrifugando a amostra à 13000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi retirado e conservado à -80°C até análise. A concentração de proteína total foi estimada com o reagente BioRad Protein Assay (Bio-Rad Labs., Hercules, CA). Na eletroforese utilizou-se 150 μg de proteína acrescida de azul de bromofenol, separada em SDS-PAGE a 10%. A eletroforese foi realizada a 40V por um período de 5 horas. Como marcador de peso molecular utilizou-se 10 μl do Kaleidoscope Padrão Pré-corado (Bio-Rad Labs). Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas a 48 mA por 50 minutos para uma membrana de PDVF 8,0 x 5,0 cm^2 (Tans-Blot SD cell; Bio-Rad Labs), previamente umedecida, em condições semi-seca. Posteriormente, a membrana foi lavada 3 vezes, durante 15 minutos, em TTBS 0,2% contendo Tween 20. A membrana foi incubada em leite desnatado (skin milk) 5%, diluído em TTBS por 2 horas sob leve agitação a temperatura ambiente. Os excessos de membrana foram

cortados, descartados e a membrana incubada por 2 horas, à temperatura ambiente, numa solução de anticorpo primário, diluído em TTBS 0,2% contendo Skin Milk 2%. Utilizou-se o anticorpo policlonal anti-rabbit diluído 1:100 (conexina 32) e 1:500 (conexina 32). A membrana foi lavada em TTBS e o excesso de tampão removido em papel de filtro *Watman*. Procedeu-se a incubação com o anticorpo secundário anti-mouse conjugado à peroxidase (1:1000) por 2 horas nas mesmas condições acima citadas. A revelação foi efetuada mergulhando-se a membrana por alguns segundos em uma solução contendo diaminobenzidina (DAB)-níquel acrescido de 20 µl de peróxido de hidrogênio a 30%. O bloqueio da reação deu-se após o mergulho da membrana em água MiliQ®, a seguir foi obtida a imagem digital da membrana no scanner Genios Color Page HR 6X.

4.8 REAL TIME POLYMERASE CHAIN REACTION (RT-PCR)

As etapas da RT-PCR são descritas à seguir.

4.8.1 Extração RNA Total pelo Método do Trizol

Os tecidos foram removidos dos animais e imediatamente lavados em PBS pH 7,4 feito com água tratada com dietilpirocarbonato a 0,1% (DEPC). A seguir, estes foram mantidos à 80°C até o momento da análise. Cerca de 40 mg de tecido hepático foram pesados, acrescentando-se 500µl de trizol e macerados até solubilização total com o auxílio de um bastão plástico estéril. O homogenato foi

armazenado à temperatura ambiente durante 5 minutos. Após este período, 100 µl de clorofórmio foram adicionados (200µl para cada ml de trizol), os tubos foram fechados e agitados vigorosamente por aproximadamente 15 segundos e incubados novamente à temperatura ambiente por 2-3 minutos. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 10.000 rpm a 4 °C.

Enquanto isso, novos tubos foram identificados e acrescidos de 500 µl de isopropanol. Após a centrifugação o sobrenadante foi transferido para os tubos contendo o isopropanol, homogeneizados suavemente e incubados a temperatura ambiente por 15 minutos. As amostras foram novamente centrifugadas por 10 minutos a 10.000 rpm a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* (RNA-total) solubilizado com 1 ml de álcool 75%. Uma nova centrifugação foi realizada por 5 minutos a 7.000 rpm a 4 °C, o excesso de álcool retirado e o *pellet* solubilizado em 200 µl de água tratada com DEPC. Uma alíquota foi removida para verificar a integridade do RNA em gel de agarose e para quantificação, e o restante da solução foi armazenado imediatamente em freezer –80 °C até sua utilização. A análise qualitativa foi realizada em gel de agarose 1% diluída em Trizma Base EDTA (TBE) 1X. Para tanto, 10 µl do RNA total foi acrescido de 1,5 µl do corante Loading Dye 10X e 3,5 µl água DEPC e a eletroforese foi realizada durante 60 minutos a 80 V.

4.8.2 Quantificação RNA Total

Para a quantificação a amostra foi diluída 1:5, ou seja, 40 µl de H₂O DEPC foi adicionada a 10 µl do RNA total e homogeneizada suavemente. A quantificação

foi realizada no Biofotômetro (Eppendorf) a 260nm. O equipamento foi zerado com água DEPC.

4.8.3 Tratamento do RNA Total com DNase I

Para eliminar qualquer DNA remanescente que viessem a interferir na análise, o tratamento com DNase I foi utilizado. Os tubos foram identificados e deixados em banho de gelo. Com todos os tubos no gelo foi pipetado um volume suficiente para conter 10 ng/ μ l de RNA total após a RT-PCR (sempre foi calculado 20 vezes mais). As condições de reação encontram-se no quadro 1.

1μl DNase I reaction buffer 10x
1μl da enzima DNase I (1U/μl)
H₂O DEPC para o volume final de 10 μl.

Quadro 1 - Condições da reação

A seguir, os tubos foram mantidos em temperatura ambiente por 15 minutos. Ao término desta incubação, 1 μ l de EDTA (25mM) foi adicionado para bloquear a ação da enzima. Continuando a reação, os tubos foram aquecidos por 10 minutos a 65°C no próprio termociclador. Após este período, os tubos foram retirados do termociclador e adicionados em banho de gelo.

4.8.4 Transcrição Reversa (RT)

Aos tubos contendo RNA total (tratados com DNase I), foram adicionados 1 µl do Oligo DT; 1 µl de dNTPs (mix de 10mM cada dNTP) e incubados a 65 °C por 5 minutos, retirados da máquina e colocados no gelo. A seguir, foram acrescentados aos tubos: 4 µl do buffer 5X (superscript II); 2 µl de DTT 1 M; 1 µl de RNase OUT e este mix incubado por 2 minutos a 42 °C. Os tubos foram mantidos a 42 °C e acrescidos de 1 µl da enzima Superscript II. A incubação continuou a 42 °C por 50 minutos e em seguida a 70 °C por 15 minutos.

Ao término desta incubação foram acrescentados aos tubos 1 µl de enzima RNase H (para retirar os resíduos de RNA da amostra de cDNA) e incubados a 37 °C por 20 minutos. O cDNA foi armazenado a -20 °C até o momento da amplificação do cDNA.

4.8.5 PCR em Tempo Real no ABIPrism® 7000 Sequence Detection Systems (Applied Biosystems)

Após a RT, foi efetuado o PCR em Tempo Real (Real Time PCR ou RT-PCR) no aparelho ABIPrism® 7000. Neste sistema, as fases de anelamento, extensão e desnaturação ocorrem durante os ciclos de maneira similar quando da utilização do termociclador, uma vez que o ABIPrism 7000 é um termociclador acoplado há uma câmera CCD. A diferença é que a amplificação da seqüência alvo é detectada em tempo real pela emissão de fluorescência, que ocorre quando há

formação de dupla fita na região codificada pelo par de primers. A quantificação relativa da amplificação é feita pela fluorescência captada pela unidade óptica do aparelho.

À medida que a reação de amplificação se processa um gráfico é construído. Neste gráfico, a ordenada corresponde ao número de cópias e a abscissa ao número de ciclos. Diferentemente do sistema tradicional de amplificação, onde o que se observa é o número de cópias final, a amplificação é detectada onde as condições “ótimas” para o PCR são mantidas, ou seja, na fase exponencial. Neste período, os substratos para a amplificação ainda estão presentes nas concentrações ideais, o que no sistema *end-point* não se observa. Pelas características do sistema, no RT-PCR é possível determinar este perfil de amplificação, o que representa uma das vantagens metodológicas. O ponto na abscissa correspondente ao início do trecho linear é chamado de Ct (*cycle threshold* ou ciclo limiar) e este valor é utilizado para a comparação relativa da expressão gênica: quanto menor o Ct, teoricamente mais expressa é determinada mensagem, ou seja, a diferença de 1 Ct, representa o dobro de expressão.

O sistema adotado para a detecção da expressão gênica da Cx32 e beta-actina foi o sistema TaqMan. Neste sistema, além do par de primers, é necessária a utilização de uma sonda que, por ter um Tm mais alto (cerca de 10°C de diferença), se hibridiza de forma específica com a fita modelo antes do par de primers. A sonda é composta na sua extremidade 5' por fluoróforo R (*reporter dye* ou fluorocromo sinalizador) cuja fluorescência, quando a sonda está íntegra, é capturada pelo Quencher bloqueador de fluorescência (NFQ) acoplado ao MGB (*minor groove binding*). O MGB é a substância que permite a construção da sonda com a diferença de 10°C em relação ao primer.

Por meio da atividade 5' exo-nuclease da Taq polimerase, o fluoróforo é clivado e a fluorescência emitida é capturada pela câmera CCD do equipamento. Assim, durante o processo de extensão iniciado pelo par de primers, a sonda se separa da fita *template*, e nesse ocorre à liberação do fluoróforo. Em cada fase de anelamento, o fluoróforo se intercala na dupla fita, liberando a fluorescência que é, portanto, proporcional ao número de cópias.

4.8.6 Primers e Sondas

Os primers e sondas específicos para a conexina 32 e beta-actina estão descritos no quadro 2. As seqüências utilizadas para a confecção dos primers foram aquelas depositadas no banco público do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Para a conexina 32, o primer *forward* (sentido) foi desenhado dentro do éxon 1, enquanto que o primer *reverse* (anti-sentido) foi desenhado dentro do éxon 1b. Os primers referentes à beta-actina foram desenhados dentro do éxon 5 (sentido) e dentro do éxon 5 + 6 (reverso). Ambas as seqüências foram alinhadas utilizando a ferramenta do NCBI (BLAT) para a confirmação das mesmas. A porção correspondente a cada seqüência foi determinada com o auxílio da ferramenta Swiss-Prot (<http://us.expasy.org/cgi-bin/niceprot>).

	Primer
Conexina 32	
Senso	GGG TGG CCT CAA GGA TAG
Antisenso	ATG AAC TGG ACA GGT CTA TAC ACC
Sonda	GTG TGA ATG AGG CAG GCT CCC CAG
Beta-actina	
Senso	AGA TTA CTG CCC TGG CTC CTA
Antisenso	CAA GTA CTC TGT GTG GAT TGG TGG
Sonda	ACC ATG AAG ATC AAG ATC AT

Quadro 2 - Primers e sondas específicos para a conexina 32 e beta-actina

As seqüências enviadas à Applied Biosystems para a construção dos primers estão discriminadas a seguir:

Conexina 32:

ttgggacgcaggcgcgaccacagggaccactccccctacacagacatgagaccataggggagctgtct**gggtgg**
cctcaaggatagggcgtccccaggtgtgaatgaggcaggatgaactggacaggtctatacaccttgctcagt
ggcgtgaatcggcactctacagccattggccgagtatggctgtctgtcatcttcagaaatcatgggtgctgggtg
gctgtgagagcgtgtgggggatgagaagtcctcttcatctgtaacaccctccagccggctgcaacagcgtctgct
atgaccatttttccccatctcccacgtgcgcctatggccctgcagcttacttggtttccaccccagctctcctgtggcaa
tgcacgtagctcaccaacagcacatagaaaagaaaatgctacggcttgaggggcatggggacccccctcacctgga
agaggtaaagagacacaaggtgcacatctcagggaactgtggtggacctatgtcatcagtggtgtccggctgct
gttcgaggctgtctcatgtatgtcttctatctgctctaccccggtatgccatggtgcggctggtcaagtgtgaagccttc
cctgccccaacacagtggaactgctcgtgtcccgccccaccgagaaaaccgtcttcactgtctttagctcgagcctcc
ggcatctgcattatcctcaacgtggcggaggtggtgtacctcatcatccgggcctgtgcccgccgtgctcagcgccgct
ccaatccgcccctccgcaagggctcgggctcgccaccgcctctcacctgaatacaagcagaatgagatcaacaa
gctgtgagcgcagcaggatggctctctgaaagacatactgcgccgagccctggcacaggggcccgggctcgtga
aaagagcgaccgatgctcagcctgctgatgccagtagcaggcaacctcccatcccacccctccctcacctgcccag
acctgccccctccttctctatgccggtgagcaggcttctgctgatagggaattactccatcaaaccttccctcccttct
actcccccttctcagagaccttctgtcaaagacctggccggctggggagtgaggagccacttctacaacagggctca
agggtattaatggtgtgggcaattcttctgcctatacccttcttcccttccctgaaacgaggatgagatgttctgaa
ggtgtttccaattaggaactaacttaacccccatgctgtctggtacccacttgggagtcagtcggtggggaggat
gtgggcaagcagagtgaggaggggctctgcctgtggatggagaaggatgggagcttgccttgcctgccacg
ggggagaagaggacacatctagggtgaggagttatggagagagaagcaggcagataaatcgagtggggattg
gtcagggtgccccagtcctccagttccaaggccccctctctg

Beta-actina:

gtatggaatcctgtggcatccatgaaactacattcaattccatcatgaagtgtgacgttgacatccgtaaagacctctatg
 ccaacacagtgctgtctgggtggcaccaccatgtacccaggcatcgctgacaggatgcagaagg**agattactgccct**
ggctcctagc**accatgaagatcaagatca**tgtcctcctgagcgc**caagtactctgtgtggattgggtgg**ctctatc
 ctggcctcactgtccacctccagcagatgtggatcagcaagcaggagtacgatgagtcggccctccatcgtgcac
 cgcaaatgcttctaggcggactgttactgagctgcgttttacaccctttctttgacaaaacctaactgcgagaaaaaaa
 aaatgagacatttggcatggctttattgtttttgtttttgtttttgttttttaaaatttttttaaaaagggtttttttgtttgtttgg
 cgcttttgactcaaggatttaaaaactggaacggtgaaggcgaccgcagttggttgagcaaacaatccccaaagttc
 tacaatgtggctgaggactttgattgtacattgtttttgtttttgttttttaaatagtcactccaagtatccacggcatagatggt
 tacaggaagtcctcaccctcccaaaagccacccccaaactcctaaggggaggatggctgcacatgccctgagtc
 acaccgggaagggtgacagcattgcttctgtgtaaattatgtacttgcaaacattttttaaatctccgccttaatacttcatttt
 tgttttaatttctgaatggtcagccattcgtggcctgccccctttttgtcccccaactgatgatgaaggcttgggtcctc
 gggagtggtttgaggtgttgaggcgccagggtggcctgtacactgacgtgagaccgttttaataaa

4.8.7 Condições da reação de Real Time PCR (RT-PCR)

Cada etapa é melhor compreendida no quadro 3. As condições de PCR utilizadas foram aquelas consideradas ótimas para a reação pelo fabricante.

TEMPO E TEMPERATURA			
Ajustes Iniciais		40 Ciclos	
HOLD*	HOLD	Ciclo	
2 min @ 50°C	10 min @ 95°C	15 sec @ 95°C	1 min @ 60°C

* Este tempo a 50°C é necessário para a ótima atividade da AmpErase® UNG quando utilizado TaqMan® Universal PCR Master Mix (P/N 4304437)

Quadro 3 - Parâmetros do termociclador para ensaios de quantificação de tempo e temperatura para DNA e cDNA

4.8.8 Interpretação dos Resultados Obtidos no Sistema de Real Time PCR (RT-PCR)

A interpretação dos resultados obtidos através do RT-PCR é descrita a seguir.

4.8.8.1 Método comparativo do $2^{-\Delta\Delta C_T}$ para a quantificação relativa (LIVAK ; SCHMITTIGEN, 2001)

A quantificação na mudança relativa na expressão gênica usando o RT-PCR, requer o uso de certas expressões. O método $2^{-\Delta\Delta C_T}$ é um conveniente caminho para analisar relativas mudanças na expressão gênica determinada pelo RT-PCR. O referido método é representado pela fórmula:

$$2^{-\Delta\Delta C_T}$$

4.8.8.1.1 Derivação da fórmula

A equação que descreve a amplificação exponencial do PCR é:

$$X_n = X_0 \times (1 + E_x)^n$$

Onde:

X_n	Número de Moléculas Alvo no Ciclo n da Reação
X_0	Número inicial de Moléculas Alvo
E_x	Eficiência da Amplificação do Alvo
n	Número de Ciclos

O limiar do ciclo (C_T), indica o número fracional do ciclo no qual a quantidade do gene alvo amplificado atinge um limiar fixado. Assim:

$$X_T = X_0 \times (1 + E_x)^{C_{T,X}} = K_x$$

Onde:

X_T	Número Limiar de Moléculas Alvo
$C_{T,X}$	Limiar do Ciclo para Amplificação do Alvo
K_x	Uma Constante

Uma equação similar para a referência endógena (controle interno do gene) da reação é:

$$R_T = R_0 \times (1 + E_R)^{C_{T,R}} = K_R$$

Onde:

R_T	Número Limiar de Moléculas Referência
R_0	Número Inicial de Moléculas Referência
E_R	Eficiência da Amplificação Referência
$C_{T,R}$	Início do Ciclo para Amplificação Referência
K_R	Uma Constante

Dividindo-se X_T por R_T temos a expressão:

$$\frac{X_T}{R_T} = \frac{X_0 \times (1 + E_x)^{CT,X}}{R_0 \times (1 + E_R)^{CT,R}} = \frac{K_x}{K_R} = K$$

O exato valor de X_T e R_T dependem de vários fatores, incluindo:

- O corante (fluorocromo sinalizador) utilizado na sonda;
- O efeito do contexto da seqüência sobre as propriedades de fluorescência da sonda;
- Eficiência de clivagem da sonda;
- Pureza da sonda;
- Ambientação do início da fluorescência;

Além do mais, a constante K não deve ser igual a 1. Assumindo que a eficiência do alvo e da referencia são os mesmos:

$$E_x = E_R = E$$

$$\frac{X_0}{R_0} \times (1 + E)^{CT,X - CT,R} = K$$

Ou

$$X_N \times (1 + E)^{\Delta CT} = K$$

Onde:

$\frac{X_N}{\Delta C_T}$	O Total Normalizado de alvos (X_0 / R_0)
	Diferença no Limiar dos Ciclos para o Alvo e a Referência ($C_{T,X} - C_{T,R}$)

Rearranjando os dados temos a seguinte expressão:

$$X_N = K \times (1 + E)^{\Delta C_T}$$

O passo final é dividir o X_N por uma das amostras (q) pelo X_N do calibrador (cb):

$$\frac{X_{N,q}}{X_{N,cb}} = \frac{K \times (1 + E)^{-\Delta C_{T,q}}}{K \times (1 + E)^{-\Delta C_{T,cb}}} = (1 + E)^{-\Delta \Delta C_T}$$

Onde:

$$-\Delta \Delta C_T = -(\Delta C_{T,q} - \Delta C_{T,cb})$$

Para os *amplicons* (moléculas produzidas pela reação de PCR) desenhados e otimizados de acordo com o fabricante (tamanho do amplicon < 150 pb), a eficiência é próxima de 1. Por conseguinte, a quantidade do alvo, normalizado a um controle endógeno e a um calibrador relativo é dada por:

$$2^{-\Delta \Delta C_T}$$

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

Os resultados obtidos neste trabalho são descritos abaixo.

5.1 ANÁLISES POR MICROSCOPIA DE LUZ

Por meio desse procedimento foi observada fibrose hepática nos animais tratados com DMN. Dentre as lesões observadas podemos citar: megalocitose (figuras 1 e 2), pontes de fibrose (figura 3), presença de vacúolos (figura 4), proliferação de ductos biliares (figuras 5 e 6), células ovas (figuras 7 e 8), pigmentos de hemociderina (figura 9), infiltrado inflamatório multifocal (figuras 9 e 10), nódulos regenerativos (figura 11), desarranjo da arquitetura lobular (figura 12) e início de processo degenerativo (figura 13).

Figuras 1 e 2 – Fotomicrografias de cortes histológicos de fígados de animais tratados com DMN, realizados em parafina, ilustrando megalcitoses (indicadas pelas setas). Coloração HE. Barra = 60 μ m

Figura 3 – Fotomicrografia de corte histológico de fígado de animal tratado com DMN, realizado em parafina, mostrando pontes de fibrose (indicadas pelas setas). Coloração HE. Barra = 50 μ m

Figura 4 – Fotomicrografia de corte histológico de fígado de animal tratado com DMN, realizado em parafina, evidenciando a presença de vacúolos (indicados pelas setas). Coloração HE. Barra = 70 μ m

Figuras 5 e 6 – Fotomicrografias de cortes histológicos de fígados de animais tratados com DMN, realizados em parafina, ilustrando proliferações de ductos biliares (indicadas pelas setas). Coloração HE. Barra = 50 μ m

Figuras 7 e 8 – Fotomicrografias de cortes histológicos de fígados de animais tratados com DMN, realizados em parafina, mostrando células ovais (indicadas pelas setas). Coloração HE. Barra = 80 μ m

Figura 9 – Fotomicrografia de corte histológico de fígado de animal tratado com DMN, realizado em parafina, mostrando: Pigmentos de hemociderina (indicados pelas setas azuis); Infiltrado inflamatório multifocal com predomínio de neutrófilos polimorfonucleares (indicados pelas setas verdes). Coloração HE. Barra = 100 μ m

Figura 10 – Fotomicrografia de corte histológico de fígado de animal tratado com DMN, realizado em parafina, evidenciando infiltrado inflamatório multifocal com predomínio de neutrófilos polimorfonucleares concentrados no centro do lóbulo (indicados pelas setas). Coloração HE. Barra = 100 μ m

Figura 11 – Fotomicrografia de corte histológico de fígado de animal tratado com DMN, realizado em parafina, ilustrando desarranjo da arquitetura lobular e presença de nódulos regenerativos (**NR**). Coloração HE. Barra = 100 μ m

Figura 12 – Fotomicrografias de cortes histológicos de fígados de animais tratados com DMN, realizados em parafina, evidenciando desarranjo da arquitetura lobular. Coloração HE. Barra = 50 μ m

Figura 13 – Fotomicrografias de cortes histológicos de fígados de animais tratados com DMN, realizados em parafina, evidenciando início de processo degenerativo no qual algumas células apresentam-se menos coradas do que outras (indicadas pelas setas). Coloração HE. Barra = 50 μ m

5.2 ANÁLISES IMUNO-HISTOQUÍMICAS

Nas reações de imuno-histoquímica foi constatado que as Cx32 dos fígados pertencentes aos animais não-tratados com DMN, se localizavam nas membranas plasmáticas dos hepatócitos (Figuras 14 e 15), enquanto que as Cx32 dos animais tratados com DMN foram evidenciadas em sua grande maioria dispersas no citoplasma das células estudadas (Figura 16 e 17).

Figuras 14 e 15 - Fotomicrografias de cortes histológicos de fígados de animais controle, por método de congelamento, ilustrando reações positivas para as Cx32 (indicadas pelas setas) nas membranas celulares dos hepatócitos. Os núcleos foram corados em vermelho (por iodeto de propídio) para dar contraste de fundo. Barra = 50 µm

Figura 16 e 17 - Fotomicrografias de cortes histológicos de fígados de animais tratados com DMN, por método de congelamento, mostrando reação positiva para as Cx32 (indicadas pelas setas), em sua maioria no citoplasma dos hepatócitos. Os núcleos foram corados em vermelho (por iodeto de propídio) para dar contraste de fundo. Barra = 50 µm

5.3 ANÁLISES MOLECULARES

Os resultados das análises moleculares foram relatados da seguinte forma:

5.3.1 RT-PCR

Os resultados obtidos revelaram que houve diminuição em cerca de 40% na expressão da Cx32 quando comparado com o gene constitutivo beta-actina. As médias dos picos de amplificação foram de 0,6 para os animais tratados e de 1,0 para os não tratados, bem como o $2^{-\Delta\Delta Ct}$ revela que houve uma queda de expressão gênica da Cx32 (tabela 1).

Grupos	Conexina 32	Beta-actina	2EDelta Ct
NÃO TRATADOS	31,15 32,36 30,95 31,19 33,58 30,52	22,30 24,17 21,85 22,26 23,83 22,07	1,0
TRATADOS	31,69 35,25 32,30 32,89 34,71 32,69	22,88 24,53 23,46 22,09 24,92 23,69	0,60

Tabela 1 - Médias dos picos de amplificação e 2EDeltaCt para conexina 32 e beta-actina.

Para uma melhor visualização e comparação dos resultados, os dados foram comparados por meio de gráficos.

Gráfico 1 – Comparação dos dados referentes aos animais não tratados

Gráfico 2 – Comparação dos dados referentes aos animais tratados

Gráfico 3 – Comparação dos dados referentes aos 2 grupos de animais

5.2.2 Western Blot

Os resultados dos western blot são apresentados na figura 12. A análise da Cx32 presente em amostras de tecido hepático mostrou que não houveram diferenças entre os tamanhos dos produtos protéicos dos animais tratados e dos não tratados com a DMN

Figura 18 - Western blot do tecido hepático dos animais tratados e dos não tratados com DMN para Cx32. Controle: **1 a 3** – animais não tratados com a DMN; **4 a 5** – animais tratados com a DMN; **MPM** – marcador de peso molecular. A seta aponta para o marcador de peso molecular referente a 40 KDa.

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

A descoberta de que substâncias endógenas e exógenas influenciam no crescimento do fígado e abriu perspectivas de se interferir diretamente no processo da regeneração hepática (BAKER, 1985; STARZL et al., 1975; STARZL et al., 1976). Neste trabalho analisamos a evolução de lesões histopatológicas na fibrose induzida farmacologicamente com o emprego da DMN, bem como o do papel da Cx32 em tal cenário. Para tanto, utilizamos testes imunohistoquímicos aliados a técnicas de biologia molecular para uma melhor compreensão dos dados obtidos.

6.1 CIRROSE E FIBROSE

A cirrose é um processo difuso caracterizado por septos fibrosos em ponte, conversão da arquitetura normal do fígado em lóbulos estruturalmente anormais e presença de nódulos de regeneração (CRAWFORD, 2000; MACLACHLAN; CULLEN, 1998). A fibrose ocorre em resposta a qualquer injúria sofrida pelo fígado. Padrões diferentes de fibrose podem ser produzidos, o que determinará uma condição positiva ou não do estabelecimento de cirrose.

Neste trabalho adotamos a DMN como droga indutora de fibrose, por esta ser um potente agente hepatotóxico (BARNES; MAGEE, 1954), devido à sua total

metabolização no fígado e por reproduzir experimentalmente o modelo mais fiel da fibrose em animais e humanos (MAGEE, 1956; MAGEE, 1958).

6.2 MICROSCOPIA DE LUZ

Diagnosticamos fibrose hepática nos animais submetidos ao tratamento com DMN quando da avaliação por microscopia de luz. Dentre as lesões observadas podemos citar: megalocitose, pontes de fibrose, nódulos regenerativos, proliferação de ductos biliares, células ovais, infiltrado inflamatório multifocal, presença de vacúolos, pigmentos de hemociderina, desarranjo da arquitetura lobular e início de processo degenerativo.

A megalocitose de hepatócitos, indica uma tentativa de resposta celular ao quadro aversivo instalado. As pontes de fibrose indicam uma extensa área de lesão que se estendem excedendo a capacidade regenerativa do fígado (TOSTES, 2003). Progressivamente estas pontes atravessarão todo o parênquima hepático, reunindo feixes fibróticos isolados. Favorecida pela conformação anatômica dos lóbulos hepáticos, as pontes propiciam o surgimento dos nódulos regenerativos ao ligar várias pontes entre si (GAYOTTO; ALVES, 1995). A formação de nódulos regenerativos é mais intensa na fase inicial da cirrose; com a progressão da fibrose, a resposta regenerativa diminui, sendo que na fase inicial da cirrose não existe resposta regenerativa. A presença de ductos biliares é indicativo de que o fígado apresenta deficiências funcionais, já que a proliferação de novos ductos ocorre no espaço porta e nas regiões periportais. A descrição da presença de células ovais e

de infiltrado inflamatório caracteriza um quadro inflamatório comumente associado à danos na função hepática. (GERTMAN et al., 1970; PARRA, 1992; PEREIRA, 2003; SAAD, 1972; SAAD, 1975). A presença de vacúolos muito volumosos e irregulares intumescem consideravelmente a célula, que tende para a forma esférica ou lobulada e comprime os hepatócitos adjacentes (BOGLIOLO, 1981). A hemociderina ou agregados insolúveis de ferritina (a forma como o ferro é estocado nas células retículo-endoteliais) é um pigmento marrom que contém ferro e está usualmente contido em macrófagos do sistema retículo-endotelial em muitos locais do organismo como a medula óssea e o fígado; quando apresenta-se de forma proeminente constitui lesão hepática (THOMSON, 1983). A ocorrência de hemociderina no fígado ou hemociderose hepática pode ser visualizada sob a forma de manchas de ferrugem ou pardo-escura em colorações HE e têm várias causas, entretanto, a mais importante é a destruição excessiva e anormal de hemácias com liberação de hemoglobina (SANTOS, 1988). O desarranjo da arquitetura lobular e o início de processo degenerativo denotam uma grande extensão de lesão hepática.

6.3 FIBROSE HEPÁTICA

Bogliolo (1981) cita que o desarranjo da arquitetura lobular e o início de processo degenerativo ocorrem, em quadros de cirrose, porém nossos resultados não são considerados cirrose, devido a falta de determinados aspectos morfológicos, que também são citados por este autor, entre eles, uma evidente subversão da arquitetura lobular, onde não se distingue mais a estrutura lobular,

mas sim uma nova estrutura que não se encontra equivalentemente normal. Crawford (2000) cita que uma das três características para que ocorra a cirrose é a ruptura da arquitetura de todo o fígado. Em nossos resultados, não obtivemos um total desarranjo da arquitetura hepática, apenas parte dela, concomitantemente a este fator, embora tenhamos obtido resultados como nódulos regenerativos, estes não foram o suficiente para corromper por a arquitetura hepática, dado este que é característico do quadro de fibrose (BOGLIOLO, 1981). O início do processo degenerativo indica um agravamento da lesão, mas também não é um dado consistentemente sólido para denotar cirrose hepática, pois encontra-se ausente de outras características já citadas anteriormente. Baseado nestes dados, constatamos que obtivemos um estágio mais avançado de fibrose hepática e não um quadro cirrótico.

6.4 IMUNO-HISTOQUÍMICA

A técnica de imuno-histoquímica revelou que nos animais controle houve o aparecimento das Cx32 na membrana plasmática formando placas juncionais, fato este esperado já que as Cxs são proteínas responsáveis pela formação das junções comunicantes entre células vizinhas. Por outro lado, observou-se que nas lâminas com células hepáticas de animais tratados com a DMN, a Cx32 apareceu preferencialmente dispersa no citoplasma. Recentemente foi verificado em um estudo *in vitro*, que as Cxs podem ser expressas sem formarem junções comunicantes, sendo acumuladas no citoplasma, se seu mecanismo de transporte

citoplasmático estiver defeituoso (HERNANDEZ-BLÁZQUEZ et al., 2001; YANO et al., 2001) ou se a E-caderina não estiver presente, o que poderia explicar as placas atípicas e o aumento de mRNA sem aumento das junções comunicantes descritas por Nakata et al. (1996). A razão desta diferença de localização não está clara, mas possivelmente devido aos processos regenerativos hepáticos pós-lesão as células hepáticas estão se multiplicando, diminuindo a comunicação intercelular mediada por junções do tipo *gap*, um fato já conhecido na literatura.

6.5 RT-PCR E WESTERN BLOT

Em relação aos resultados obtidos nas análises moleculares, observamos que houve uma diminuição da expressão do gene para Cx32 em animais tratados com a DMN por meio da técnica de RT-PCR. Isso pode ocorrer devido ao efeito hepatotóxico da DMN, a qual pode ter promovido a internalização de receptores, os quais não expressavam portanto o referido gene. A diminuição da expressão do gene da Cx32 também pode ter ocorrido por mecanismos de *up-down regulation* ou regulação negativa, que é um efeito do próprio organismo para tentar restabelecer a homeostase. A técnica de RT-PCR analisa em tempo real como está a expressão dos genes avaliados, e afirma-se que houve diminuição da expressão da Cx32 quando comparada à expressão de um gene constitutivo (ou *house-keeping*), no caso a beta-actina. Observou-se uma diminuição de aproximadamente 40% na expressão da Cx32 quando comparado com a expressão da beta-actina.

Para saber se essa diminuição da expressão do gene para Cx32 poderia promover alguma alteração na tradução de proteínas, produzindo assim proteínas mutadas, não funcionais, ou ainda, deficientes que poderiam levar à prejuízos de determinadas funções fisiológicas, aplicou-se a técnica de western blot. Assim, observou-se que não houve diferenças em relação ao tamanho do produto protéico nos animais tratados ou não com a DMN. Isto pode indicar que o sistema de tradução está a princípio intacto, e que o tratamento não foi suficiente para promover alterações significantes. Somente o seqüenciamento dessas proteínas e também dos genes poderia fornecer informações precisas sobre possíveis mutações pontuais, o que não é revelado pela simples análise de western blot. Embora o método de western blot não seja um método quantitativo como o PCR em tempo real, o fato de não ter se observado redução da quantidade de produto nos animais tratados foi surpreendente, visto que houve a redução da quantidade de mRNA da Cx32 nos animais tratados, não acompanhada por redução da quantidade do produto protéico. Uma das hipóteses para este fato pode advir da constatação de que nos animais controles as Cx estavam situadas na membrana, enquanto nos animais tratados estavam localizadas no citoplasma. As conexinas presentes no citoplasma de células que não formam junções *gap* apresentam meia-vida prolongada, como demonstrado por Hernandez-Blazquez et al. (2001) em células tratadas por cicloeximida, um inibidor da síntese protéica. Após 48 horas de bloqueio da síntese protéica, as Cx do tipo 43 e 26 ainda estavam presentes no citoplasma e podiam formar canais funcionais quando estimuladas pela adição de cálcio. Alguns trabalhos mostram que a meia-vida da Cx32 pode chegar a 1-3 horas (LAIRD et al., 1991; TRAUB et al., 1989) nas junções. Entretanto, é possível que a ausência de

trânsito e da condução de Cx às membranas plasmáticas para formar junções provoque um acúmulo de Cx com meia-vida mais prolongada no citoplasma, visto que a via de degradação das Cx nos canais da membrana plasmática está sendo menos utilizada, porque a quantidade de junções gap nas membranas plasmáticas é menor nos animais tratados pela DMN. Esse excesso de Cxs não utilizadas, de meia-vida mais longa, poderia explicar a manutenção da quantidade geral de proteínas mesmo havendo a redução de mRNA disponível para a síntese. Naturalmente esta é uma hipótese que seria necessário testar em estudos posteriores, mas está de acordo com a opinião de outros autores de que as células mantêm uma população citoplasmática de Cx de prontidão (*standby*) em suas organelas citoplasmáticas (HERNANDEZ-BLAZQUEZ, 2001; LAIRD et al., 1995; YANO et al., 2001). Outra pergunta é se o papel de formação de junções poderia estar sendo desempenhado pela Cx26, a qual formaria placas juncionais apenas de Cx26, ou se a expressão da Cx26 estaria aumentando, compensando a redução do mRNA da Cx32. Contudo, para obter-se dados que possam comparar o comportamento das duas Cx, seria necessário submeter o material aos mesmos métodos aplicados à Cx32, o que pretendemos fazer futuramente.

7 CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

Mediante os resultados obtidos neste experimento, chegamos às seguintes conclusões:

1. Em fígados com fibrose induzida pela DMN, ocorre redução generalizada da formação de placas juncionais formadas pela Cx32;
2. Os tecidos hepáticos submetidos à referida droga (DMN), apresentam redução dos processos de tradução;
3. Embora o processo de tradução dos fígados pertencentes ao grupo tratado tenha apresentado uma redução na tradução, a quantidade de proteína da Cx32 intracelular não apresenta-se reduzida.

REFERÊNCIAS

- ✓ De acordo com ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas), 2002;
- ✓ De acordo com as diretrizes para apresentação de dissertações e teses na FMVZ da Universidade de São Paulo (4ª edição, revista, atualizada e ampliada – SP-2003).

REFERÊNCIAS

ALA-KOKKO, L. ; STENBACK, F. ; RYHANEN, L. Preventive effect of malotilate on dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis in the rat. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 113, n. 2, p. 177-183, 1989.

ALCOLADO, R.; ARTHUR, M. J. P.; IREDALE, J. P. Pathogenesis of liver fibrosis. **Clinical Science**, v. 92, n. 2, p. 103-112, Fev. 1997.

ALISON, M. R. Regulation of hepatic growth. **Physiological Research**, v. 66, n. 3, p. 499-541, Jul. 1986.

ANDERSON, L. M. ; KOSENIAUSKAS, R ; BURAK, E. S.; MOSKAL, T. J. ; GOMBAR, C. T. ; PHILIPS, J. M. ; SANSONE, E. B. ; KEIMIG, S. ; MAGEE, P. N. ; RICE, J. M. ; HARRINGTON, G. W. Reduced blood clearance and increased urinary excretion of N-nitrosodimethylamine in patas monkeys exposed to ethanol or isopropyl alcohol. **Cancer Research**, v. 52, n. 6, p. 1463-1468, Mar. 1992.

ARGENZIO, R. A. Funções secretórias do trato gastrointestinal. In: _____. **Dukes Fisiologia dos animais domésticos**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. part. III, cap. 18, p. 326-329.

BAKER, A. L. Hepatotrophic factors: concepts and clinical implications. **Acta Medica Scandinavica**, v. 703, p. 201-208, 1985. Suplemento.

BANCROFT, J. D.; STEVENS, A. **Theory and practice in of histological technicians**. 2. ed. London: Chruchill, 1982, p. 662.

BANKS, W. L. Sistema digestivo II – órgão extramurais. In: _____. **Histologia veterinária aplicada**. 2. ed. São Paulo: Manole, 1992. cap. 22, p. 468-480.

BARNES, J. M.; MAGEE, P. N. Some toxic properties of dimethylnitrosamine. **British Journal Industry Medicine**, v. 11, n. 3, p. 167-174, 1954.

BATALLER, R. BRENNER, D. A. Hepatic stellate cells as a target for the treatment of liver fibrosis. **Seminars in Liver Disease**, v. 21, n. 3, p. 437-451, Aug. 2001.

BOGLIOLO, L. Fígado e vias biliares. In: _____. **Patologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1981. cap. 20, p. 658-743.

BOYER, J. L.; NATHANSON, M. H. Bile formation. In: SCHIFF, E. R.; SORRELL, M. F.; MADDREY, W. C. **Chiff's diseases of the liver**. 8. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1999. v. 1, part I, chapter 4, p. 130-131.

BRUZZONE, R.; WHITE, T. W.; PAUL, D. L. Connections with connexins: the molecular basis of direct intercellular signaling. **European Journal of Biochemistry**, v. 238, n. 1, p. 1-27, 1996.

CENTER, S. A. Fisiopatologia, Diagnóstico Laboratorial, e Afecções do Fígado: A. Fisiopatologia e diagnóstico laboratorial das afecções hepatobiliares. In: ETTINGER, S. J. ; FELDMAN, E. C. **Tratado de medicina interna veterinária**. 4. ed. São Paulo: Manole, 1997. v. 2, cap. 106, p. 1745-1816.

CHEVILLE, N. F. Cicatrização e inflamação crônica. In: _____. **Introdução à patologia veterinária**. 2. ed. São Paulo: Manole, 2004. cap. 5, p. 139.

CHEVILLE, N. F. In: _____. **Introdução à patologia veterinária**. São Paulo: Manole, 1994. cap. 4,5,8,10.

CORNELIUS, L. M. Enfermidades Hepáticas. In: LORENS, M. D.; CORNELIUS, L. M.; FERGUSON, D. C. **Terapêutica clínica em pequenos animais**. Rio de Janeiro: Interlivros, 1996. cap. 9, p. 200-216.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. Reparo dos tecidos: crescimento celular, fibrose e cicatrização de feridas. In: _____. **Robbins patologia estrutural e funcional**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. cap. 4, 79-100.

CRAWFORD J. M. O fígado e o trato biliar. In: COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Robbins patologia estrutural e funcional**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. cap. 19, p. 759-808.

DAGLI, M. L. Z. **Regeneração hepática e hepatocarcinogênese em camundongos transgênicos que expressam um mutante da conexina 32 somente no fígado**. 2000. 47 f. Tese (Livre Docência) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo, 2000.

DICIONÁRIO MÉDICO BLAKISTON, 2. ed. São Paulo: Andrei, s. d., p. 757.

DORLAND DCIONÁRIO MÉDICO, 25 ed. São Paulo: Roca, 1997, p. 562.

FAUSTO, N.; WEBBER, E. M. Liver regeneration. In: ARIAS, I. M.; BOYER, J. L.; FAUSTO, N.; JAKOBY, W. B.; SCHACHTER, D.; SHAFRITZ, D. A. **The liver: biology and pathobiology**. 3. ed. New York: Raven Press, 1994. chapter 56, p. 1059-1084.

FRIEDMAN, S, L. Hepatic fibrosis. In: SCHIFF, E. R.; SORRELL, M. F.; MADDREY, W. C. **Chiff's diseases of the liver**. 8. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1999. v. 1, part II, chapter 10, p. 371-387.

FRIEDMAN, S, L.; The cellular basis of hepatic fibrosis. Mechanisms and treatment strategies. **The New England Journal of Medicine**, v. 328, n. 25, p. 1828-1835, Jun. 1993.

GAÇA, M. D. A.; ZHOU, X.; BENYON, R. C. Regulation of hepatic stellate cell proliferation and collagen synthesis by proteinase-activated receptors. **Journal of Hepatology**, v. 36, p. 362-369, 2002.

GANONG, F. W. Secreção e motilidade gastrintestinal. In: _____. **Fisiologia médica**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 1989. sec. 5, cap. 26, p. 431-435.

GAYOTTO, L. C. C.; ALVES, V. A. F. Marcadores histopatológicas de doenças hepáticas. In: MATTOS, A. A.; DANTAS, W. **Compêndio de hepatologia**. São Paulo: Fundação Byk, 1995. p. 57-76.

GEORGE, J. ; CHANDRAKASAN, G. Biochemical abnormalities during the Progression of Hepatic Fibrosis Induced by Dimethylnitrosamine. **Clinical Biochemistry**, v. 33, n.7, 563-570, 2000.

GEORGE, J. ; CHANDRAKASAN, G. Molecular characteristics of dimethylnitrosamine induced fibrotic liver collagen. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1292, p. 215-222, 1996.

GEORGE, J. ; RAO, K. R. ; STERN, R. ; CHANDRAKASAN, G. Dimethylnitrosamine-induced liver injury in rats: the early deposition of collagen. **Toxicology**, v. 156, n. 2-3, p. 129-138, 2001.

GERTMAN, P. M.; MADDEN, BEVIN, A. G.; SMITH, H. C. Hepatic collagen metabolism in dimethylnitrosamine induced cirrhosis in rats. **Surgery Forum**, v. 21, p. 363-364, 1970.

GRESSNER, A. M.; BACHEM, M. G. Cellular sources of noncollagenous matrix proteins: role of fat-storing cells in fibrogenesis. **Seminars in Liver Disease**, v. 10, n. 1, p. 30-46. Fev.1990.

GOODENOUGH, D. A.; GOLIGER, J. A.; PAUL, D. L. Connexins, connexons and intercellular communication. **Annual Reviews on Biochemistry**, v. 65, p. 475-502, 1996.

GOODMAN, Z. D. ; ISHAK, K. G. Hepatic histopathology. In: SCHIFF, E. R.; SORRELL, M. F.; MADDREY, W. C. Chiff's diseases of the liver. 8. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1999. v. 1, part I, chapter 3, p. 53-117.

GUERRA, J. L. **Hepatocarcinogênese em camundongos portadores de deleção em um dos alelos da conexina 43 (Cx43+/-): estudos:** estudos histomorfométricos. 2003. 86 f. Tese (Livre Docência) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo, 2003.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. O fígado como órgão. In: _____. **Tratado de fisiologia médica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. cap. 70, p. 799-804.

HAGGERTY, H. G. ; HOLSAPPLE, M. P. Role of metabolism indimethylnitrosamine induced immunosuppression: a review. **Toxicology**, v. 63, n. 1, p. 1-23, Jul. 1990.

HAM, A. W. Pâncreas, fígado e vesicular biliar. In: _____. **Histologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1967. pt. 4, cap. 25, p. 662-690.

HASHIMOTO, N. ; ISHIKAWA, Y. ; UTSUNOMIYA, J. Effects of portacaval shunt, transposition and dimethylnitrosamine induced chronic liver injury on pancreatic hormones and amino acids in dog. **Journal Surgery Research**, v. 46, n. 1, p. 35-40, 1989.

HEPATITE C no mundo. **Weekly Epidemiological Record**, v. 75, n. 3, p. 18, 2000.

HERDT, T. Secreções do trato digestivo. In: CUNNINGHAM, J. G. **Tratado de fisiologia veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. seção 4, cap.28, p. 239-241.

HERNANDEZ-BLÁZQUEZ, F. J.; JOAZEIRO, P. P.; OMORI, Y.; YAMASAKI, H. Control of intracellular movement of connexins by e-cadherin in murine skin papilloma cells. **Experimental Cell Biology**, v. 270, n. 2, p. 235-247, 2001.

JENKINS, S. A. ; GRANDISON, A. ; BAXTER, J. N. ; DAY, D. W. ; TAYLOR, I. ; SHIELDS, R. A dimethylnitrosamine-induced model of cirrhosis and portal hypertension in the rat. **Journal Hepatology**, v. 1, n. 5, p. 489-499, 1985.

JEZEQUEL, A. M. ; MANCINI, R. ; RINALDESI, M. L. ; MACARRI, G. ; VENTURINI, C. ; ORLANDI, F. A morphological study of the early stages of hepatic fibrosis induced by low doses of dimethylnitrosamine in the rat. **Journal Hepatology**, v. 5, n. 2, p. 174-181, Oct. 1987.

JOHNSON, S. E. Fisiopatologia, diagnóstico laboratorial, e afecções do fígado: B. Afecções do fígado. In: ETTINGER, S. J. ; FELDMAN, E. C. **Tratado de medicina interna veterinária**. 4. ed. São Paulo: Manole, 1997. v. 2, cap. 106, p. 1817-1899.

JUN YANG; ICHIKAWA, A.; TSUCHIYA, T. A novel function of connexin 32: marked enhancement of liver function in a hepatoma cell line. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 307, p. 80-85, May. 2003.

JUNQUEIRA, L. C. U.. Histology revisited - Technical improvement promoted by the use of hidrophilic resin embedding. **Ciência e Cultura**, v. 47, p. 92-95, 1995.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Glândulas anexas do tubo digestivo. In: _____. **Histologia básica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. cap. 16, p. 270-286.

KANG Lu-Ping; QI Li-Hong; ZHANG Jun-Ping; SHI Ning; ZHANG Min; WU Tang-Ming; CHEN Jing. Effect of genistein and quercetin on proliferation, collagen synthesis, type I procollagen mRNA levels of rat hepatic stellate cells. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 22, n. 9, p. 793-796, Sep. 2001.

KOJIMA, T.; YAMAMOTO, M.; MOCHIZUKI, C.; MITAKA, T.; SAWADA, N.; MOCHIZUKI, Y. Different changes in expression and function of connexin 26 e connexin 32 during DNA synthesis and redifferentiation in primary rat hepatocytes using a DMSO culture system. **Hepatology**, v. 26, n. 3, p. 585-597, 1997.

KOLB, E.; GÜRTLER, H.; KETZ, H. -A.; SCHRÖDER, L.; SEIDEL, H. Fisiologia do fígado. **Fisiologia veterinária**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1984. cap. 13, p. 339-347.

KRUTOVSKIKH, V. A.; OYAMADA, M.; YAMASAKI, H. Sequential changes of gap-junctional intercellular communications during multistage rat liver carcinogenesis: direct measurement of communication *in vivo*. **Carcinogenesis**, v. 12, n. 9, p. 1701-1706, 1991.

KUMAR, N. M.; GILULA, N. B. The gap junction communication channel. **Cell**, v. 84, n. 3, p. 381-388, 1996.

LAIRD, D. W.; CASTILLO, M.; KASPRZAK, L. Gap junction turnover, intracellular trafficking and phosphorylation of connexin 43 in brefeldin a-treated rat mammary tumor cells. **Journal of Cell Biology**, v. 131, n. 5, p.1193-1203, Dec.1995.

- LAIRD, D. W.; PURANAM, K. L.; REVER, J. P. Turnover and phosphorylation dynamics of connexin43 gap junction protein in cultured cardiac myocytes. **Biochemical Journal**, v. 273, pt. 1, p. 67-72, 1991.
- LAU, L. F.; LAM, S. C. The CCN family of angiogenic regulators: the integrin connection. **Experimental Cell Research**, v. 248, p. 44-57, Apr. 1999.
- LEE, M-H.; YOON, S.; MOON, J-O. The flavonoid naringenin inhibits dimethylnitrosamine-induced liver damage in rats. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, n. 1, p. 72-76, 2004.
- LEE, S. H.; SEO, G. S.; PARK, P-H.; CHOI, J-Y.; PARK, Y. N.; KIM, H. K.; CHAE, K-S.; SOHN, D. H. Increased expression of *O*-acetyl disialoganglioside synthase during rat liver fibrogenesis relates to stellate cell activation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 303, p. 954-961, 2003.
- LI, D.; FRIEDMAN, S. L. Liver fibrogenesis and the role of hepatic stellate cells: new insights and prospects for therapy. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 14, n. 7, p. 618-633, Jul.1999.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative pcr and the $2^{-\Delta\Delta_t}$ method. **Methods**, v. 25, p. 402-408, 2001.
- MACLACHLAN, N. J.; CULLEN, J. M. Fígado, sistema biliar e pâncreas exócrino. In: CARLTON, W. W.; MCGAVIN, M. D. **Patologia veterinária especial**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 1998. cap. 2, p. 95-131.
- MAGEE, P. N. ; BARNES, J. Carcinogenic nitroso compounds. **Advances in Cancer Research**, v.10, p. 163-246, 1967.
- MAGEE, P. N. Toxic liver injury: inhibition of protein synthesis in rat liver by dimethylnitrosamine in vivo. **Biochemical Journal**, v. 70, n. 4, p. 606-611, 1958.
- MAGEE, P. N. Toxic liver injury: the metabolism of dimethylnitrosamine. **Biochemical Journal**, v. 64, n. 4, p. 676-682, 1956.
- MCDERMOTT, W. V.; GREENBERGER, N. J.; ISSELBACHER, K. J.; WEBER, A. L. Major hepatic resection: diagnostic techniques and metabolic problems. **Surgery**, v. 54, p. 56-66, 1963.
- MIYAI, K. Structure-function relationship of the liver in health and disease. In: GITNICK, G.; HOLLANDER, D; SCHOENFIELD, L. J.; SAMLOFF, I. M.; VIERLING,

J. M. **Principles and Practice of Gastroenterology and Hepatology**, 2. ed. Norwalk, connecticut: Appleton & Lange, 1994. sec. VI, chapter 51, p. 679-696.

MOENNIKES, O.; BUCHMANN, A.; OTT, T.; WILLECKE, K.; SCHWARZ, M. The effect of connexin32 null mutation on hepatocarcinogenesis in different mouse strains. **Carcinogenesis**, v. 20, n. 7, p. 1379-1382, 1999.

NAKAMURA, T.; SAKATA, R.; UENO, T.; SATA, M.; UENO, H. Inhibition of transforming growth factor β prevents progression of liver fibrosis and enhances hepatocyte regeneration in dimethylnitrosamine-treated rats. **Hepatology**, v. 32, n. 2, p. 247-255, Aug. 2000.

NAKATA, Y.; IWAI M.; KIMURA, S.; SHIMAZU T. 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, Oct. 1996.

NAVES, M. M. V.; MORENO, F. S. Comunicações intercelulares com conexinas: importância na carcinogênese e papel modulador dos carotenóides. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 36, n. 1, p. 1-11, jan./ jun. 2000.

NICHOLSON, B.; DERMIETZEL, R.; TELOW, D.; TRAUB, O.; WILLECKE, K.; REVEL, J. P. Two homologous protein components of hepatic gap junctions. **Nature**, v. 329, n. 6141, p. 732-734, 1987.

PACK, G. T.; ISLAMI, A. H.; HUBBARD, J. C.; BRASFIELD, R. D. Regeneration of human liver after major hepatectomy. **Surgery**, v. 52, p. 617-623, Oct. 1962

PARADIS, V.; DARGERRE, D.; VIDAUD, M.; GOUVILLE, A-C.; HUET, S.; MARTINEZ, V.; GAUTHIER, J-M.; BA, N.; SOBESKY, R.; RATZIU, V.; BEDOSSA, P. Expression of connective tissue growth factor in experimental rat and human liver fibrosis. **Hepatology**, v. 30, n. 4, p.968-976, Oct. 1999.

PARRA, O. M.; HERNANDEZ-BLAZQUEZ, F. J.; CUNHA DA SILVA, J. R. M.; SOUSA E SILVA, R. A. P.; SAAD, W. A.; SAAD, JR. W. A. Comportamento do colágeno da matrix extracelular do fígado de rato durante o crescimento regenerativo após hepatectomia parcial ou após estimulação por fatores hepatotróficos exógenos. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 33, n. 4, p. 212-216, 1996.

PARRA, O. M.; SAAD, W. A.; FERRAZ NETO, J. B. H. E.; SILVA, R. A. P. DE S.; COLLETO, G. M. D.; SAAD JR., W. A. Additional growth of an intact liver induced by exogenous hepatotrophic factors. A study in rat. **Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva**, São Paulo, v. 7, n. 40, p. 64-68, 1992.

PAUL, D. L. New functions for gap junctions. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 7, n. 5, p. 665-672, 1995.

PEREIRA, H. M. **Efeito do tratamento com fatores hepatotróficos sobre o fígado de ratas (Wistar) com fibrose induzida experimentalmente**. 2003. 125 f. Tese (Doutorado em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

PINES, M.; KNOPOV, V.; GENINA, O.; LAVELIN, I.; NAGLER, A.; Halofuginone, a specific inhibitor of collagen type I synthesis, prevents dimethylnitrosamine-induced liver cirrhosis. **Journal of Hepatology**, v. 27, p. 391-398, 1997.

PROCKOP, D. J.; KIVIRIKKO, K. I. Collagens: molecular biology, diseases and potentials for therapy. **Annual Review Biochemistry**, v. 64, p. 403-434, 1995.

RACHFAL, A. W.; BRIGSTOCK, D. R. Connective tissue growth factor (CTGFCCN2) in hepatic fibrosis. **Hepatology Research**, v. 26, p. 1-9, 2003.

RAMALHO, F. S.; RAMALHO, L. N. Z.; ZUCOLOTO, S.; CASTRO E SILVA JR., O. Regeneração hepática: algumas definições num universo de incertezas. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 8, n. 4, p. 177- 189. 1993.

REECE, W. O. Digestão e absorção. In: _____. **Fisiologia de animais domésticos**. São Paulo: Roca, 1996. cap. 9, p. 215-240.

ROBBINS, S. L. O fígado e o tracto biliar. In: _____. **Patologia com aplicação clínica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1965. p. 770-784.

ROCKEY, D. C. The cell and molecular biology of hepatic fibrogenesis. **Clinics in Liver Disease**, v. 4, n. 2, p. 319-355, May. 2000.

ROENBERG, E.; SPRAY, D.; REID, L. Transcriptional and post transcriptional control of connexin mRNAs in periportal and pericentral rat hepatocytes. **European Journal of Cell Biology**, v. 59, n. 1, p. 21-26, 1992.

ROJKIND, M. Fibrosis and cirrhosis as alterations in homeostais of the liver ecosystem. In: GITNICK, G.; HOLLANDER, D; SCHOENFIELD, L. J.; SAMLOFF, I. M.; VIERLING, J. M. **Principles and Practice of Gastroenterology and Hepatology**, 2. ed. Norwalk, connecticut: Appleton & Lange, 1994. sec. VI, chapter 55, p. 731-741.

ROJKIND, M.; PEREZ-TAMAYO, R. Liver fibrosis. **International Review of Connective Tissue Research**, vol. 10, p. 333-393, 1983.

SAAD, W. A. **Observações morfológicas, auto-radiográficas, morfométricas, histoquímica e bioquímica sobre a regeneração do fígado cirrótico de rato, induzida pela hepatectomia parcial.** 1972. 46 f. Dissertação (Mestrado em Clínica Cirúrgica) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1972.

SAAD, W. A.; **Observações morfológicas, auto-radiográficas, morfométricas, histoquímica e bioquímica sobre a regeneração do fígado cirrótico de rato, induzida pela dupla hepatectomia parcial.** 1975. 75 f. Tese (Doutorado em Clínica Cirúrgica) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1975.

SAKAMOTO, H.; OYAMADA, M.; ENOMOTO, K.; MORI, M. Differential changes in expression of gap junction proteins connexin 26 e 32 during hepatocarcinogenesis in rats. **Japanese Journal of Cancer Research**, v. 83, n. 11, p. 1210-1215, Nov. 1992.

SANTOS J. A. Distúrbio das pigmentações. In: _____. **Patologia dos animais domésticos (mamíferos e aves).** 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988. cap. 8, p. 111-127.

SANTOS, J. A. Tubo digestivo. In: _____. **Patologia especial dos animais domésticos (mamíferos e aves).** 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1986. cap. X, p. 445-473.

SHAW, D. H.; IHLE, S. L. Doenças hepatobiliares e pancreáticas exócrinas. In: _____. **Medicina interna de pequenos animais.** Porto Alegre: Artmed, 1999. cap. 42, p. 325-353.

SHIBA, M.; SHIMIZU I.; YASUDA, M.; LI, K.; ITO, S. Expression of type I and type III collagens during the course of dimethylnitrosamine-induced hepatic fibrosis in rats. **Liver**, vol. 18, p. 196-204, 1998.

SHIBATA, Y.; KUMAI, M.; NISHII, K.; NAKAMURA, K. Diversity and molecular anatomy of gap junctions. **The Clinical Electron Microscopy Society of Japan**, v. 34, p. 153-159, Jul. 2001.

SCHUPPAN, D.; RUHLMANN, T.; HAHN, E. G. Radioimmunoassay for human type VI collagen and its application to tissue and body fluids. **Analytical Biochemistry**, v. 149, n. 1, p. 238-247, Aug. 1985.

SILVA, O. S. **Tratamento da hepatite C e de suas formas evolutivas.** São Paulo: Donnelley-Cochrane, 2000. 94 p.

SILVA, P, T. D. **Avaliação morfológica e cinética da hipertrofia/ hiperplasia renal compensatória pós-nefrectomia unilateral em camundongos: alterações da**

conexina 43 durante o processo. 2003. 74 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental e Comparada) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo, 2003.

SPENCE A. P. In: _____. **Anatomia humana básica.** 2. ed. São Paulo: Manole , 1991. cap. 1, p. 6, 50-78, 556-571.

STARZL, T. E.; PORTER, K. A.; KASHIWAGI, N.; PUTNAM, C. W. Portal hepatotrophic factors, diabetes mellitus and acute liver atrophy, hypertrophy and regeneration. **Surgery Gynecology & Obstetrics**, v. 141, n. 6, p. 843-858, Jun. 1975.

STARZL, T. E.; PORTER, K. A.; WATANABE, K.; PUTNAM, C. W. Effects of insulin, glucagon, and insulin/glucagon infusions on liver morphology and cell division after complete portocaval shunt in dogs. **The Lancet**, v. 17, n. 1, p. 821-825, Apr. 1976.

TADA, S. ; IWAMOTO, H. ; NAKAMUTA, M. ; SUGIMOTO, R. ; ENJOJI, M. ; NAKASHIMA, Y. ; NAWATA, H. A selective ROCK inhibitor, Y27632, prevents dimethylnitrosamine induced hepatic fibrosis in rats. **Journal of Hepatology**, v. 34, p. 529-536, 2001a.

TADA, S.; NAKAMUTA, M.; ENJOJI, M.; SUGIMOTO, R.; IWAMOTO, H.; KATO, M.; NAKASHIMA, Y. NAWATA, H. Pirfenidone inhibits dimethylnitrosamine-induced hepatic fibrosis in rats. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 28, n. 7, p. 522-527, 2001b.

TEMME, A.; BUCHMANN, A.; GABRIEL, H. D.; NELLES, E.; SCHWARZ, M.; WILLECKE, K. High incidence of spontaneous and chemically induced liver tumors in mice deficient for connexin 32. **Current Biology**, v. 7, n. 9, p. 713-716, Set. 1997.

THOMSON, R. G. Degeneração e necrose. In: _____. **Patologia geral veterinária.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1983. cap. 2, p. 83-89.

TOMITA, R. Y. In: _____. **Minimanual do Corpo Humano.** São Paulo: Rideel, 2003. p. 75.

TORTORA G. J.; GRABOWSKI S. R. In: _____. **Princípios de anatomia e fisiologia.** 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p. 2- 4, 92-123, 770-774.

TOSTES, R. A. **Avaliação histológica da fibrose na doença hepática crônica canina:** análise semiquantitativa por escores, análise digital morfométrica e detecção imunoistoquímica de adenovírus canino tipo 1 (CAV-1). 2003. 100 f. Tese

(Doutorado em Clínica Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, São Paulo, 2003.

TRAUB, O.; LOOK, J.; DERMIETZEL, R.; BRUMMER, F.; HUISER, D.; WILLECKE, K. Comparative characterization of the 21-kD and 26-kD gap junction proteins in murine liver and culture hepatocytes. **Journal of Cell Biology**, v. 108, n. 3, p. 1039-1051, Mar. 1989.

TSUDA, H.; ASAMOTO, M.; BABA, H.; IWAHORI, Y.; MATSUMOTO, K.; IWASE, T.; NISHIDA, Y.; NAGAO, S.; HAKOI, K.; YAMAGUCHI, S.; OZAKI, K.; YAMASAKI, H. 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.

TWEDT, D. C. Cirrhosis: a consequence of chronic liver disease. **The Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice**, v. 15, p. 151-176, 1985.

XIANG-DONG MA; XING MA; YAN-FANG SUI, WEN-LIANG WANG. 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. 64-68, 2002.

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

YAMAOKA, K. Expression of gap junction protein connexin 32 in chronic liver diseases. **Liver**, v. 20, n. 2, p. 104-107, 1999.

YAMAOKA, K.; NOUCHI, T.; KOHASHI, T.; MARUMO, F.; SATO, C. Expression of gap junction protein connexin 32 in chronic liver disease. **Liver**, v. 20, p. 104-107, 2000.

YAMASAKI, H. Aberrant expression and function of gap junctions during carcinogenesis. **Environmental Health Perspectives**, v. 93, p. 191-197, 1991.

YAMASAKI, H. Gap junctional intercellular communication and carcinogenesis. **Carcinogenesis**, v. 11, n.7, p. 1051-1058, 1990.

YAMASAKI, H.; NAUS, C. C. G. Role of connexin genes in growth control. **Carcinogenesis**, v. 17, n. 6, p. 1199-1213, 1996.

YANG, C. S. ; TU, Y. Y. ; KOOP, D. R. ; COON, M. J. Metabolism of nitrosamines by purified rabbit liver cytochrome p-450 isozymes. **Cancer Research** , v. 45, n. 3, p. 1140-1145, Mar. 1985.

YANG, C. S. ; YOO, J. S. H. ; ISHIZAKI, H. ; HONG, J. Cytochrome P-450IIE1: role in nitrosamine metabolism and mechanisms of regulation. **Drug Metabolism Reviews**, v. 22, n. 2-3, p. 147-159, 1990.

YANO, T.; HERNANDEZ-BLAZQUEZ, F. J.; OMORI, Y.; YAMASAKI, H. Reduction of malignant phenotype of HPG2 cell is associated with the expression of connexin 26 but not connexin 32. **Carcinogenesis**, v. 22, n. 10, p. 1593-1600, 2001.

YANO, T.; HERNANDEZ-BLAZQUEZ, F.J.; OMORI, Y.; YAMASAKI, H. Reduction of malignant phenotype of HPG2 cell is associated with the expression of connexin 26 but not connexin 32. **Carcinogenesis**, v. 22, n. 10, p. 1593-1600, 2001.

YASUDA, M.; SHIMIZU, I.; SHIBA, M.; ITO, S. Suppressive effects of estradiol on dimethylnitrosamine-induced fibrosis of the liver in rats. **Hepatology**, v. 29, n. 3, p. 719-727, 1999.

YOO, J. S. H. ; GUENGERICH, F. P. ; YANG, C. S. Metabolism of N-nitrosodialkylamines by human liver microsomes. **Cancer Research**, v. 48, n. 6, p. 1499-1504, 1988.

ZARNEGAR, R.; MICHALOPOULOS, G. K. The many faces of hepatocyte growth factor: from hepatopoiesis to hematopoiesis. **Journal of Cell Biology**, v. 129, n. 5, p. 1177-1180. Jun. 1995.

ZHE QI ; ATSUCHI, N. ; OOSHIMA, A. ; TAKESHITA, A. ; UENO, H. Blockade of type β transforming growth factor signaling prevents liver fibrosis and dysfunction in the rat. **Medical Sciences**, vol. 96, n. 5, p. 2345-2349, Mar. 1999.