A photograph of a mouse liver specimen, showing its characteristic reddish-brown color and lobulated surface. The liver is positioned vertically in the center of the frame, with its main body extending downwards and a smaller, more rounded lobe at the top. The background is a light, textured surface, possibly a piece of white paper or a light-colored cloth. The overall lighting is soft, highlighting the texture of the liver and the background.

TARSO FELIPE TEIXEIRA

Influência da expressão da conexina 43 em modelo de hiperplasia de ductos biliares, após a ligação do ducto biliar comum (colédoco) em camundongos com deleção em um dos alelos para o gene da conexina 43

São Paulo

2006

TARSO FELIPE TEIXEIRA

Influência da expressão da conexina 43 em modelo de hiperplasia de ductos biliares, após a ligação do ducto biliar comum (colédoco) em camundongos com deleção em um dos alelos para o gene da conexina 43

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Patologia

Área de concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientador:

Prof. Dr. José Luiz Guerra

São Paulo

2006

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

E. J. C.
BIBLIOTECA VIRGINIE BUFF D'ÁFICE
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
E ZOOTECNIA DA USP
16/11/06

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.1632
FMVZ

Teixeira, Tarso Felipe

Influência da expressão da conexina 43 em modelo de hiperplasia de ductos biliares, após a ligação do ducto biliar comum (colédoco) em camundongos com deleção em um dos alelos para o gene da conexina 43 / Tarso Felipe Teixeira. – São Paulo : T. F. Teixeira, 2006.

113 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, 2006.

Programa de Pós-graduação: Patologia Experimental e Comparada.

Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Prof. Dr. José Luiz Guerra.

1. Conexina. 2. Camundongos. 3. Ducto biliar comum.
4. Hepatopatias. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

COMISSÃO DE BIOÉTICA

PARECER

Interessado: Tarso Felipe Teixeira

Assunto: Protocolo de experimentação adotado em experimento animal.

A Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, após analisar o projeto sob o número 304/2003, intitulado: "Papel da conexina 43 na resposta dos ductos biliares intra-hepáticos à ligação do ducto biliar comum: estudo experimental em camundongos", no qual foram utilizados 160 camundongos, sob responsabilidade do Prof. Dr. José Luiz Guerra, constatou que o mesmo foi realizado de acordo com os princípios de bioética, adotados por esta Comissão.

São Paulo, 20 de dezembro de 2005

Prof^a Dr^a Júlia Maria Matera

Presidente da Comissão de Bioética

FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: TEIXEIRA, Tarso Felipe

Título: Influência da expressão da conexina 43 em modelo de hiperplasia de ductos biliares, após a ligação do ducto biliar comum (colédoco) em camundongos com deleção em um dos alelos para o gene da conexina 43

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr._____

Instituição:_____

Assinatura:_____

Julgamento:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____

Assinatura:_____

Julgamento:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____

Assinatura:_____

Julgamento:_____

Dedico este trabalho

Aos meus pais **João e Sônia**

que se tornaram ao longo da vida a razão de meu viver, fazendo de mim um eterno andarilho,
em busca de tudo aquilo que foram e deixaram,.....pois buscando a honestidade, sendo amigo,
fazendo o bem, sempre que busco estes sentimentos, encontro com eles

Aos meus tios **Tarcísio e Sueli**

que me transformaram através da educação e dedicação infinitas neste homem que sou hoje
só tenho que lhes agradecer por tudo que fizeram e fazem por mim
hoje faço do exemplo de vocês um espelho para vida e para seguir adiante

Aos meus irmãos e acima de tudo meus eternos amigos **Andréa, Flávia, João e Régis**

sem vocês não seria tão feliz...

Aos meus cunhados e acima de tudo meus eternos irmãos **Xan, Durval e Marta**

sempre dispostos a me ajudar

A minha namorada, meu amor, que compreendeu a necessidade do tempo subtraído de convívio,
nunca me permitiu desistir, me ajudou desde o início, fazendo de mim hoje, uma pessoa madura e
muito feliz. A você que tem sido uma fonte de amor e apoio emocional em todos os momentos
que precisei. Muito obrigado **Valéria!**

Aos meus sobrinhos **Isabelle, Vilheno, Lizandra, Izadora, Vinícius** e a priminha **Anna Júlia**,

que com apenas um sorriso me fazem esquecer todos os problemas.

Ao meu **orientador Prof. Dr. José Luiz Guerra,**

que hoje gostaria de não apenas chamá-lo de professor Guerra, mas meu amigo Guerra, porque me permitiu estar aqui lhe fazendo este agradecimento e não apenas isto, mas por tudo que fez por mim, sua confiança e respeito, sua dedicação, sempre pronto e disposto a ajudar e seu bom humor e irreverência que sempre me fizeram rir nos momentos mais estressantes....

A **professora Dra Maria Lúcia Zaidan Dagli,**

pela grande generosidade e carinho com que me tratou durante todo o experimento, sempre disposta a me ouvir ou reservar alguns minutos de seu precioso tempo para tirar minhas dúvidas e me ajudar.

Este trabalho é de vocês e para vocês....

Muito obrigado meus amigos Guerra e Malu

Contem comigo sempre!

Muito obrigado a todos os camundongos que tiveram suas vidas sacrificadas em detrimento de meu conhecimento e de meu trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ninguém escreve uma tese de mestrado sozinho. Eu tive um grande suporte e contribuição de várias pessoas, colegas, amigos e família. Em particular meu orientador e colegas de laboratório, biotério, que em muitos momentos dispensaram seus preciosos tempos para me atender ou orientar.

Este projeto também é resultado de horas de pesquisa, trabalho e escrita desses, que não pouparam esforços e muitas vezes deixaram de lado seus compromissos profissionais para me socorrer e de tantos outros que participaram de alguma maneira.

Ao **professor Dr. Roberto Camargo** por acreditar em mim e me encaminhar à pós-graduação.

Ao **professor Dr. Edson Rodrigues Pereira** por tanto contribuir na minha formação acadêmica, exemplo de ética, perseverança e por despertar em mim o amor pela Patologia.

Ao **professor Dr. Jarbas Bauer** pela força e ensinamento contínuos durante o mestrado.

Aos pós-graduandos que ao longo dessa jornada tornaram-se meus amigos, **Lú Faccas, Heidge, Zé Luis** e especialmente as queridas **Tereza e Márcia**, pois sem vocês as dificuldades seriam muito maiores.

Aos colegas do Laboratório **Patrícia, Silvia, Kátia, Lucas, Bel**, muito obrigado.

Não poderia deixar de agradecer a **Ivone** que me ajudou no início do trabalho e a **Cíntia** que sempre esteve disposta a ensinar e ajudar com muita paciência e dedicação.

A **Silvia**, secretária da Pós-Graduação da Patologia, que sempre teve uma palavra amiga nos momentos mais exaustivos.

A nossa mãe do laboratório **Marguiti** e aos funcionários do Laboratório de Histopatologia do VPT **Cláudio** e **Luciano** que muito contribuíram para esse trabalho.

À **Claudia** do Biotério e funcionários **Rosiris, Idalina e Herculano** que sempre me trataram com muito respeito e me ajudaram quando precisei.

Aos meus amigos **Vitão** que sempre me incentivou e apoiou, ao **Rubão, Amalfi, Cezinha, Cléa, Miziara, Rê Moreira, Gi Dias**, que sempre torceram por mim e compreenderam a importância na minha vida do Mestrado, relevando muitas vezes minhas crises de estresse.

Ao meu tio **Sergio Mantovani** que me permitiu estudar e me formar. Agradeço ainda seu amor incondicional por nós, seus sobrinhos.

A tia **Sadinha** pelos bons e sempre momentos de convivência.

Ao seu **Tino** e dona **Luzy**, pela força e preocupação.

Aos meus avós **Odúlio, Adelaide, Lino e Sada**, que muitas vezes abriram mão de suas vidas em detrimento de minhas vontades. Onde quer que estejam, nossos corações sempre estarão próximos.

Aos meus queridos primos **Ivan, Fabíola, Lisley**, minhas cunhadas **Juliana e Camila**, que participaram ativamente dessa minha jornada, me proporcionando boas risadas e momentos de muita alegria, nunca me permitindo entristecer.

A toda minha família...tios e primos, obrigado por despertarem em mim o verdadeiro sentido de união.

Ao pessoal do **Pró Cão Pet Shop** que compreendeu minha ausência muitas vezes na clínica, em detrimento dos compromissos na Faculdade.

Enfim... aqueles que não citei, considerem-se homenageados e sem dúvida agradecidos, por terem feito parte direta ou indiretamente de minha vida e evolução.

**A TODOS VOCÊS,
MUITO OBRIGADO!**

RESUMO

TEIXEIRA, T. F. **Influência da expressão da conexina 43 em modelo de hiperplasia de ductos biliares, após a ligação do ducto biliar comum (colédoco), em camundongos com deleção em um dos alelos para o gene da conexina 43.** [Influence of connexin 43 expression in biliary ducts hyperplasia, after biliary common duct obstruction (coledoco) model in mice with deletion of one allele of the connexin 43 gene: experimental study]. 2006. 113 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

Atualmente, as pesquisas sobre as células epiteliais biliares expressam uma grande quantidade de conexina 43. O presente estudo avaliou influência do genótipo de camundongos Cx 43 +/- ou Cx 43 +/+, sobre a hiperplasia de ductos biliares, após a ligação do ducto biliar comum (colédoco). Neste estudo, foram utilizados seis grupos de camundongos BALB/c fêmeas de ambos os genótipos, que foram submetidos à ligação do ducto biliar com fio de seda por meio de procedimento cirúrgico, sendo eutanasiados nos tempos de 48 horas, 7 e 14 dias. Aproveitando-se o campo microscópico, cinco estruturas hepáticas: hepatócitos, arteríolas, vênulas, ductos biliares e veia centrolobular foram quantificados para verificar a existência de possível diferença entre os genótipos. Observou-se na análise quantitativa, diferença significativa somente quanto ao número de vasos sanguíneos entre os dois grupos, sendo que as outras estruturas hepáticas quantificadas não apresentaram diferenças significativas. A proliferação celular foi avaliada pela técnica *western blot* para a proteína PCNA (*Proliferation Cell Nuclear Antigen*), somente dos grupos de 48 horas pós-cirúrgico, quando ocorre o pico de proliferação. Quanto à análise quantitativa do *western blot*, não houve diferenças significativas quanto ao genótipo. Já nas bandas protéicas, observou-se maior concentração nos camundongos controle, indicando maior número de células em divisão.

Palavras-chave: Conexina. Camundongos. Ducto Biliar Comum. Hepatopatias.

ABSTRACT

TEIXEIRA, T. F. **Influence of connexin 43 expression in biliaries ducts hyperplasia, after biliary common duct obstruction (coledoco) model in mice with deletion of one allele of the connexin.** [Influência da expressão da conexina 43 em modelo de hiperplasia de ductos biliares, após a ligação do ducto biliar comum (colédoco) em camundongos com deleção em um dos alelos para o gene da conexina 43] 2006. 113 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

The goal in this study was evidence, after duct biliar common ligation (coledoco), using mice genetically modified with connection in one of the alels to connexin 43 (Cx 43+/-) and comparing them to the group control (Cx 43+/+), in order to find out the participation of this protein, even though the epithelials biliary cells express a big quantity of cx 43. The experimental outline were made up of three mice groups BALB/c females of different genotypes which were subdued to surgery procedure using a wire of silk 3.0 and euthanased in each 48 hours during 7 to 14 days. Also using the microscopic view the fives hepatics structures such as, hepatocytes, arterioles, veins, bile ductules and centrelobular vein were quantified, trying to obtain possible differences among the genotypes and to do the qualification of protein concentration was used the western blot to PCNA in order to compare the cells divided in 48 hours. It has observed in the quantitative analysis, strong difference only in the blood vein number among the two groups, however the orders quantitative hepatics structures did not present strong differences. About the quantitative analysis related to western blot did not have strong differences in the genotype, and finally in the proteic staff it has observed bigger concentration in the mice control showing bigger number of cells in division.

Key words: Connexin. Mice. Common Duct Biliary. Hepatopaties.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Modelo de organização da placa juncional	23
Figura 2 - Diagrama mostra dos possíveis arranjos dos <i>conexons</i> nos canais de junções <i>gap</i>	26
Figura 3 - Topologia da molécula de conexina	34
Figura 4 - Desenho esquematizado representando a região codificadora presente no gene da Cx 43.....	36
Figura 5 - Desenho esquemático da vesícula biliar de cão, que se assemelha à anatomia do camundongo.....	43
Figura 6 - Desenho esquemático tridimensional de um lóbulo hepático.....	44
Figura 7 - Desenho esquemático tridimensional de da estrutura do fígado.....	45
Figura 8 - Desenho esquemático tridimensional da organização do tecido hepático.....	46
Figura 9 - Desenho esquemático de um hepatócito normal e durante a colestase.....	49
Figura 10 - Representação esquemática do padrão de marcação, identificação auricular, utilizado para individualizar os camundongos.....	55
Figura 11 - Sala cirúrgica do Departamento de Patologia VPT – FMVZ/USP.....	59
Figura 12 - Fotos do procedimento cirúrgico.....	60
Figura 13 – Representação dos gradículos utilizados pelo Sistema de Imagem.....	64

Figura 14 - Foto escaneada da genotipagem dos camundongos SV e HT.....	68
Figura 15 - Foto de camundongo SV no 7 ° dia após o procedimento cirúrgico.....	69
Figura 16 - Média da perda de peso nos dois grupos de camundongos (SV e HT), durante os períodos experimentais.....	72
Figura 17 - Camundongo HT eutanasiado no 7 ° dia do procedimento cirúrgico.....	74
Figura 18 - Camundongo SV eutanasiado no 7 ° dia do procedimento cirúrgico.....	74
Figura 19 - Foto macroscópica dos fígados durante os três tempos experimentais e o fígado de um camundongo não operado.....	75
Figura 20 - Comparação entre o peso relativo dos 2 grupos de animais (SV e HT) durante os tempos experimentais.....	76
Figura 21 - Fotomicrografia do tecido hepático, com áreas de necrose celular durante o período de 7 dias.....	78
Figura 22 - Fotomicrografia do tecido hepático, com áreas de necrose celular durante o período de 14 dias.....	79
Figura 23 - Fotomicrografia do tecido hepático com células inflamatórias polimorfonucleares...	80
Figura 24 - Fotomicrografia do tecido hepático, com as estruturas hepáticas, durante o período de 48 horas.....	81
Figura 25 - Fotomicrografia do tecido hepático, com algumas estruturas hepáticas, durante o período de 7 dias.....	82
Figura 26 - Fotomicrografia do tecido hepático, com algumas estruturas hepáticas, durante o período de 14 dias.....	83
Figura 27 - Fotomicrografia de tecido hepático do camundongo HT não operado.....	84

Figura 28 - Análise estatística da quantificação do número de hepatócitos.....	85
Figura 29 – Análise estatística da quantificação do número de ductos biliares.....	86
Figura 30 - Análise estatística da quantificação do número de vênulas.....	86
Figura 31 - Análise estatística da quantificação do número de arteríolas.....	87
Figura 32 - Análise estatística da quantificação do número de veias centrolobulares.....	87
Figura 33 - Foto de bandas protéicas de PCNA realizadas pela técnica de <i>western blot</i> dos camundongos SV e HT no período de 48 horas.....	89
Figura 34 - Média e Desvio Padrão, unidade arbitrária de densometria das bandas de PCNA dos dois grupos de camundongos SV e HT no intervalo de 48 horas após a cirurgia.....	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Nomenclaturas mais utilizadas das conexinas e suas localizações.....	29
Tabela 2 - Distribuição tecidual das conexinas nos mamíferos.....	31
Tabela 3 - Distribuição das conexinas nas glândulas endócrinas	32
Tabela 4 - Doenças genéticas relacionadas às mutações das conexinas	35
Tabela 5 - Porcentagem de óbitos observados nos camundongos SV e HT submetidos à obstrução total do ducto biliar comum nos diferentes tempos experimentais de 48 horas, 7 e 14 dias.....	71
Tabela 6 - Causas de óbitos entre os camundongos SV e HT, durante os três tempos experimentais.....	71
Tabela 7 - Média e desvio padrão da evolução ponderal entre os camundongos SV e HT nos tempos experimentais.....	72
Tabela 8 - Média e desvio padrão do peso relativo do fígado entre os animais SV e HT nos três tempos experimentais.....	76
Tabela 9 - Média geral das estruturas hepáticas entre os grupos heterozigotos e selvagens.....	88
Tabela 10 - Média e Desvio Padrão da Densitometria das Bandas de PCNA dos camundongos SV e HT	90
Tabela 11 - Análise dos parâmetros avaliados e quantificados neste trabalho, comparando os genótipos e os tempos experimentais.....	91

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância de duas vias
AMPC	Adenilato ciclase
Ca	Cálcio
CIJG	Canais intercelulares de junções <i>gap</i>
CEB	Células Epiteliais Biliares
Cx	Conexinas
PMSF	Fenilmetilsulfonil
g	Gramas
IP3	Inositol – 1,4,5 – trifosfato
JIG	Junções intercelulares tipo <i>gap</i>
kDa	KiloDáltons
kg	Kilograma
KN	<i>Knockout</i>
IgA	Imunoglobulina A
µm ²	Micrômetros quadrados
mg	Miligrama
ml	Milímetro
M	Mol
nm	Nanômetro
PCNA	<i>Proliferating Cell Nuclear Antigen</i>
PCR	Reação Polimerase em Cadeia
IC	Intercelular

TERMOS EM INGLÊS

Background – constituição genética.

cDNA – fita de ácido desorribonucléico complementar a ácido ribonucléico que contém a mensagem que codifica para determinada proteína.

DNA – ácido desoxirribonucléico.

Gap – fenda.

Knockout – animais geneticamente manipulados em que determinado(s) gene(s) é (são) anulado(s) por vários métodos.

Loops - alças da molécula de DNA ou no caso das conexinas, se refere às alças extras e intracelulares que se dobram conectando cada domínio transmembrana.

Overnight – período de tempo correspondente há uma noite.

PCR – reação de polimerização em cadeia.

Proliferating cell nuclear antigen - proteína com peso molecular de 29 kDa, sintetizada durante a fase S do ciclo celular.

RNA – ácido ribonucléico.

Stem cells - células tronco com a capacidade de auto-regenerar e gerar múltiplos tipos de linhagens celulares.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	20
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	22
2.1 O QUE SÃO AS JUNÇÕES GAP ?.....	22
2.1.1 Funções da Junção <i>Gap</i>	23
2.1.2 A Estrutura das Junções <i>Gap</i>	24
2.2 AS CONEXINAS.....	26
2.2.1 Conexinas: Uma Extensa Família de Proteínas.....	27
2.2.2 Distribuição Tecidual das Conexinas.....	29
2.2.3 A permeabilidade das Conexinas.....	32
2.2.4 Degradação das Conexinas.....	33
2.2.5 A Estrutura das Conexinas.....	33
2.3 MUTAÇÕES DAS CONEXINAS.....	34
2.4 O GENE DA CONEXINA 43.....	36
2.4.1 Funções da Conexina 43.....	37
2.4.2 A utilização de camundongos geneticamente modificados (Cx 43 +/-).....	38
2.5 O MODELO EXPERIMENTAL DE OBSTRUÇÃO TOTAL DO COLÉDOCO.....	39
2.5.1 Hiperplasia de Ductos Biliares após a Obstrução do Colédoco.....	40
2.6 A MACRO E MICROSCOPIA DO SISTEMA BILIAR E HEPÁTICO.....	42
2.7 COLESTASE E ICTERÍCIA APÓS A LIGAÇÃO DO COLÉDOCO.....	47
2.8 ICTERÍCIA APÓS O PROCEDIMENTO CIRÚRGICO.....	50
2.9 A PROTEÍNA <i>PCNA</i>	51

3 OBJETIVOS.....	52
3.1 OBJETIVO GERAL.....	52
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	52
3.2.1 Quantificação das Estruturas Hepáticas.....	53
3.2.2 Utilização do <i>western blot</i> para PCNA.....	53
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	54
4.1 CAMUNDONGOS.....	54
4.1.1 Identificação dos Animais.....	55
4.2 CERTIFICADO DE BIOSSEGURANÇA E NORMAS PARA MANUTENÇÃO E TRABALHOS COM ANIMAIS GENETICAMENTE MODIFICADOS.....	56
4.3 GENOTIPAGEM.....	56
4.4 ESCOLHA DO TEMPO EXPERIMENTAL.....	57
4.5 MODELO EXPERIMENTAL.....	58
4.6 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	61
4.7 COLETA DE MATERIAL.....	62
4.8 ANÁLISE MACROSCÓPICA.....	62
4.9 ANÁLISE MICROSCÓPICA.....	63
4.10 ANÁLISE MORFOMÉTRICA.....	63
4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	65
4.12 <i>WESTERN BLOT</i> - PARA AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE PROTEÍNA PCNA.....	66
4.13 TÉCNICA DO <i>WESTERN BLOT</i> PARA PCNA.....	66
5 RESULTADOS.....	68
5.1 REAÇÃO DA POLIMERASE EM CADEIA (PCR).....	68
5.2 SOBREVIVÊNCIA APÓS O PROCEDIMENTO CIRÚRGICO.....	69

5.3 EVOLUÇÃO PONDERAL.....	72
5.4 ASPECTOS MACROSCÓPICOS.....	73
5.5 PESO RELATIVO.....	76
5.6 ASPECTOS HISTOPATOLÓGICOS.....	77
5.7 ANÁLISE MORFOMÉTRICA.....	84
5.9 <i>WESTERN BLOT</i> PARA <i>PCNA</i>	89
5.10 QUANTIFICAÇÃO DAS BANDAS DE <i>PCNA</i>	90
6 DISCUSSÃO.....	92
7 CONCLUSÃO.....	101
8 REFERÊNCIAS.....	102

1 INTRODUÇÃO

As células nos organismos multicelulares encontram-se organizadas em tecidos e necessitam estar em contato umas às outras para originar grupos cooperativos, que por sua vez, estão associados em várias combinações para formar os órgãos. Foram descritos três tipos de junções que permitem o contato celular e são responsáveis pela homeostasia. Estas são classificadas de acordo com a função que desempenham (ALBERTS et al., 1994). As junções de ancoramento promovem a adesão de uma célula à outra ou nos elementos da matriz extracelular. As junções de oclusão atuam de forma a restringir a passagem de substâncias pelo espaço entre as células, principalmente as da pele. E por fim, as junções comunicantes do tipo *gap*, que promovem a comunicação entre células adjacentes.

As junções comunicantes do tipo *gap* (CIJG) são canais permeáveis que compartilham uma estrutura básica, o *conexon*. Os *conexons* (ou hemicanais) justapostos, cada um fornecido por uma célula adjacente, formam a junção *gap*. Cada *conexon* é composto por seis subunidades de proteínas de membrana, as *conexinas*, filogeneticamente preservadas (GOODENOUGH et al., 1996).

A *conexina 43* é uma proteína de ampla distribuição nos órgãos e tecidos dos mamíferos e exerce diversas funções importantes para manter a homeostasia dos mesmos, tendo sido encontrada em grande quantidade nas células epiteliais biliares (CEB).

Estudos recentes têm demonstrado que alterações nas junções do tipo *gap* podem ser causas de várias anomalias, e que na maioria das células neoplásicas, o aumento da proliferação celular está relacionado à redução da capacidade de comunicação intercelular. Com o advento da engenharia genética e a utilização de animais geneticamente modificados, o papel de várias

proteínas na fisiologia normal e em doenças vem sendo elucidado.

No presente trabalho, foram utilizados camundongos com deleção para um dos alelos do gene da conexina 43, devido ao fato dos animais duplo *knockouts* (Cx 43 $-/-$) não sobreviverem ao período pós-natal, portanto, utilizaram-se os heterozigotos (Cx 43 $+/-$) e homozigotos ou selvagens (Cx 43 $+/+$), sendo os mesmos submetidos ao modelo de hiperplasia de ductos biliares, pela ligação cirúrgica do ducto biliar comum (colédoco).

Esse estudo pôde complementar os estudos anteriores, utilizando o mesmo modelo cirúrgico proposto por outros autores (CLEMENTS et al., 1992; FACTOR et al., 1994; GALL; BHATHAL 1990; LEE et al., 1977; PRADO et al., 2003), permitindo-nos aprofundar na exploração biliar e hepática e demonstrar o processo de hiperplasia de ductos biliares, além de outras alterações e quantificar algumas estruturas hepáticas, tais como, hepatócitos, vênulas, veia centrolobular e arteríolas, durante a evolução do processo patológico decorrente da obstrução do ducto biliar comum, em três tempos experimentais distintos, 48 horas, 7 e 14 dias.

Estudos anteriores, utilizando-se do modelo de obstrução total do ducto biliar comum, priorizaram o esclarecimento dos mecanismos biológicos que induzem a formação de novos ductos biliares intra-hepáticos, esse trabalho, entretanto, pretende apenas apontar a influência da Cx 43 na formação de novos ductos biliares, caso ela exista.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A junção *gap* é um canal formado por um cilindro, denominado de *conexon*, onde cada um deles é formado pelo agrupamento de seis cilindros menores, chamados de *conexinas*, como será detalhado em tópicos posteriores.

2.1 O QUE SÃO AS JUNÇÕES GAP ?

Os canais intercelulares de junção do tipo *gap* (CIJG) foram descritos pela primeira vez na década de 60 por Kanno e Loewenstein (1964), que utilizaram o termo “junção comunicante do tipo *gap*” com a finalidade de descrever regiões especializadas onde as membranas plasmáticas de duas células adjacentes se reaproximam sem se fundir, delimitando um espaço entre duas membranas ou *gap* estimado em 2 - 3 nm, em relação aos 15 - 20 nm que separam duas células vizinhas.

Goodenough et al. (1972) e Makowski et al. (1977) isolando as junções *gap* de hepatócitos de camundongos, pelo método de cristalografia e difração de Raio – X, observaram imagens por difração óptica efetuadas sobre as frações de membranas ricas em CIJG, revelando que estas membranas são formadas por estruturas hexaméricas chamadas de *conexons* com 7 nm de diâmetro, propondo, então, um modelo de placa juncional, também chamada de junções *gap*, que são formadas pela reunião de um extenso número de *conexons*, cuja extensão é proporcional ao número desses canais.

Cada *conexon* é constituído de seis subunidades protéicas, chamadas de conexinas (Cx), que atravessam a membrana plasmática e quando oligomerizadas formam um poro central hidrofílico de cerca de 2 nm de diâmetro (Figura 1). O tamanho e o número de placas juncionais variam muito de um tipo celular para outro, e dependem freqüentemente do estado de atividade dos tecidos (BEYER, 1993; DERMIETZEL et al., 1990).

Fonte: Disponível em: <lab.univ-poitiers.fr/ipbc/FR/ICC/def-cxine.htm>
Figura 1 – Modelo de organização da placa juncional

2.1.1 Funções da Junção Gap

Além de atuarem de forma direta no desenvolvimento, crescimento e diferenciação celular (KOJIMA et al., 2002), os CIJG permitem a harmonização e sincronização das atividades celulares, desempenhando importante função na regulação da homeostasia tecidual,

como a manutenção das constantes fisiológicas (pH e concentrações iônicas), através do rápido transporte de pequenas moléculas célula a célula, sendo responsáveis pelo fluxo direto de moléculas com peso molecular inferiores a 1000–2000 dâtons, tais como: íons K^+ , Cl^- e outros mensageiros secundários (IP₃, AMPc e Ca^{2+}), nucleotídeos (ADP, ATP e CTP) e determinados compostos do metabolismo intermediário, como os aminoácidos (KUMAR; GILULA, 1996; YAMASAKI, 1996; YAMASAKI; NAUS, 1990).

Nas células excitáveis, os CIJG são responsáveis pela troca de íons, possibilitando a sincronização das atividades elétricas, por exemplo, nos cardiomiócitos esses canais mantêm a sincronização dos batimentos cardíacos e nos neurônios asseguram a coordenação da resposta aos estímulos centrais, tornando a comunicação via junções *gap* no SNC mais rápida do que aquelas fornecidas pelas sinapses químicas (AVANZO, 2005). Os CIJG participam da nutrição de órgãos pobremente vascularizados, como o cristalino (GOODENOUGH et al., 1980), no fígado esses canais intercelulares permitem a diluição de compostos tóxicos, conectando a maior parte das células e durante o desenvolvimento embrionário, desempenham importante função (AVANZO, 2005).

2.1.2 A Estrutura das Junções *Gap*

Como já foi mencionado, as Cx oligomerizadas em *conexons*, se associam com outro *conexon* fornecido pela célula vizinha, numa exata simetria para formar um canal juncional completo. Cada canal é composto pela associação de 12 moléculas de Cx ao redor de um poro central, (MAKOWSKI et al., 1977; UNGER et al., 1999) e está inserido na bicamada lipídica da membrana plasmática de cada célula adjacente.

Uma das principais contribuições no conhecimento dos CIJG, no transcorrer dos últimos anos, foi à demonstração de que diferentes conexinas poderiam estar implicadas na formação de um mesmo canal.

O *conexon* pode ser classificado como homomérico, quando composto por um único tipo de conexina, ou heteromérico quando apresentam mais de um tipo de conexina na sua composição. Por sua vez, os canais intercelulares podem ser constituídos a partir de combinações diferentes de *conexons* homoméricos e/ou heteroméricos. A associação de dois *conexons* idênticos leva a formação de um canal homotípico, enquanto que o alinhamento de dois *conexons* diferentes forma um canal heterotípico (Figura 2).

A existência de *conexons* heteroméricos foi observada *in vitro* e confirmada *in vivo* (AVANZO et al., 2005). Diferentes combinações foram descritas, tais como as Cx 32 e Cx 26 no fígado (DIEZ et al., 1999) e na glândula mamária (BERTHOUD et al., 2000).

Fonte: (GILULA; KUMAR; et al., 1996)

Figura 2 - Desenho esquematizado dos possíveis arranjos dos *conexons* nos canais de CIJG

2.2 AS CONEXINAS

As conexinas são proteínas transmembranares não glicosadas, com massa molecular variando entre 21 a 70 kDa. Estudos realizados sobre suas estruturas moleculares por técnicas bioquímicas, a partir de frações subcelulares ricas em junções tipo *gap*, mostraram que a extração destas frações a partir do tecido, só foi possível graças à relativa resistência destas placas juncionais à solubilização por determinados detergentes (N- Laurilsarcosina; Triton -X 100) ou por compostos alcalinos, como o hidróxido de sódio (GOODENOUGH; STOECKENIUS, 1972; HERTZBERG; SKIBBENS, 1984).

A primeira conexina identificada e caracterizada foi a Cx 32, em fígado de rato. Após a obtenção da sequência de aminoácidos da extremidade aminoterminal da proteína pelo método de degradação de Edman, os oligonucleotídeos foram sintetizados e serviram como sondas para produzir bancos de cDNA (fita de ácido desoxirribonucléico complementar a ácido ribonucléico que contém a mensagem que codifica para determinada proteína) de diferentes tecidos (HEYNKES et al., 1986; NICHOLSON et al., 1981; PAUL, 1986).

Beyer et al. (1987) fundamentados nos primeiros relatos da conexina 32 em fígado de rato, clonaram o cDNA correspondente às proteínas das Cx 43 e Cx 46 do coração, sugerindo o nome conexina 43 ou Cx 43 em associação ao peso molecular (kDa). Enquanto, originalmente as conexinas foram classificadas de acordo com a sua origem tecidual ou peso molecular, tornou-se claro que estas denominações eram inadequadas, uma vez que uma mesma conexina poderia se expressar em vários tecidos e outras conexinas apresentavam o peso molecular muito próximo. Na tentativa de padronizar esses achados, algumas nomenclaturas utilizadas atualmente foram propostas.

2.2.1 Conexinas: Uma Extensa Família de Proteínas

Estudos envolvendo RNA mensageiros e as conexinas revelaram que elas são codificadas nos mamíferos por uma família multigênica, constituída por pelo menos 21 membros (GOODENOUGH et al., 1996). O cDNA que codifica as conexinas revela regiões de alta homologia e regiões com pouca ou nenhuma homologia, o que permitiu uma classificação das mesmas por números, correspondentes ao peso molecular (Cx 26, Cx 30.3, Cx 31, Cx 31.1, Cx 33, Cx 32, Cx 37, Cx 40, Cx 43, Cx 45, Cx 46, Cx 50, Cx 60) e

relacionada aos diferentes tipos celulares (YAMASAKI; NAUS, 1996). Em certos casos, algumas conexinas identificadas, apresentam massas moleculares muito próximas, fazendo-se necessário empregar um número decimal: é o caso para diferenciar a conexina 31 da conexina 31.1 (HENNEMANN et al., 1992a; WILLECKE et al., 1991a). Para as Cx homólogas (de mesma formação estrutural) e de espécies diferentes, utiliza-se um sufixo, ou seja, uma abreviação precisando a espécie, por exemplo, para humano, Cx h.

Existe ainda uma nomenclatura alternativa que se baseou na análise filogenética das diferentes conexinas, isto é, nas homologias sequenciais de nucleotídeos, propondo que os genes das conexinas originam-se de uma sequência ainda indeterminada e que teria sofrido ao menos uma duplicação no início ou imediatamente antes da evolução dos vertebrados, dando origem à separação entre as subclasses α , β e γ (GILULA; KUMAR, 1992). Nesta nomenclatura, cada Cx é nomeada pela classe na qual ela aparece, identificada por uma letra grega (α , β ...), seguido do número da ordem de sua identificação. Por exemplo, a Cx 32 aparece na classe β , pois foi a primeira Cx identificada nesta classe e, portanto, é identificada o como β 1 (PAUL et al., 1986). A tabela 1 relaciona as duas nomenclaturas, os pesos moleculares das conexinas e suas localizações nos diferentes órgãos e tecidos.

Todas as conexinas descobertas são codificadas por genes diferentes localizados em cromossomos distintos, exemplo, o gene Cx 32h (**no humano**) está localizado no cromossomo X, o da Cx 43h no cromossomo 6, a Cx 26h no cromossomo 13 (WILLECKE et al., 1990).

Tabela 1 – Nomenclaturas mais utilizadas das conexinas e suas localizações

Classe de Cx	Nomenclatura do peso molecular	Massa Molecular (kDa)	Órgãos onde se expressam
α 1	Cx 43	43.0	Coração
α 2	Cx 38	37.8	Embrião
α 3	Cx 46	46.0	Retina
α 4	Cx 37	37.6	Pulmão
α 5	Cx 40	40.4	Pulmão
α 6	Cx 45	45.7	Coração
α 7	Cx 33	32.9	Testículo
α 8	Cx 50	49.6	Retina
β 1	Cx 32	32.0	Fígado
β 2	Cx 26	26.5	Fígado
β 3	Cx 31	31.0	Pele
β 4	Cx 31.1	31.1	Pele
β 5	Cx 30.3	30.3	Pele

(GILULA; KUMAR et al., 1996)

Relação entre as duas nomenclaturas propostas para identificação das conexinas, baseada na análise filogenética das diferentes Cx, utilizando-se letras gregas seguida de um número e/ou de acordo com o peso molecular de cada proteína

2.2.2 Distribuição Tecidual das Conexinas

As conexinas estão distribuídas entre os diferentes tecidos de maneira muito complexa e extensa (Tabela 2), com exceção das células musculares estriadas adultas, dos espermatozóides e das células sanguíneas, todos os tecidos expressam uma ou várias conexinas, todavia, uma mesma Cx é geralmente encontrada em vários tecidos ou tipos celulares. A Cx 43, alvo de nosso estudo, é amplamente distribuída e tem sido destacada por diversos autores, devido sua relativa importância no organismo (Tabela 3), ao contrário de

outras, como a Cx 33, 44 e 31.1 que apresentam um padrão mais restrito.

Quando várias conexinas são co-expressas, elas podem se combinar fazendo parte de uma mesma placa juncional, como as cx 26 e 32, encontradas nos hepatócitos de camundongos (GUERRIER et al., 1995) e essa multiplicidade e especificidade da expressão das conexinas, associadas à diversidade dos tipos celulares que compõe um dado tecido, dificultam a determinação exata da função da comunicação intercelular de cada conexina expressa no tecido. No mesmo órgão, como o fígado, as conexinas podem se distribuir de maneira muito particular, por exemplo, os hepatócitos expressam predominantemente a conexina 32 em ácinos (PIECHOCKI et al., 1999) e a conexina 26, em menor quantidade, tem sido encontrada somente em hepatócitos periportais (GONZÁLES et al., 2002). Já as células epiteliais biliares expressam grande quantidade de conexina 43 e baixas quantidades de cx 26 e 32. No coração, a Cx 40 está localizada nas fibras de *Purkinge*, enquanto que a Cx 43 encontra-se predominantemente no miocárdio ventricular, e esta incompatibilidade entre as duas proteínas é que permite o perfeito funcionamento do batimento cardíaco (BRUZZONE et al., 1993). Lerner et al. (2000) sugeriram que em camundongos Cx 43 +/-, ocorre apenas 50% dos níveis normais de expressão da conexina 43 na musculatura cardíaca.

Tabela 2 – Distribuição tecidual das conexinas nos mamíferos

Conexina	Classe	Tecido	Tipo Celular
Cx 26	β 2	Fígado, rim, baço, testículos, pulmão, estômago, intestino, cérebro, pâncreas, pele, pineal	Hepatócito, neurônio, queratinócito, pinealócito
Cx 30	β 6	Pulmão, estômago, útero, pele	Queratinócitos
Cx 30.3	β 5	Pele	Queratinócitos
Cx 31	β 1	Pele e testículos	Queratinócitos
Cx 31.1	β 4	Epitélio estratificado escamoso, pele e testículo	Queratinócitos
Cx 32	β 1	Fígado, rim, baço, testículos, pulmão, estômago, intestino, cérebro e útero	Hepatócito, oligodendrócito, neurônio, célula de Schawann, células epiteliais da tireóide
Cx 33	α 7	Testículo	Células de Sertoli
Cx 36		Retina, cérebro	Neurônios
Cx 37	α 4	Fígado, rim, baço, testículos, pulmão, estômago, intestino, cérebro e útero, ovário, vasculatura e coração	Células endoteliais e fibras de Purkinge
Cx 40	α 5	Vasculatura, coração, rim, útero, ovário, pulmão e intestino	Células endoteliais e fibra de Purkinge
Cx 43	α 1	Pele, córnea, rins, tireóide, cristalino, ovários, hipófise anterior, pâncreas, bile	Blastócitos, fibroblastos, macrófagos
Cx 44		Retina	
Cx 45	α 6	Pulmão, cérebro, rim, pele, coração, intestino	Cristalino, célula de Schawann
Cx 46	α 3	Cristalino, coração, rim e nervo periférico	Cristalino, célula de Schawann
Cx 50	α 8	Cristalino, córnea, coração	Cristalino, células epiteliais, valvas atrioventriculares
Cx 57	α 9	Ovários, pele, coração, testículos, intestinos	Enterócitos, Sertoli
Cx 60		Ovários, cólon; timo; baço	Ovarianos e hematopoéticos

(AVANZO, 2005)

Tabela 3 – Distribuição das conexinas nas glândulas endócrinas

Órgãos	Conexinas	Referências
Hipófise	Cx 43; Cx 26	Meda P., et al., (1993) e Morand I. et al., (1995)
Paratireóide	Cx 43; Cx 26	Meda P., et al., (1993)
Pâncreas Endócrino	Cx 43	Meda P., et al., (1991)
Glândulas Adrenais	Cx 43	Meda P., et al., (1993) e Murray S. A., et al., (1995)
Tireóide	Cx 43; Cx 32	Meda P., et al., (1993) e Munari-Silem Y., et al., (1994)
Ovário	Cx 43; Cx 37; Cx 40	Haeffliger J. H. et al., (1992) e Schreiber J. R. Et al., (1993)

(MUNARI-SILEM et al., 1994)

2.2.3 A permeabilidade das Conexinas

Diversos trabalhos têm evidenciado as propriedades de permeabilidade diferenciadas dos CIJG, segundo os tipos de conexinas que os formam, contudo, o grau de permeabilidade pode mudar durante a diferenciação celular, conforme a necessidade do equilíbrio fisiológico celular, por exemplo, durante a diferenciação das células ovas em CEB (células epiteliais biliares), existe uma mudança na expressão das Cx 43 e 26 para 31 e 31.1 (BRISSETTE et al., 1994). Paralelamente a esta diferenciação, ocorrem mudanças na permeabilidade das CIJG, que deixa de transmitir moléculas de qualquer peso molecular para permitir apenas a passagem de moléculas com baixo peso molecular.

Um estudo mais recente demonstrou que a seletividade e permeabilidade independem da condução do canal (VEENSTRA et al., 1995), entretanto, a base molecular para essa aparente seletividade permanece desconhecida. Tornou-se evidente, portanto, que a permeabilidade depende do tamanho, da forma e da carga das moléculas trocadas (ELFGANG

et al., 1995; KANNO; LOEWENSTEIN, 1996; NICHOLSON et al., 2000; STEINBERG et al., 1994; VEENSTRA et al., 1995).

2.2.4 Degradação das Conexinas

As conexinas apresentam média de vida variável entre 1h e 30 min a 5 horas, conforme o tipo de conexina e o tipo celular considerado. Exceção para a conexina 46 que apresenta média de vida superior a 24 horas (JIANG et al., 1993).

2.2.5 A Estrutura das Conexinas

A sequência de aminoácidos, derivados de cada cDNA tem sido usado para estabelecer a estrutura das moléculas de conexina, que compartilham uma topologia comum (SAEZ et al., 2003).

As conexinas estão associadas à membrana plasmática por múltiplas α hélices transmembranares, através de 4 domínios hidrofóbicos, representado cada um, por segmento transmembrana M1, M2, M3 e M4, ligados por hélices citoplasmáticas (com cerca de 40 a 60 aminoácidos) e 3 alças hidrofílicas, com cerca de 20 a 30 aminoácidos. As alças extracelulares, E1 e E3 são responsáveis pela acoplagem dos *conexons*, que ocorre pela colisão de dois *conexons*, cada um de uma célula adjacente, enquanto que a alça hidrofílica citoplasmática E2 é responsável pelo fechamento do canal e sinalização intracelular

(CHIPMAN, et al., 2002). A estrutura das conexinas é composta ainda por duas extremidades, uma delas aminoterminal e a outra carboxiterminal (Figura 3).

Fonte: Disponível em: herkules.oulu.fi/html/i1002636.html>

Figura 3 – Topologia da molécula de conexina

2.3 MUTAÇÕES DAS CONEXINAS

Ainda pouco se sabe sobre o impacto nos indivíduos em decorrência das alterações nos genes das conexinas, porém a identificação destas doenças genéticas nos fornece evidências de que a comunicação via CIJG é crucial para o desenvolvimento e funcionamento

de numerosos órgãos (AVANZO, 2005).

Alterações nesses canais podem ser as causas de várias anomalias (Tabela 4), pois algumas evidências e numerosos estudos têm sido realizados com a finalidade de elucidar a relação entre junções intercelulares do tipo *gap* e o crescimento celular (RUCH; TROSKO et al., 1998; YAMASAKI et al., 1999). Diversos trabalhos têm demonstrado que quando algumas células são expostas a fatores de crescimento e a promotores tumorais (condições em que há um aumento da proliferação celular), a capacidade de comunicação através dos CIJG e a expressão das conexinas encontram-se reduzidas (BUNDUNOVA; WILLIAMS et al., 1994; GUAN et al., 1995). Além disso, a maioria das células neoplásicas apresenta níveis alterados de expressão das conexinas e uma redução na capacidade de comunicação por CIJG (YAMASAKI et al., 1999), pois alguns produtos de oncogenes, como as proteínas *src*, *ras* e *neu* reduzem as junções intercelulares tipo *gap* (CHANG et al., 1985; DE FEITJER et al., 1995).

Tabela 4 – Doenças genéticas relacionadas às mutações das conexinas

Gene da Conexina	Doença genética no homem	Referências
Cx 32	Forma ligada ao cromossomo X de Charcot Marie – Tooth.	BERGOFFEN et al., 1993.
Cx 26	Surdez neuro-sensorial não sindrômica; Queratoderma palmoplantar.	KELSELL et al., 1997.
Cx 31	Eritroqueratodermia variabilis; Distúrbios da audição.	RICHARD et al., 1998; Xia et al., 1998.
Cx 50	Catarata zonular pulverulenta.	Shiels et al. 1998.

2.4 O GENE DA CONEXINA 43

O gene da Cx 43, assim como a maioria das conexinas, apresenta uma única região *intrônica* (10,5 kb) separada por 2 *exons*: o *exon* 1, de pequeno tamanho, que corresponde a uma sequência de 5' não traduzida (0,2 kb), é uma região de estabilidade do gene e está relacionada a produção de *CAP*, situado em uma das caudas e responsável pela proteção do RNA m contra a ação de proteases; e o *exon* 2, correspondente à totalidade da sequência codificante por entre sequências 5' e 3', com 10,5 kb, e que apresenta uma região de estabilidade responsável pela produção de poli A, situada na outra ponta da cauda do RNA m, cuja a função é a mesma da *CAP* (Figura 4).

Fonte : (MUNARI-SILEM et al., 1996)

Figura 4 – Desenho esquematizado representando a região codificadora presente no gene da Cx 43

2.4.1 Funções da Conexina 43

Como já fora abordado anteriormente, a conexina 43 apresenta ampla distribuição por quase todos os órgãos dos mamíferos e sua expressão é importante para o bom funcionamento e homeostasia do organismo.

Essa conexina é amplamente encontrada no coração e parece estar diretamente envolvida com o trabalho do miocárdio ventricular, entretanto, outros estudos têm concluído que as células cardíacas que a expressam apresentam uma forma especializada na condução elétrica, fora da zona nodal (SÁEZ et al., 2003). Uma diminuição expressão da cx 43, tanto em humanos, quanto nos animais, tem sido associado à isquemia ou infarto. Estudos têm evidenciado que animais homozigotos com deleção em ambos os alelos (Cx 43 -/-) morrem ao nascerem, devido à má formação ventricular (MONTECINO-RODRIGUEZ et al., 2000).

Estudos com pâncreas *in vitro* têm sugerido que a Cx 43 exerce um importante papel nas células endócrinas e exócrinas, sendo necessária para a produção de insulina (SÁEZ et al., 2003). No útero, essa proteína é abundantemente encontrada entre as células miométricas, o que sugere sua participação na regulação da atividade uterina e sendo claramente expressa na camada elástica das grandes e pequenas artérias musculares, porém ainda não está totalmente clara sua função na angiogênese.

O gene da conexina 43 apresentou um efeito supressor tumoral em várias linhagens de células tumorais (ZHANG et al., 2003), e outros trabalhos que utilizaram animais geneticamente modificados (Cx 43 +/-) têm evidenciado o seu importante papel na regeneração do sistema hematopoiético (MONTECINO-RODRIGUEZ et al., 2000).

2.4.2 A utilização de camundongos geneticamente modificados (Cx 43 +/-)

Algumas linhagens de camundongos deficientes em conexinas específicas têm sido criadas e estão atualmente disponíveis, sendo chamados de heterozigotos (HT) para conexina 43 (REAUME et al., 1995), 32 (NELLES et al., 1996), 37 (SIMON et al., 1997), 40 (KIRCHHOFF et al., 1998), 26 (GABRIEL et al., 1998), 45 (KRUGER et al., 2000). Até agora, a invalidação ou “knock-out” (KN) foi efetuado para pelo menos 6 genes de conexinas diferentes, o que viabilizou a compreensão da participação destas proteínas em diferentes tecidos e patologias.

Estes animais têm contribuído muito para elucidar aspectos da biologia e patologia de vários órgãos, como o fígado (DAGLI et al., 2000), o tecido cardíaco, cerebral (astrócitos) (DERMIETZEL et al., 2000), no miométrio (PETROCELLI et al., 1993) e na tireóide (THIELE et al., 1976), entre outros (WARD et al., 2000).

Um estudo recente utilizando a tecnologia de “knock-in” (KI), consistindo em fazer expressar uma conexina em lugar de outra ao substituir sua seqüência codificadora pela de outra conexina e conservando o mesmo promotor, confirmou que determinadas Cx têm funções comuns (AVANZO, 2005). Isto poderia explicar os fenômenos de redundância funcional observadas nos HT, mas se faz necessária cautela ao analisar este processo, pois uma Cx não pode substituir outra em todos os órgãos, o que, em certos casos, pode levar a perturbações.

Em determinadas ocasiões, os fenótipos obtidos foram os esperados, mas em outras situações, foram decepcionantes. Por outro lado, novas informações sobre a função dos CIJG *in vivo* foram obtidas. Foi desta maneira que a invalidação do gene da Cx 43 mostrou sua função na morfogênese cardíaca, enquanto que a do gene Cx 32 não reproduziu de modo esperado o defeito de mielinização.

2.5 O MODELO EXPERIMENTAL DE OBSTRUÇÃO TOTAL DO COLÉDOCO

Vários autores têm utilizado, desde a década de 60, o mesmo modelo experimental em espécies distintas de animais, explorando a importância do colédoco, após a sua obstrução total, seja por uma causa natural (litíase) ou por qualquer doença provocada experimentalmente, por meio de procedimentos cirúrgicos pertinentes, como a ligação do ducto biliar comum.

Em 1987, Sheridan et al. quantificaram a morbidade e mortalidade de pacientes com litíase biliar, avaliando as consequências dessa doença e verificaram que dos 257 pacientes que se submeteram à cirurgia, 118 deles (46%) desenvolveram complicações, como sepse e problemas cardíaco-respiratórios, sendo que 5 pacientes morreram (1,9%), evidenciando a elevada mortalidade e morbidade, decorrentes do processo obstrutivo. No ano seguinte, Mathie et al. (1988) analisaram a hemodinâmica hepática em cães, após ligação do ducto biliar comum, corroborando com o trabalho de Sheridan (1987). Lai et al. (1991) corroboraram com os estudos anteriores, quantificando a mortalidade e morbidade de pacientes internados com obstrução total do ducto biliar comum.

Clements et al. (1992) operaram ratos, segundo a técnica descrita por Lee et al. (1972) e verificaram que os animais desenvolviam importantes complicações pós-operatórias, como desordem vesicular, sepse e insuficiência renal. Gall e Bhathal (1990) descreveram as alterações histológicas em fígados e vesícula biliar de ratos, após a ligação do ducto biliar comum, durante um período de 6 a 8 semanas.

Factor et al. (1994) verificaram que a ligação do ducto biliar comum em camundongos induz a hiperplasia dos ductos biliares no trato portal, acompanhado pelo desenvolvimento de inflamação portal e fibrose peri-biliar moderada. Gonzáles et al. (2002) em estudo com ratos,

observaram as mesmas alterações, constatando a diminuição das Cx 32 e 26 no fígado e o aumento da Cx 43 nos colangiócitos com a chegada de macrófagos, durante o processo inflamatório e colestase. Prado et al. (2003) utilizando-se do mesmo modelo em camundongos, acompanharam as fases agudas e subagudas da colestase e cirrose. Scott et al. (2003) demonstraram que após o quinto dia da ligação do ducto biliar em ratos, há linfopenia.

2.5.1 Hiperplasia de Ductos Biliares após a Obstrução do Colédoco

Discussões pertinentes a respeito da proliferação dos ductos biliares, a origem dos hepatócitos e células epiteliais biliares (CEB) têm se arrastado por muitos anos. Desde a década de 50, quando Farber et al. (1956) verificaram em fígado de ratos que diversas células epiteliais imaturas, arredondadas, de núcleo oval e citoplasma escasso, aumentavam proporcionalmente à injúria hepática chamando-as de “células ovais”. Entretanto, dois anos mais tarde, Cameron et al. (1958), sugeriram que a proliferação dos ductos biliares estivesse relacionada à “tubularização” das CEB em renovação, formando assim, ductos interlobulares e este fenômeno ocorreria antes de entrar em contato com os hepatócitos, ou seja, no próprio ducto de *Hering*. Segundo ainda o autor, os dados de seu trabalho mostraram que os hepatócitos sofreriam um processo de “transdiferenciação” para células epiteliais biliares. Outra hipótese baseou-se na teoria de que as CEB são derivadas de um processo de modulação dos hepatócitos (LEDUC et al., 1959), baseando-se na aparente falta de atividade mitótica das células epiteliais biliares, em vista do aumento do número destas células e diminuição do número de hepatócitos, sem a adequada evidência de morte celular (JOHNSTONE et al., 1976; MANSENS et al., 1952).

No final da década de 1980, Desmet et al. (1987) sugeriram que os mecanismos de hiperplasia e proliferação dos ductos biliares estivessem relacionados à condição sofrida pela cirurgia, ou seja, numa obstrução completa e aguda do ducto biliar comum, a proliferação dos ductos biliares ocorreria por mitose das CEB pré-existentes, durante a colestase.

Gall e Bhatal (1990) comprovaram, por meio da técnica de imunoistoquímica, que no sétimo dia do procedimento cirúrgico, é possível quantificar um aumento no número dos canais de *Hering* e este fato seria capaz de modular as CEB para contribuir no processo de proliferação do ducto biliar.

Slott et al. (1991) formularam 5 hipóteses: (a) a proliferação biliar, assim como as CEB são produtos da capacidade do epitélio biliar que conserva esta característica; (b) as CEB dividem-se independentemente da extensão do ducto em que estão localizadas e formam um sistema com *lúmen* contínuo com o pré-existente; (c) a proliferação do ducto biliar resulta principalmente de um alongamento e não de uma ampliação circunferencial ou através de brotamento dos ramos de *Hering*; (d) a infiltração de macrófagos na região portal não exerce nenhum papel na reação hiperplásica do ducto biliar, (e) um aumento na pressão biliar é o início do fator da divisão das CEB.

Desde a década de 1990 até a atual, tem sido aceito que o fígado contém células com propriedades das *stem cells*, sendo as mesmas ativadas para se diferenciar em hepatócitos maduros ou em células epiteliais biliares, caso sofram uma circunstância patofisiológica e essas células no fígado foram denominadas anteriormente de células ovais (AI-LAN QIN et al., 2004). Algumas linhas de estudo têm sugerido que as células ovais podem ser células transicionais, uma linhagem de *stem cells* que pode dar origem a hepatócitos maduros em casos de grave injúria hepática, pois são freqüentemente encontradas em estreita associação com células intermediárias, que demonstram tanto características morfológicas de hepatócitos como de CEB, entretanto, não existem evidências conclusivas de que as células ovais são as

células intermediárias que podem dar origem aos hepatócitos (BRAUN et al., 2000).

Factor et al. (1994) verificaram que após a ligação do ducto biliar em ratos há um aumento significativo das células ovais, segundo os autores, essas células, derivadas de células dos ductos biliares terminais, os ductos de *Hering*, que são os responsáveis pela regeneração hepática, pois substituem os hepatócitos mortos e ainda são capazes de formarem ductos em áreas periportais e se distribuírem pelo parênquima.

Paku et al. (2005), afirmaram que a ligação do ducto biliar comum induz uma grande proliferação das CEB. Esta reação é morfológicamente e fenotipicamente muito diferente da proliferação das células ovais, células estas que são simplesmente uma extensão dos ductos biliares e dos ductos de *Hering*. Zhang e Thorgeirsson (1994) observaram *in vivo* e *in vitro* um predomínio da concentração de conexina 43 nas células epiteliais biliares e nas células ovais, porém quando algumas destas células ovais se diferenciavam em hepatócitos, a conexina 43 praticamente deixava de existir, predominando principalmente a conexina 32.

2.6 A MACRO E MICROSCOPIA DO SISTEMA BILIAR E HEPÁTICO

O sistema biliar se compõe de canalículos biliares, ducto cístico, vesícula biliar e ducto biliar comum (colédoco). A bile é inicialmente secretada nos hepatócitos e se desloca para condutos de maior calibre, até chegar ao ducto hepático, onde se une numa forquilha em forma de Y com o ducto cístico, chegando à vesícula biliar. O principal ducto formado pela união dos ductos hepáticos com o ducto cístico da vesícula biliar é o ducto biliar comum (colédoco) (Figura 5).

Fonte: (EVANS; DELAHUNTA, 2001)

Figura 5 – Desenho esquemático da vesícula biliar de cão, que se assemelha à anatomia do camundongo

O fígado é constituído principalmente por células hepáticas ou hepatócitos, células em forma de poliedros, que se agrupam em placas e se anastomosam entre si formando unidades morfológicas chamadas lóbulos hepáticos (Figura 8), que se encostam uns aos outros em quase toda sua extensão. No entanto, em algumas regiões, os lóbulos ficam separados por tecido conjuntivo e vasos, essas regiões ocupam os cantos do poliedro e recebem o nome de espaços-porta.

Cada espaço porta é composto por uma vênula e uma arteríola (ramos da veia porta e da artéria hepática, respectivamente), um ducto biliar, vasos linfáticos e nervos, podendo ser chamada de Triade Portal.

O suprimento sanguíneo no fígado é feito através das vias aferentes, tais como veia porta e artéria hepática, desembocando na veia centrolobular (ramo inicial da veia porta) e de onde parte o sangue do órgão (via eferente) (Figura 6). As veias centrolobulares atravessam os lóbulos em sentido longitudinal e ao saírem, desembocam em ângulo reto nas veias sublobulares (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1997), até desembocarem na veia cava caudal.

Fonte: (BANKS, 1997)

Figura 6 – Desenho esquemático tridimensional de um lóbulo hepático

Entre os hepatócitos existem os canaliculos biliares, que não possuem parede própria e constituem os primeiros locais de armazenamento da bile produzida pelos hepatócitos. Os

canalículos se dirigem do centro para a periferia onde desembocam em um ducto curto denominado ducto de *Hering*. Os ductos biliares gradualmente se alargam até se fundirem, formando o ducto hepático que sai do fígado (Figura 7).

Fonte: (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1995)

Figura 7 – Desenho esquemático tridimensional da estrutura do fígado. CB: canalículo biliar; P: parede de hepatócito; H: ducto de Hering; K: célula de *Kupffer*; En: célula endotelial do sinusóide; L: célula armazenadora de lipídeos ; S: sinusóides

A organização hepática pode ser classificada de três formas diferentes, conforme sua estrutura (lóbulo hepático), sua atividade exócrina (lóbulo portal) e/ou irrigação sanguínea (ácino hepático). O ácino hepático é representado pelas zonas de lóbulos contíguos que são irrigados pelos mesmos vasos interlobulares e podendo ser dividido em três zonas, de acordo com a irrigação sanguínea. A zona próxima à região interlobular (1) tem a melhor irrigação sanguínea, enquanto a zona mais próxima à veia centro lobular (3) tem a irrigação sanguínea mais pobre (Figura 8).

Fonte: (BANKS, 1998)

Figura 8 – Desenho esquemático da organização do tecido hepático de acordo com sua estrutura (lóbulo hepático), atividade exócrina (lóbulo portal) ou irrigação sanguínea (ácino hepático)

2.7 COLESTASE E ICTERÍCIA APÓS A LIGAÇÃO DO COLÉDOCO

Após a obstrução total do ducto biliar comum, no caso desse estudo, induzida experimentalmente por meio de procedimento cirúrgico, ocorre secundariamente um processo patológico no fígado, denominado de colestase que contribui para a disfunção hepática e diminuição de duas conexinas, Cx 26 e 32 (principais Cx encontradas no fígado) no curto intervalo de tempo, porém há um aumento da Cx 43, fato este atribuído à proliferação das células epiteliais biliares (CEB). (GONZÁLES et al., 2002).

A colestase é a situação em que a bile produzida pelo fígado, falha em alcançar o duodeno, ou seja, sua retenção na vesícula biliar por determinado período, acarreta no acúmulo de bilirrubina nos tecidos e lesões hepáticas de diferentes graus e, em longo prazo a Cirrose Biliar Primária se estabelece. O acúmulo de bile na vesícula biliar pode ter origem extra-hepática, refere-se caracteristicamente ao processo obstrutivo mecânico da via biliar extra-hepática, e/ou intra-hepático, que estão relacionadas a um amplo espectro de doenças com lesão a nível biliar intra-hepático ou hepatocelular.

Sob o ponto de vista morfológico, a colestase pode ser definida em três níveis: macroscópico, microscópico e ultraestrutural. Macroscopicamente, a colestase corresponde à coloração verde da superfície externa e de corte do fígado, ou do fragmento da biópsia. Microscopicamente, é caracterizada pela visualização do pigmento biliar no tecido hepático, preparado através do procedimento convencional, para inclusão em parafina. À microscopia eletrônica, a colestase é definida pela presença de alterações típicas ao nível do pólo canalicular do hepatócito, como dilatação do canalículo, diminuição ou distorção das microvilosidades, mesmo na ausência de pigmento biliar detectável ou até mesmo na ausência de colestase clínica, entretanto em alguns modelos de animais, como roedores, não ocorre a

colestase morfológica (LEITÃO et al., 1997).

A permanência da bile na vesícula biliar por um período significativo, pode tornar-se tóxica, induzindo então à necrose celular e promovendo a inflamação do local (HARDISON et al., 1983) e como consequência, a icterícia clínica, evidenciada pela elevação da bilirrubina direta sérica e seu depósito nos tecidos, sendo associada com a profunda mudança no citoesqueleto dos hepatócitos, incluindo a destruição dos canais biliares, quadro esse denominado Cirrose Biliar Primária. A bile é uma mistura complexa de muitos componentes incluindo água, ácidos biliares, lecitina e outros fosfolípidos, colesterol não gorduroso, imunoglobulina A, outros metabólitos e proteínas, esse fluido complexo tem muitas funções benéficas no organismo, como emulsificação de gordura no processo digestório e eliminação dos produtos de desgaste, tais como bilirrubina, colesterol e xenobióticos que são insuficientemente hidrossolúveis para serem excretados pela urina, sua ausência no duodeno acarreta na perda de emulsificação anti-endotóxica, gerando um *pool* de endotoxinas por todo duodeno, sendo absorvida pelo sistema porta. A secreção da bile normalmente depende do funcionamento de um grande número de sistemas de transporte nos hepatócitos e células epiteliais do ducto biliar (colangiócitos ou CEB). A diminuição de conexinas nos hepatócitos de ratos submetidos à cirurgia, também pode estar relacionada ao acúmulo do efeito tóxico da bile (TRAUNER et al., 1998). A colestase induzida experimentalmente nos camundongos acarreta na desestruturação da integridade funcional dos CIJG, levando ao aumento da permeabilidade paracelular, regurgitação de constituintes biliares no plasma e a diminuição do transporte de cálcio entre os hepatócitos (TRAUNER et al., 1998), a sinalização intracelular de AMPc também é prejudicada, contribuindo para diminuição de efeitos “estimulatórios” do glucagon e peptídeos vasoativos intestinais, na secreção biliar.

A Figura 9 (A) esquematiza os hepatócitos normais, evidenciando os CIJG, que facilitam a comunicação intercelular (exemplo: difusão de segundos mensageiros e

propagação de ondas de Ca^{2+}) e as *tight junctions*, que previnem a regurgitação de constituintes biliares no plasma, formando uma barreira e evitando a passagem de macromoléculas. Durante o processo de colestase, representado pela Figura 9 (B), os hepatócitos caracterizam-se pela perda dos CIJG.

Fonte: (TRAUNER et. al., 1998)

Figura 9 – Desenho esquemático representando o contato entre duas células hepáticas adjacentes, em dois momentos distintos. (A) Hepatócitos normais. (B) Hepatócitos durante o processo de colestase

2.8 ICTERÍCIA APÓS O PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

A palavra icterícia significa amarelo, amarelento, através de variações do latim *icterus*, que, por sua vez, tem origem no grego *ikteros*. Na língua inglesa, o equivalente assume a forma *jaundice*, variante de *jaunis*, derivação do francês antigo *jaunice*, que se originou do latim *galbus*, *galbinus*. Ambos caracterizam a condição de coloração amarelada do plasma, pele e mucosas, determinada pelo acúmulo dos pigmentos biliares.

Um breve relato sobre o metabolismo dos pigmentos biliares revela a produção de bilirrubina como produto final da degradação da heme, componente da hemoglobina, e em menor parte formada a partir da degradação de outros complexos protéicos. A bilirrubina é transportada pela albumina até o fígado, onde é recolhida pelos hepatócitos, por um processo chamado de captação. Após sua entrada na célula, a bilirrubina é conjugada e excretada através do pólo biliar do hepatócito, em íntimo contato com canalículos biliares, sendo excretado para o duodeno, pelo o colédoco, e será desconjugado e reduzido no cólon, formando os uribilinogênios. Estes são excretados nas fezes e uma pequena parte é reabsorvida, voltando ao fígado pelo sistema porta, constituindo o ciclo enteropático da bilirrubina (TEIXEIRA et al., 1997).

A icterícia pode ser evidenciada na pele, nas aurículas, na esclera, língua e outros locais ricos em elastina devido à grande capacidade de impregnação do pigmento biliar e ocorre quando há algum obstáculo ao livre fluxo de bile entre o sítio produtor (hepatócitos) e duodeno, levando a efeitos deletérios não só para a célula hepática como para todo o sistema imunológico (TEIXEIRA et al., 1997).

2.9 A PROTEÍNA PCNA

Para qualificação das células hepáticas em proliferação, fora utilizada a técnica de *western blot* para verificar os níveis de proteína de PCNA (*Proliferation Cell Nuclear Antigen*) em ambos os grupos de camundongos, homozigotos para conexina 43 (Cx 43 +/+) ou selvagens (SV) e heterozigotos para conexina 43 (Cx 43 +/-) ou heterozigotos (HT). Entretanto, apenas no tempo de 48 horas, período este em que se inicia a formação de novos vasos e a hiperplasia do ducto biliar. Essa é uma técnica qualitativa e não quantitativa, pois vai demarcar a concentração protéica entre os animais SV e HT, ou seja, o grupo que apresentar maior concentração de bandas protéicas, significa que há maior proliferação celular.

O PCNA é uma proteína com peso molecular de 29 kDa formada por 261 aminoácidos nucleares, sintetizada durante a fase S do ciclo celular (BRAVA; CELIS, 1980), sendo descoberta no início da década de 80 e recebeu esse nome por ter sido observada em núcleos de células em divisão. Sugere-se que essa proteína esteja envolvida no reparo e replicação do DNA e devido a sua participação na montagem de cromatina ela também pode estar envolvida na transcrição de RNA e proliferação celular.

3 OBJETIVOS

O enfoque principal do objetivo foi comparar a hiperplasia dos ductos biliares em dois grupos geneticamente diferentes de camundongos, após a ligação do ducto colédoco.

3.1 OBJETIVO GERAL

Comparar a proliferação dos ductos biliares no trato portal, a proliferação celular entre os grupos de camundongos heterozigotos Cx 43 +/- ou HT e selvagens Cx 43 +/+ ou SV, após a obstrução cirúrgica do ducto biliar comum (ducto colédoco) durante os tempos experimentais (48 horas, 7 e 14 dias).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Aproveitou-se o campo microscópico para quantificação das estruturas hepáticas e acompanhar as áreas de necrose e fibrose ocorridas durante o período pós-cirúrgico, com posterior utilização da técnica de *western blot PCNA* para marcação da proliferação dos hepatócitos e células epiteliais biliares, no período de 48 horas.

3.2.1 Quantificação das Estruturas Hepáticas

Pretende-se quantificar as cinco estruturas hepáticas, hepatócitos, ductos biliares, vênulas, arteríolas e veias centrolobulares, comparando-se a evolução da inflamação portal e fibrose peri-biliar, por meio do Sistema de Análise de Imagem Computadorizado – *Image Pro Plus*, versão 4.5 (*Media Cybernetics – EUA*) de ambos os grupos de camundongos, HT e SV submetidos ao procedimento cirúrgico.

3.2.2 Utilização do *western blot* para PCNA

Pretende-se avaliar, pela técnica de *western blot* a expressão da proteína associada à proliferação celular *PCNA* (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*) dos tecidos hepáticos e biliares dos camundongos Cx 43 +/- e Cx 43 +/+, submetidos à ligação do ducto biliar comum (ducto colédoco) somente no período de 48 horas, quando se inicia a vascularização.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Utilizaram-se camundongos de diferentes genótipos, identificados de acordo com as técnicas pertinentes e submetidos ao procedimento cirúrgico e eutanasiados em tempos distintos, de acordo com os dados de literatura.

4.1 CAMUNDONGOS

Os camundongos heterozigotos para a Cx 43 foram originalmente estabelecidos por Reaume et al. (1995) e comprados dos Laboratórios Jackson (Paris) pela *International Agency for Research on Cancer (IARC)*, Lyon, França. Foram gentilmente doados pelo Dr. Hiroshi Yamasaki (*Kanagwa* – Japão) ao Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, em cujo Biotério se encontram atualmente, sob condições pré-estabelecidas pelo mesmo. O *background* genético original destes camundongos é proveniente da linhagem C57BL/6, a qual foi cruzada com camundongos CD1 para gerar camundongos heterozigotos para Cx 43 (Cx 43 +/-) com *background* genético da linhagem CD1.

Camundongos machos, Cx 43 ++ foram cruzados com fêmeas cx 43 +/- ou machos cx 43 +/- foram cruzados com fêmeas Cx 43 ++ no Biotério do Departamento de Patologia (FMVZ/USP). Todos os camundongos foram mantidos em gaiolas de polipropileno nas dimensões de 30x20x13 cm e de 49x34x16 cm, com filtro em sua parte superior, para lotes de 5 e 20 camundongos, respectivamente. As gaiolas encontravam-se forradas com cama de maravalha de pinus autoclavada e era trocada em intervalos de 2 e 3 dias. A ração comercial para camundongos, da

marca Nuvilab - CR1 e água filtrada e autoclavada foram fornecidas *ad libitum*, durante todo o período experimental. Os camundongos ficaram alojados separadamente em uma sala do Biotério do Departamento de Patologia, de acordo com as normas da Comissão Interna de Biossegurança da FMVZ - USP para a manutenção de camundongos geneticamente modificados.

A sala do Biotério possui controle de temperatura ($22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) e umidade relativa do ar (45 a 65%), sua iluminação é controlada por temporizador com ciclo de 12 horas de claro e 12 horas de escuro. A inspeção dos camundongos foi acompanhada diariamente.

4.1.1 Identificação dos Animais

Os camundongos foram desmamados com 27 e 28 dias de idade e identificados através de marcação auricular, com auxílio de furador de orelha (Figura 10).

Figura 10 – Representação esquemática do padrão de marcação, identificação auricular, utilizado para individualizar os camundongos

4.2 CERTIFICADO DE BIOSSEGURANÇA E NORMAS PARA MANUTENÇÃO E TRABALHOS COM ANIMAIS GENETICAMENTE MODIFICADOS

O Biotério do Departamento de Patologia da FMVZ – USP, bem como o Laboratório de Oncologia Experimental, possuem extensão do certificado de biossegurança da FMVZ USP (CQB no. 100/99), estando de acordo com as informações da Comissão Interna de Biossegurança (CIBio), com base na instrução normativa da CTNBio no.12, publicada no Diário Oficial da União no. 100-E, de 28 de maio de 1998, Seção 1, páginas 10-12. Os animais ficaram alojados em sala isolada e devidamente identificados na área de criação do Biotério da FMVZ - USP, que foi especialmente preparada para recebê-los, onde permaneceram em caixas com filtro apropriadas, sendo vedadas todas as passagens possíveis de insetos e animais externos.

4.3 GENOTIPAGEM

Para genotipagem dos camundongos, um fragmento de cerca de 1 cm oriundo da cauda foi digerido em 0,7 ml de tampão de extração (NaCl 0,1M, tris-HCl 0,05 M, EDTA 0,1M, 0,49 mg de protease K por ml, SDS 1%) à 37°C durante uma noite para extração do DNA. Após a agitação, foi adicionado 0,25 ml de NaCl 5M, homogeneizado e as amostras centrifugadas a 15.000 rpm. Cerca de 0,7 ml da fase aquosa foi transferido para um novo tubo e adicionou-se 0,5 ml de isopropanol para que precipitasse o DNA. Após a centrifugação, o DNA foi lavado com etanol 70% e dissolvido em 0,5 ml de TE para posterior análise por PCR com *prímers* para os

genes como descrito previamente: Cx 43 senso 5'CCCCACTCTCACCTATGTCTCC3' e anti-senso 5'ACTTTTGCCGCCTAGCTAGCTATCCC3'; neo-senso 5'GGGCCACAGTCGATGAATCCAG 3' e anti-senso 5'TATCCATCTGGCTGATGCAA 3' (YAMAKAGE et al., 1998). A reação da polimerase em cadeia (PCR) foi realizada durante 1 ciclo, na condição de 94° C por 2 minutos, 35 ciclos à 94°C por 30s, 55° por 1 minuto, 72°C por 4 minutos, 1 ciclo à 72°C por 4 minutos e 1 ciclo à 4°C por 60 minutos. O DNA amplificado foi submetido à eletroforese em gel de agarose e posteriormente tratado com brometo de etídio. As bandas correspondentes ao gene da conexina 43 (SV) e neo foram posicionadas em 600 e 400 pares de base respectivamente.

4.4 ESCOLHA DO TEMPO EXPERIMENTAL

O tempo experimental utilizado nesse trabalho foi inspirado na literatura de Gall e Bhathal (1990) que utilizaram o mesmo modelo experimental em ratos, avaliando as alterações histológicas hepáticas em diferentes intervalos cirúrgicos até 50 dias.

Segundo os autores, no período de 48 horas, após a obstrução total do ducto biliar comum (ducto colédoco), a arquitetura lobular do fígado permanece preservada, porém, já é possível visualizar a hiperplasia dos ductos biliares, durante o período de 7 dias a hiperplasia dos ductos se apresenta mais evidente, e no último tempo experimental, ou seja, no 14 ° dia intensificam-se as áreas de necrose focais, entretanto, a arquitetura dos ductos biliares permanecem preservadas. Os mesmos autores referem que no 21 ° dia, inicia-se o processo de cirrose do fígado com suas devidas consequências histológicas, haja em visto, que os animais não agüentariam um tempo superior a 14 dias, em decorrência do pós-operatório.

4.5 MODELO EXPERIMENTAL

Os camundongos foram separados em 2 grupos de acordo com os genótipos e eutanasiados em três intervalos pós – cirúrgicos distintos, tais como 48 horas, 7 e 14 dias. Os camundongos homozigotos para Cx 43 +/+, foram chamados de selvagens (SV) ou grupo controle e os animais heterozigotos para Cx 43 +/- foram chamados de heterozigotos (HT).

O procedimento cirúrgico com a ligação do ducto biliar comum (ducto colédoco) foi realizado nos camundongos conforme as técnicas previamente descritas (FACTOR et al., 1994; GALL; BHATHAL 1990; PRADO et al., 2003) salvo algumas modificações (Figuras 12 - A, B, C e D) e tais procedimentos foram realizados na sala de cirurgia do Departamento de Patologia VPT FMVZ - USP (Figuras 11 - A e B).

Os animais foram anestesiados com Xilazina (25 mg/kg) (IM) e Quetamina (50 mg/kg) (IM), diluídos em 8,5 ml de solução salina a 0,9 %. Após a indução anestésica, os mesmos eram posicionados em decúbito dorsal em mesa cirúrgica apropriada, era feita a assepsia do abdome e em seguida realizou-se a incisão de aproximadamente 2 cm envolvendo a pele da região abdominal, com divulsão até a exposição da musculatura abdominal. O fígado foi delicadamente deslocado cranialmente com auxílio de uma compressa de gaze estéril, para localização do colédoco, que foi exposto e ligado com auxílio de fio de seda (3.0). A musculatura abdominal e a pele foram suturadas com fio de Nylon (3.0) e pontos simples separado (Figura 12 - C). Objetivando-se alcançar maior grau de analgesia, durante o pós-operatório, fora aplicado Buprenorfina (0,005 mg/kg) (IM) em todos os animais.

Figura 11 – (A) Sala cirúrgica do Departamento de Patologia VPT – FMVZ/USP, onde foram realizados os procedimentos cirúrgicos nos camundongos. (B) Mesa cirúrgica com material previamente esterilizado e organizado para início dos procedimentos cirúrgicos

Figura 12 - Procedimento cirúrgico realizado nos camundongos. (A) Isolamento do colédoco com uma pinça anatômica curva. (B) Ligação do ducto colédoco com fio de nylon 3.0. (C) Sutura da musculatura abdominal com fio de nylon 3.0. (D) Aquecimento dos camundongos, com lâmpada incandescente, após o procedimento cirúrgico

4.6 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os camundongos selecionados para compor os grupos experimentais desse estudo preencheram os critérios de homogeneidade estabelecidos, tais como fêmeas, com idade adulta, pesando em média 35 gramas e mostraram adequação para responder as hipóteses formuladas e todos eles foram avaliados clinicamente e acompanhadas diariamente durante período de pós-operatório. Os animais eram pesados no dia da cirurgia e no dia da eutanásia, para análise da evolução ponderal.

O critério utilizado na seleção dos casos foi essencial para formar o corpo de dados consistente para ser analisado, ou seja, para obedecerem aos critérios de inclusão e exclusão, os animais mortos antes de completarem os tempos pós-cirúrgicos estabelecidos previamente (48 horas, 7 e 14 dias), não foram incluídos na estatística, pois os mesmos morriam 24 ou 48 horas antes de cada tempo experimental pré-estabelecido e geralmente de madrugada, inviabilizando a coleta do material no instante do óbito. Entretanto, evitou-se utilizar materiais que não condissessem com o estado clínico e físico reais dos animais para não comprometer os objetivos e resultados do trabalho.

4.7 COLETA DO MATERIAL

Os camundongos foram eutanasiados com a administração de pentobarbital (50mg/kg), via intraperitoneal e após a eutanásia, os mesmos foram imediatamente pesados e em seguida tiveram seus fígados retirados, pesados separadamente para análise do peso relativo (peso fígado / peso corpóreo) (Figura 20). Fragmentos de cada lobo do órgão foram colhidos e fixados em methacarn (60% metanol, 30% de clorofórmio e 10% de ácido acéticoglacial), desidratado em álcool etílico em concentrações crescentes (70% até álcool absoluto), diafinizando em xilol, impregnado por parafina líquida e finalmente, incluído em parafina. Os blocos de parafina, de forma regular, foram cortados em micrótomo, obtendo-se cortes de 5 µm de espessura, os quais foram, subsequente, corados pela hematoxilina-eosina (JUNQUEIRA, 1995). O restante do tecido hepático foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido e conservado a – 80 °C até a realização do método de *western blot PCNA*.

4.8 ANÁLISE MACROSCÓPICA

Todos os camundongos eutanasiados durante os tempos experimentais, foram submetidos a necrópsia completa, onde se examinou as vísceras torácicas e abdominais, especialmente o fígado e seu sistema biliar extra-hepático, alvo de nosso estudo.

4.9 ANÁLISE MICROSCÓPICA

Após a preparação das lâminas, as alterações hepáticas foram avaliadas em todos os camundongos nos três tempos experimentais e as seguintes estruturas hepáticas: hepatócitos, ducto biliar, vênulas, arteríolas e veia centrolobular. A presença de sinais de necrose celular e fibrose foram avaliadas com relação à ocorrência ou não do evento.

4.10 ANÁLISE MORFOMÉTRICA

A análise morfométrica dos fragmentos do fígado foi efetuada nos dois grupos (SV e HT), utilizando o software para Análise de Imagem - *Image Pro Plus*, versão 4.5 para Windows, edição 2002, para tanto, o espaço porta era centralizado e as estruturas hepáticas ao seu redor, quantificadas. Esse trabalho teve como foco para quantificação das estruturas hepáticas o ponto de vista da atividade exócrina (lóbulo portal) tendo o espaço porta como à região central e isto nos serviu de critério de homogeneidade, pois os campos microscópicos de todas as lâminas tiveram o espaço porta como centro de referência.

Foram capturados aleatoriamente de 4 a 8 campos sequenciais por fragmento de fígado e em cada campo capturado, fora aplicado um gradículo de 33 x 33 mm para a contagem dos hepatócitos, sendo considerados apenas as células sob as intersecções. Com o auxílio de um marcador, fornecido pelo Sistema de Imagem (Figura 13), os hepatócitos eram demarcados e as outras estruturas hepáticas foram quantificadas independentemente da aplicação do gradículo, ou

seja, não foi considerado o posicionamento em relação às intersecções. Para critério de homogeneidade, foram contabilizados 40 gradículos na posição horizontal e 30 gradículos na vertical, no total de 1200 gradículos por campo. Após a contagem de cada campo, foi calculada a média por lâmina e em seguida a média geral das estruturas em cada grupo, nos três tempos experimentais.

Figura 13 - Representação dos gradículos utilizados pelo Sistema de Imagem *Image Pro Plus*. Os hepatócitos foram identificados, com auxílio de um marcador (círculos amarelos) nas intersecções. Essa representação não retrata o tamanho exato dos gradículos e do marcador

4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para acompanhamento do sofrimento físico dos camundongos e no intuito de se poder relacionar o sinal físico e clínico aos genótipos distintos, utilizou-se o teste ANOVA duas vias (Análise de variância de duas vias, com nível de significância de 5 %) para análise da evolução ponderal dos camundongos (média do peso no dias da cirurgia - dia da eutanásia), do peso relativo do fígado (peso do fígado / peso corpóreo do camundongo) e para as cinco estruturas hepáticas.

Para análise da densitometria das bandas de *western blot* - *PCNA* realizada nos dois grupos de camundongos, utilizou-se o teste t (não pareado). Entretanto, nos casos em que houve diferenças entre os genótipos, o mesmo foi utilizado como pós-teste, ou seja, após a utilização da ANOVA, em algumas circunstâncias, o teste t (não pareado) serviu para especificar em que tempo experimental ocorreu essa diferença.

Devido ao fato de se tratar de dois grupos de animais, SV e HT eutanasiados em três tempos experimentais distintos, (48 horas, 7 e 14 dias), trabalhou-se com o método ANOVA de análise estatística. Entretanto, o teste t (não pareado) avaliou as diferenças quanto à concentração protéica somente no período de 48 horas, entre os camundongos SV e HT e o mesmo ainda foi utilizado como pós-teste. Pelo fato desse estudo ter trabalhado estatisticamente somente com os animais que foram eutanasiados, ou seja, os que morreram antes de completarem o tempo experimental pré-estabelecido, não fizeram parte da estatística, portanto, utilizou-se o teste não pareado.

4.12 WESTERN BLOT - PARA AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE PROTEÍNA PCNA

Para avaliar os efeitos do modelo sobre a proliferação celular no fígado dos camundongos SV e HT submetidos ao processo cirúrgico, foi utilizada a técnica de *western blot* para a detecção da proteína associada à proliferação celular *PCNA* (*Proliferating cell nuclear antigen*). Para tanto, fora realizado somente no período de 48 horas da intervenção cirúrgica, período este em ocorre o pico de proliferação celular e se inicia a formação de novos vasos e hiperplasia de ductos biliares.

4.13 TÉCNICA DO WESTERN BLOT PCNA

Foi feita a extração das proteínas das culturas a serem analisadas, aproximadamente 40 mg de tecido hepático ou células foram homogeneizados num tampão contendo 60mM Tris-HCl, pH 6.8, SDS a 2%, glicerol a 12%, ditioneitol 0.1M e fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) 1mM. A concentração de proteínas neste homogenato foi determinada utilizando-se o kit da Bio-Rad® e a leitura realizada em espectrofotômetro a 595 nm. As proteínas foram resolvidas em eletroforese num gel de poliacrilamida a 12% em dodecil sulfato de sódio (SDS) e transferidas durante toda à noite, a 30V, para membranas de difluoreto de polivinilideno (PDVF). Para a marcação da proteína *PCNA* foi utilizado anticorpo monoclonal anti-*PCNA* (*Proliferating Cell Nuclear Antigen* -DAKO-PCNA, PC, 10) e diluídos em solução de PBS contendo 5% de leite desnatado e aplicados sobre as membranas, incubadas por 2 horas em temperatura ambiente.

Após a incubação com anticorpos de cabra anti-coelho ou cabra anti-camundongo conjugados com peroxidase, a reação será revelada com uma solução contendo diaminobenzidina (*Sigma Aldrich*), sulfato de níquel e peróxido de hidrogênio. A intensidade de marcação será quantificada em sistema *Image Master* (*Amersham Pharmacia Biotech*).

5 RESULTADOS

Os resultados foram analisados conforme os dados obtidos na reação de PCR, sobrevivência após o procedimento cirúrgico, evolução ponderal, peso relativo do fígado, com exames macro e microscópicos, com posterior avaliação estatística pela análise Anova duas vias, sendo apenas a técnica de *western blot PCNA* avaliada pelo test t (não pareado).

5.1 REAÇÃO DA POLIMERASE EM CADEIA (PCR)

Para identificação do genótipo dos camundongos utilizados nesse trabalho, utilizou-se a técnica de PCR (Figuras 14 A e B).

Figura 14 – (A e B) Foto escaneada com genotipagem dos camundongos heterozigotos e selvagens utilizados no experimento, pela técnica de PCR. Nos animais geneticamente modificados (HT) aparecem 2 bandas, uma correspondente ao gene da Cx 43 e a outra ao gene neo, enquanto que nos animais controle (SV) aparece apenas 1 banda evidente, correspondente ao gene da Cx 43

5.2 SOBREVIVÊNCIA APÓS O PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

No início do projeto, estavam previstas as utilizações de 106 animais (aproximadamente 48 selvagens e 58 heterozigotos), entretanto apenas 43 camundongos sobreviveram aos intervalos cirúrgicos pré-estabelecidos, sendo esses: 17 HT e 14 SV eutanasiados 48 horas após a intervenção cirúrgica; 3 HT e 4 SV eutanasiados no 7 ° dia após a cirurgia e 4 HT e 2 SV eutanasiados no 14 ° dia (Tabela 5).

Vinte e quatro horas após a cirurgia, as condições clínicas e físicas da maioria dos animais era muito crítica, tais como perda de peso, prostração, icterícia (incluindo aurículas e cauda) (Figuras 15 A e B), a urina apresentou odor forte e concentrada. Os sinais clínicos observados são semelhantes aos descritos em outros trabalhos, tais como Canbay et al. (2002); Prado et al. (2003) e Ueno et al. (2004).

Figura 15 – (A e B) Camundongo SV no 7 ° dia após o procedimento cirúrgico. Animal prostrado e icterícia discreta da cauda e aurículas

Curiosamente, no período de 48 horas, 5 camundongos dos 30 eutanasiados, não perderam peso, entretanto, os sinais clínicos eram semelhantes aos demais. Os animais HT perderam em média 3,1 gramas, enquanto que os animais SV perderam 3,3 gramas, em apenas 48 horas após a cirurgia. No período de 7 dias, todos os camundongos emagreceram, sendo que o grupo HT perdeu 11,4 gramas e os animais SV perderam 5,9 gramas, pontuando uma média de perda de 8,7 gramas. No último tempo experimental, 14 dias, os animais perderam menos peso, ou seja, o grupo HT perdeu 3,4 gramas, enquanto que os animais SV perderam 4,05 gramas, pontuando uma média de perda de 3,7 gramas (Tabela 11).

Todos os animais submetidos ao processo cirúrgico foram acompanhados diariamente, porém não eram pesados, e o critério utilizado para eutanásia dos animais no período de 7 dias baseou-se na condições clínicas e físicas dos mesmos, ou seja, os camundongos que aparentemente não resistiriam até o período de 14 dias, foram separados e eutanasiados no 7^o dia, com exceção daqueles que eutanasiados no período de 48 horas. Contudo, muitos animais morreram antes de completarem 7 e/ou 14 dias, não sendo incluídos na estatística, como já fora mencionado anteriormente.

As causas *mortis* foram atribuídas ao procedimento anestésico, a hemorragia e sepse decorrente da colestase ou manipulação cirúrgica (Tabela 6), entretanto, as causas do óbito não foram diferenciadas entre colestase, infecção hepática e/ou sepse, não foi possível determinar exatamente as causas clínicas e os animais não foram submetidos a exames laboratoriais, pois a *causa mortis* não foi alvo de nosso estudo. Baseado nas avaliações físicas, clínicas e data dos óbitos dos animais, foi possível afirmar que os períodos mais críticos giraram em torno do 6^o dia, período este onde se pontuou maior índice de óbitos e 12^o dia (Tabela 6).

Tendo sido proposto em nosso estudo que alguns camundongos do grupo (HT e SV), nos períodos experimentais de 7 e 14 dias, apresentaram sinais macro e microscópicos de colestase,

ainda assim, os mesmos apresentaram sinais semelhantes a sepse, infecção hepática e/ou colangite decorrentes da colestase ou manipulação cirúrgica, não nos permitindo diferenciar as causas.

Após a eutanásia, os animais tinham seus fígados retirados para análise do peso relativo (Tabela 8) e eram congelados a -80°C para realização do método de *western blot PCNA*.

Tabela 5 – Porcentagem de óbitos observados nos camundongos HT e SV submetidos à obstrução total do colédoco nos diferentes tempos experimentais de 48 horas, 7 e 14 dias

Período Experimental	HT			SV		
	N inicial	N final	% de óbitos	N inicial	N final	% de óbitos
48 horas	19	17	10,53 %	17	14	17,65 %
7 dias	20	3	85 %	17	4	76,47 %
14 dias	19	4	78,95 %	14	2	84,62 %

Tabela 6 – Causas de óbitos dos camundongos HT e SV em três tempos diferentes

Período Experimental	Causas de óbito dos camundongos		HT e SV
	anestesia	hemorragia	sepse
até 48 Horas	3	2	-----
4 ° e 6 ° Dia	-----	-----	37
10 ° e 12 ° Dia	-----	-----	33

5.3 EVOLUÇÃO PONDERAL

Para avaliação do estado físico dos camundongos, acompanhou-se a perda de peso entre o dia da cirurgia e da eutanásia, sendo este período denominado de evolução ponderal.

Tabela 7 - Média e desvio padrão da evolução ponderal entre os camundongos HT e SV durante os tempos experimentais

Tempo Pós-cirúrgico	Média $\pm$ desvio padrão da Evolução Ponderal			
	HT		SV	
48 Horas	(n=16)	1,77 $\pm$ 2,28	(n=14)	1,85 $\pm$ 3,44
7 Dias	(n=4)	11,3 $\pm$ 6,13	(n=2)	11,2 $\pm$ 1,55
14 Dias	(n=3)	3,37 $\pm$ 1,92	(n=4)	4,05 $\pm$ 1,69

Figura 16 – Média da perda de peso dos camundongos (SV e HT), durante os períodos experimentais. Não houve diferença significativa quanto ao genótipo ($P = 0,8628$), porém o tempo experimental mostrou diferença significativa ($P < 0,0001$), segundo a análise estatística ANOVA de duas vias

5.4 ASPECTOS MACROSCÓPICOS

Os peritôneos parietal e visceral dos camundongos nos períodos mais crônicos, entre 7 e 14 dias, apresentaram-se icterícos (Figura 17). A vesícula biliar apresentou sinais evidentes de aumento de volume (Figuras 18 e 19 B e C) e o colédoco edemaciado, o que não ocorreu no período de 48 horas (Figura 18 A).

A maioria dos camundongos eutanasiados no 7 ° e 14 ° dias apresentou sinais macroscópicos característicos e sugestivos de colestase e/ou sepse, tais como microabscessos hepáticos e hepatomegalia. Entretanto, alguns camundongos no 14 ° dia apresentavam o fígado túrgido, cujo lóbulo com discreta icterícia, opaco e de consistência dura (Figura 19 C).

Na figura 19 D, nota-se o fígado de camundongo HT não submetido ao processo cirúrgico, pode-se observar a coloração rósea do tecido hepático, tamanho discreto do mesmo e de aspecto brilhante.

Figura 17 – Camundongo HT eutanasiado no 7 ° dia do procedimento cirúrgico. Nota-se icterícia dos peritôneos parietal e visceral no círculo amarelo

Figura 18 – Camundongo SV eutanasiado no 7 ° dia do procedimento cirúrgico. É possível verificar no círculo amarelo, a vesícula biliar aumentada de volume

Figura 19 – Fígados de camundongos. (A) Camundongo SV eutanasiado 48 horas após o procedimento cirúrgico, a vesícula biliar encontra-se discretamente repleta. (B) Fígado de camundongo HT eutanasiado 7 dias após o procedimento cirúrgico, é possível visualizar a vesícula biliar dilatada. (C) Fígado de camundongo HT eutanasiado no 14 ° dia do procedimento cirúrgico. (D) Fígado de animal SV não submetido ao processo cirúrgico. Visualiza-se a coloração do fígado rósea clara, com consistência e tamanho normais e o mesmo se estendeu à vesícula biliar

5.5 PESO RELATIVO DO FÍGADO

Comparou-se o peso relativo do fígado (peso do fígado do animal / peso corpóreo do animal no dia da eutanásia) entre os dois animais, durante os tempos experimentais.

Tabela 8 – Média e desvio padrão do peso relativo entre os animais HT e SV nos três tempos experimentais

Tempo pós cirúrgico	Média $\pm$ desvio padrão do Peso Relativo dos camundongos	
	HT	SV
48 Horas	(n=16) 6,37 $\pm$ 0,86	(n=14) 6,36 $\pm$ 1,05
7 Dias	(n=4) 8,37 $\pm$ 1,73	(n=2) 9,74 $\pm$ 2,19
14 Dias	(n=3) 7,71 $\pm$ 1,77	(n=4) 11,9 $\pm$ 0,88

Figura 20 – Média do peso relativo entre os animais HT e SV durante os tempos experimentais. Houve diferença significativa quanto ao genótipo ($P = 0,0003$) e tempo ($P < 0,0001$) pela ANOVA de duas vias. No tempo de 14 dias houve diferença quanto ao genótipo (teste t não pareado) $P = 0,0086$

5.6 ASPECTOS HISTOPATOLÓGICOS

No período de 48 horas, observaram-se entre alguns animais HT e SV, pequenos focos com áreas de necrose distribuídas aleatoriamente, durante o mesmo período, não se evidenciaram células inflamatórias (polimorfonucleares) no tecido hepático desses animais.

Nos períodos experimentais posteriores, ou seja, 7 e 14 dias, observaram-se áreas de necrose mais extensas (Figuras 21 A, B e 22 A, B) com a presença de infiltrados inflamatórios, (células polimorfonucleares) (Figura 23), entretanto, a arquitetura lobular se manteve preservada, não sendo compatível com o quadro de cirrose hepática.

Nos três tempos experimentais, foi possível visualizar a hiperplasia de ductos biliares, após os procedimentos cirúrgicos (Figuras 24, 25 e 26), porém a figura 27 demonstra um fígado de camundongo HT, que não foi submetido ao procedimento cirúrgico, sendo possível visualizar os ductos biliares sem quaisquer sinais de hiperplasia.

Embora tenha sido quantificada, a veia centrolobular não está presente no campo microscópico das figuras 24, 25, 26 e 27 por se tratar de uma estrutura central e o espaço porta, alvo de nossa análise, se encontra na periferia do lóbulo hepático, portanto, o aumento utilizado para melhor visualização das hiperplasias dos ductos biliares, não abrangeu a veia centro lobular.

Figura 21 – Aspecto histológico do fígado de camundongos submetidos ao modelo de obstrução do colédoco. (A) Fígado de camundongo HT, eutanasiado 7 dias após a cirurgia. Observa-se extensa área de necrose no círculo preto. (B) Fígado de camundongo SV, eutanasiado no mesmo período. Observam-se dois pontos de necrose nas áreas circuladas. Lâminas coradas por H.E. Aumento de 20 X

Figura 22 – Aspecto histológico do fígado de camundongos submetidos ao modelo de obstrução do colédoco. (A) Fígado de camundongo HT eutanasiado 14 dias após a cirurgia. Observam-se extensas áreas de necrose no centro do círculo. (B) Fígado de camundongo SV eutanasiado no mesmo período. Observam-se áreas de necrose no círculo preto. Lâminas coradas por H.E. Aumento de 20 X

Figura 23 – Aspecto histológico do fígado de camundongos submetidos ao modelo de obstrução do colédoco. (A) e (B) Camundongos SV e HT eutanasiado no 7º dia. (C) e (D) Camundongos HT e SV eutanasiados no 14º dia. É possível visualizar na ponta das setas pretas, células inflamatórias polimorfonucleares (neutrófilos). Lâminas coradas por H.E. Aumento de 40 X

Figura 24 – Aspecto histológico do fígado de camundongos submetidos ao modelo de obstrução do colédoco. (A) Camundongo HT, eutanasiado 48 horas após a cirurgia. Nota-se 2 vênulas (seta preta), uma delas no centro do campo microscópico, 2 ductos biliares maduros (seta amarela). (B) Camundongo SV, eutanasiado no período de 48 horas. Nota-se a vênula no centro (seta preta), ductos biliares maduros (seta amarela) e 1 arteríola (seta azul). Lâminas coradas por H.E. Aumento de 10X

Figura 25 – Aspecto histológico do fígado de camundongos submetidos ao modelo de obstrução do colédoco. (A) Camundongo HT eutanasiado no 7 ° dia após a cirurgia. Nota-se vênula (seta preta) com 3 ductos biliares maduros ao redor (seta amarela). (B) Camundongo SV, no 7 ° dia após a cirurgia. Nota-se 1 vênula no centro (seta preta), com 3 ductos biliares (seta amarela) ao redor. Lâminas coradas por H.E. e aumento de 10 X

Figura 26 - Aspecto histológico do fígado de camundongos submetidos ao modelo de obstrução do ducto colédoco. (A) Camundongo KN, eutanasiado no 14 ° dia após a cirurgia. Nota-se 2 vênulas (seta preta) com 3 ductos biliares (seta amarela) e 2 arteríolas (seta azul). (B) Camundongo WT eutanasiado no 14 ° dia após a cirurgia. Nota-se 4 vênulas (seta preta), 5 ductos biliares (seta amarela) e 2 arteríolas (seta azul). Lâminas coradas por H.E. e aumento de 10 X

Figura 27 – Aspecto histológico do fígado de camundongos HT não submetido ao modelo de obstrução do ducto colédoco. Ductos biliares sem sinais de hiperplasia, indicados nas setas amarelas. Lâmina corada por H.E. e aumento de 10 X

5.7 ANÁLISE MORFOMÉTRICA

Após a quantificação das cinco estruturas hepáticas, cujo método de quantificação já fora detalhado anteriormente, as análises morfométricas das mesmas foram feitas pelo Sistema Anova 2 vias e por gráficos, posteriormente sendo transformadas em porcentagem para obtenção da média geral (Tabela 9). O objetivo da análise, fora verificar e especificar por métodos estatísticos, as possíveis diferenças entre os genótipos dos camundongos heterozigotos (HT) e selvagens (SV), durante o tempo experimental pós-cirúrgico.

Baseado na quantificação morfométrica do número de hepatócitos (Figura 28) e arteríolas

(Figura 31), é possível afirmar que não houve diferença significativa entre os genótipos HT e SV, todavia, uma pequena diferença fora verificada quanto ao tempo experimental (48 horas, 7 e 14 dias). Quanto a análise do número de ductos biliares (Figura 29) e veias centrolobulares (Figura 32), não houve diferença significativa entre os genótipos e quanto ao tempo experimental, entretanto, quando se analisou a quantificação do número de vênulas (Figura - 30), verificou-se uma diferença significativa entre os genótipos HT e SV, porém, quanto ao tempo experimental não houve diferença significativa.

Figura 28 – Quantificação do número de hepatócitos dos camundongos heterozigotos e selvagens durante o tempo experimental. Não houve diferença significativa entre os genótipos ($P = 0,12$), todavia, quanto ao tempo experimental houve uma diferença significativa ($P = 0,0103$)

Figura 29 – Quantificação do número de ductos biliares, entre os camundongos heterozigotos e selvagens. Não houve diferença significativa quanto ao genótipo ($P = 0,5489$) e quanto ao tempo experimental ($P = 0,9315$)

Figura 30 – Quantificação do número de vênulas entre camundongos heterozigotos e selvagens. Houve diferença significativa quanto ao genótipo ($P = 0,0226$), contudo, quanto ao tempo experimental não houve diferença significativa ($P = 0,2812$). No tempo de 48 horas houve diferença quanto ao genótipo (teste t não pareado $P = 0.046$)

Figura 31 – Quantificação do número de arteríolas em camundongos heterozigotos e selvagens. Não houve diferenças significativas quanto ao genótipo ($P = 0,4198$), quanto ao tempo experimental houve uma diferença significativa ($P = 0,0287$) pela ANOVA duas vias

Figura 32 – Quantificação do número de veias centrolobulares entre os camundongos heterozigotos e selvagens. Não houve diferenças significativas quanto ao genótipo ($P = 0,8457$) e quanto ao tempo experimental ($P = 0,1668$)

Tabela 9 – Média geral das estruturas hepáticas entre os grupos *knockout* e *wild type*. O teste Anova de duas vias revelou que não houve significativa diferença entre os dois grupos (HT e SV) quanto ao tempo cirúrgico e as estruturas analisadas

48 Horas	HT (n=16)	SV (n=14)
Hepatócitos	9.1% $\pm$ 1,84	14.23 % $\pm$ 1,84
Ducto Biliar	0.2 % $\pm$ 0,09	0.18 % $\pm$ 0,06
Vasos	0.15 % $\pm$ 0,06	0.43 % $\pm$ 0,16
Arteriolas	0.07 % $\pm$ 0,04	0.07 % $\pm$ 0,03
Veia Centrolobular	0.12 % $\pm$ 0,06	0.11 % $\pm$ 0,03
7 Dias	HT (n=4)	SV (n=2)
Hepatócitos	7,71 % $\pm$ 1,07	9,31 % $\pm$ 1,85
Ducto Biliar	0,20 % $\pm$ 0,06	0,21 % $\pm$ 0,02
Vasos	0,29 % $\pm$ 0,05	0,35% $\pm$ 0,08
Arteriolas	0,03 % $\pm$ 0,03	0,016 % $\pm$ 0,03
Veia Centrolobular	0,08 % $\pm$ 0	0,08 % $\pm$ 0
14 Dias	HT (n=3)	SV (n=4)
Hepatócitos	12,57 % $\pm$ 5,03	10,01 % $\pm$ 2,64
Ducto Biliar	0,22 % $\pm$ 0,17	0,17 % $\pm$ 0,06
Vasos	0,39 % $\pm$ 0,08	0,36 % $\pm$ 0,07
Arteriolas	0,05 % $\pm$ 0,04	0,03 % $\pm$ 0,03
Veia Centrolobular	0,08 % $\pm$ 0	0,08 % $\pm$ 0

Fração de volume ocupada pelos diferentes componentes do fígado

5.8 WESTERN BLOT PARA PCNA

O método de *western blot* para *PCNA* foi realizado com a finalidade de se observar o padrão de marcação das células em divisão, no período de 48 horas, comparando os animais HT e SV. Seu resultado foi indicado pelas bandas fortemente positivas, ou seja, mais concentradas com proteínas do tecido hepático dos animais.

As proteínas que percorreram o gel foram colocadas de maneira aleatória, evidenciando no grupo SV maior concentração protéica (Figura 33).

Figura 33 – Foto de bandas protéicas de *PCNA* realizadas pela técnica de *western blot* dos camundongos SV e HT no período de 48 horas pós-cirurgia. As bandas protéicas dos animais SV apontaram uma sutil diferença, marcada mais fortemente pelo gel

5.9 QUANTIFICAÇÃO DAS BANDAS PROTEÍCAS DE PCNA

Para quantificação das bandas de PCNA foi utilizado o software para Análise de Imagem - *Image Master 1D Elite* (Amersham Pharmacia Biotech), versão 4.5 para Windows, edição 2002 e para melhor visualização foi construído um gráfico (Figura 33). Utilizou-se o teste t, para análise dos camundongos SV e HT, somente no período de 48 horas (Tabela 10).

Tabela 10 – Média e desvio padrão da densitometria das bandas do *western blot* para PCNA dos camundongos HT e SV durante o tempo 48 horas pós-cirúrgico

Grupos	SV	HT
D.O.	84,37 $\pm$ 2,36	71,33 $\pm$ 21,95

Figura 34 – Média e desvio padrão, unidade arbitrária de densitometria das bandas de PCNA dos dois grupos de camundongos SV e HT no intervalo de 48 horas após a cirurgia. Não houve diferença significativa quanto ao genótipo ($P = 0,0595$)

Tabela 11 – Análise dos parâmetros avaliados e quantificados neste trabalho, comparando os genótipos e os tempos experimentais

Período pós-cirúrgico	48 horas		7 dias		14 dias	
Genótipo	HT	SV	HT	SV	HT	SV
Parâmetros						
Peso relativo fígado	=	=	<	>	<	>
Evolução Ponderal	=	=	=	=	=	=
Hepatócitos	<	>	<	>	>	<
Ducto biliar	=	=	=	=	=	=
Vênulas	<	>	<	>	>	<
Arteríolas	=	=	=	=	=	=
Veia centro-lobular	=	=	=	=	=	=
PCNA- Proliferação Análise Qualitativa	<	>	-----		-----	
PCNA-Proliferação Análise Quantitativa	=	=	=	=	=	=
Necrose	-----		=	=	=	=
Análise macroscópica	=	=	=	=	=	=

Legenda: < (menor); > (maior); = (igual)

6 DISCUSSÃO

Com o advento da engenharia genética e o interesse crescente na utilização de animais transgênicos, desvendando relações entre doenças genéticas, conexinas e a supressão da multiplicação de linhagens de células neoplásicas, esses fatores impulsionaram o desenvolvimento de numerosos estudos envolvendo animais heterozigotos, proporcionando ganho relevante de conhecimento geral sobre eles. Esses camundongos têm contribuído muito para elucidar aspectos da biologia de vários órgãos, ao possibilitar a identificação da função de genes específicos e sua participação nas mais diversas doenças.

A expressão do gene da conexina 43 nas células ovais, presentes tanto no tecido hepático, como no biliar, células estas que podem se diferenciar em células hepáticas e/ou células do epitélio dos ductos biliares (CEB), foram os fatores determinantes que incentivaram o planejamento desse trabalho, particularmente para tentar elucidar a participação dessa conexina na hiperplasia de ductos biliares de camundongos selvagens e heterozigotos, após a ligação do ducto biliar comum (colédoco). Essa avaliação contemplou a quantificação das possíveis diferenças das estruturas hepáticas.

Quanto às alterações macro e microscópicas que se estabelecem após a ligação do colédoco, essas têm sido bem documentadas por diversos autores e os achados deste trabalho não diferem daqueles já referidos (GALL; BHATAL 1990; PRADO et al., 2003).

No que se refere aos achados macroscópicos, vimos que o período de 48 horas de procedimento cirúrgico com a ligação do colédoco, os fígados dos animais dos grupos SV e HT apresentaram se com discreta hepatomegalia. Ao analisarmos histologicamente, evidenciamos a hiperplasia de ductos biliares e nossos achados corroboram com os dados

obtidos por Gall e Bhathal (1990) e Paku et al. (2005).

Durante o mesmo período experimental (48 horas), verificou-se processos degenerativos, caracterizados por degeneração vacuolar e áreas focais de necrose distribuídas aleatoriamente no tecido hepático de alguns animais, contrariamente às observações de Gall e Bhathal (1990), onde os autores não observaram o mesmo tipo de lesão no intervalo de 24 a 96 horas, além do fato da arquitetura lobular hepática ter se mantida preservada em todos os animais.

Aos 7 e 14 dias, evidenciou-se hepatomegalia e icterícia, e em alguns exemplares observou-se a presença de microabscessos hepáticos, provenientes da sepse, corroborando com o trabalho de Prado et al. (2003).

O tempo de persistência da obstrução é diretamente proporcional ao grau de hiperplasia de ductos, essa assertiva é coincidente com nossos achados e de Leitão et al. (1997). Ainda segundo Leitão, o seguimento pós-operatório prolongado de animais submetidos à obstrução do colédoco evidencia o aparecimento e a evolução de quadros degenerativos que devem evoluir para necrose e cirrose biliares hepática. Quanto a esses achados nada temos a relatar visto que o período experimental para nós utilizado, foi de no máximo 14 dias, embora tenhamos vistos nos períodos experimentais de 7 e 14 dias, extensas áreas de necrose com a presença de células polimorfunucleares.

Quanto à *causa mortis* durante o pós-operatório, sugerimos estar vinculada ao procedimento anestésico, a manipulação cirúrgica dos animais, a colestase e infecções que podem se tornar sepse (PRADO et al., 2003). Contudo, Akimoto et al. (2005) atribuiu a morte dos animais, utilizados em seu estudo, ao choque hipovolêmico em decorrência da hemorragia de vários órgãos, inclusive pulmão. Segundo o autor, a obstrução do ducto biliar comum em ratos leva a deficiência de vitamina K, favorecendo o processo

hemorrágico.

De acordo com Prado et al. (2003) e Leitão et al. (1997), não se observa “lagos de bile” em camundongos com hiperplasia crônica de ductos biliares, entretanto, obtivemos tal achado em dois animais de nosso experimento, eutanasiados no 14 ° dia de pós-operatório.

Alguns dos resultados obtidos, tais como a evolução ponderal, o peso relativo do fígado e a quantificação morfométrica das cinco estruturas hepáticas consideradas, foram analisadas mediante o método ANOVA duas vias e a avaliação da concentração protéica no fígado dos animais SV e HT durante o tempo de 48 horas, foi submetida ao teste t (não pareado).

No período de 48 horas, os animais SV apresentaram maior perda de peso, entretanto, quando se analisa essa diferença em unidade de peso (gramas), a mesma foi ínfima, cerca de 0,2 g. Com 7 dias, observou-se uma acentuada perda de peso de ambos os grupos, uma média de 8,4 g e maior sofrimento físico do grupo HT em relação ao SV, pois HT teve maior índice de emagrecimento. No último tempo experimental, 14 dias, os animais perderam menos peso, cerca de 3,7 g, sendo que o grupo SV apresentou maior sofrimento físico em relação ao HT. Embora tenha havido uma perda relativa em gramas entre os dois grupos de animais nos dois tempos experimentais, quando esses dados foram submetidos à análise estatística, não se pontuou diferença significativa entre SV e HT, o que sugere a não participação da conexina 43 nesse parâmetro. Entretanto, não pudemos explicar o motivo pelo qual os animais perderam menos peso entre o período de 7 a 14 dias, pois em se tratando de uma cirurgia invasiva, esperava-se uma perda gradativa de peso até 14 dias. Não foi possível afirmar se os animais chegaram a ganhar peso nesse intervalo de tempo, pois os mesmos não foram pesados diariamente, porém o que podemos relatar, baseado nos dados clínicos e físicos, foi que todos os animais eutanasiados no 7 ° e 14 °

dias, perderam peso e sugere-se que o período mais crítico foi o de 4 ° ao 6 ° dia, onde os animais apresentaram maior perda de peso e tivemos um índice maior de óbito, corroborando com o trabalho de Prado et al. (2003). A análise estatística da evolução ponderal apontou uma diferença quanto ao tempo experimental, sugerindo, portanto, que em se tratando de uma análise referente aos tempos cirúrgicos distintos, obtêm-se quadros diferentes de acordo com a evolução do tempo, ou seja, obtivemos diferenças quanto ao quadro clínico e físico dos animais, de acordo com o tempo experimental, pois se trata de uma cirurgia que leva ao processo de degeneração hepática e este fato está relacionado diretamente com o tempo pós-cirúrgico.

Quando se avaliou o peso relativo do fígado, observaram-se diferenças quanto aos genótipos SV e HT somente no período de 14 dias, sendo que os animais SV apresentaram maior sofrimento, o motivo pelo qual se estabeleceu essa diferença está distante de nosso alcance em abalizá-la. Houve diferença significativa também quanto ao tempo experimental, sendo os motivos idênticos ao da evolução ponderal.

Relativamente a morfometria das estruturas hepáticas analisados pelo Sistema de Análise de Imagem Computadorizado, observamos que os animais SV e HT, não pontuaram diferenças significativas quanto aos genótipos, de acordo com a quantificação do número de hepatócitos. Assim, nesse estudo, bem como no de outros autores, sugere-se que pelo fato dos hepatócitos não apresentarem conexina 43 nas junções *gap* (GONZÁLEZ et al., 2002 e PIECHOCKI et al., 1999), fica demonstrado que o genótipo não interfere nos resultados da quantificação hepática desse trabalho. Todavia, houve diferença significativa quanto ao tempo experimental, pois se tratou de três tempos distintos (48 horas, 7 e 14 dias), ou seja, quanto maior o intervalo pós-cirúrgico, maior a lesão hepática e conseqüentemente a destruição dos hepatócitos, como já foi discutido

previamente.

De acordo com a análise morfométrica dos ductos biliares de ambos os grupos, não houve diferença significativa quanto ao genótipo e quanto ao tempo experimental. Fundamentado nesse resultado, sugere-se que a conexina 43 seja apenas um fator coadjuvante e não determinante na formação de novos ductos biliares. Vale ressaltar que os resultados demonstraram que uma lesão severa, como a obstrução total do ducto biliar comum (colédoco) é capaz de induzir o fígado a várias reações, na tentativa de corrigir um processo patológico, levando à hiperplasia de todos os ductos biliares e uma intensiva proliferação de células epiteliais biliares, iniciando-se durante o período de 48 horas (PAKU et al., 2005) de ambos os grupos SV e HT. O presente estudo sugere que há uma grande proliferação de ductos biliares e hiperplasia dos mesmos iniciando-se no período de 48 horas, após a ligação do ducto biliar comum até o período de 21 dias, quando, de acordo com Gall e Bhathal (1990) inicia-se o processo de cirrose. Paku et al. (2005) afirmaram que o primeiro estímulo dos ductos biliares, após a ligação do ducto biliar comum, é o aumento da pressão interna dos ductos biliares e esta pressão é maior nesses canais do que a pressão no interior do colédoco.

Observou-se, por meio da quantificação das vênulas, a proliferação das mesmas, em ambos os grupos SV e HT, corroborando como o trabalho de Rosmorduc et al. (1999), que demonstraram através do mesmo modelo experimental, a proliferação de vasos sanguíneos, porém em ratos, sugerindo que os hepatócitos, entram no processo de hipóxia, devido à obstrução total do ducto biliar comum, induzindo a liberação de fatores hepáticos angiogênicos, como VEGF e FGF2.

De acordo ainda com os resultados obtidos nesse estudo, houve diferença significativa quanto ao tempo experimental, ou seja, nos períodos de 48 horas e 7 dias houve

um maior número de vênulas no grupo SV e com 14 dias esse quadro se inverteu. O aumento de vênulas no grupo SV, durante 48 horas e 7 dias, pode estar relacionado ao excessivo número de conexina 43 nas junções *gap* das células endoteliais das paredes de grandes e pequenas artérias, vasos e capilares (GUSTAFSSON et al., 2003). Entretanto, após 14 dias, sugere-se que tenha ocorrido uma adaptação dos hepatócitos, no grupo HT, que para suprir a falta da conexina aumentou a liberação dos fatores hepáticos angiogênicos e durante a colestase, numa tentativa de corrigir a lesão hepática, há aumento no número de células epiteliais biliares e conseqüentemente, aumento da Cx 43 (GONZALES et al., 2002) o que pode ter favorecido a formação de novos vasos neste grupo.

Segundo a análise morfométrica das arteríolas, os resultados não demonstraram uma diferença significativa quanto ao genótipo SV e HT, contudo, há um aumento evidente das arteríolas, acompanhando a evolução do tempo experimental, ou seja, com 14 dias o número de arteríolas é elevado em relação ao tempo de 48 horas, sugerindo e baseado no trabalho de Rosmorduc et al. (1999), há intensa liberação de fatores angiogênicos hepáticos, durante a evolução do processo pós-cirúrgico.

Nossos resultados não demonstraram diferenças com relação ao genótipo SV e HT ao tempo experimental, por meio da quantificação morfométrica das veias centrolobulares, o que permitiu sugerir que a deleção da conexina 43 em um dos alelos nos genes seria um fator irrelevante e incapaz de alterar a reação hepática frente a um processo patológico severo, como o que foi elaborado nesse trabalho.

Quanto à utilização do método de *western blot PCNA*, foram utilizados para qualificar as bandas protéicas e quantificar pela densidade óptica (D.O.). A maior concentração de células em divisão nos dois grupos SV e HT, no tempo experimental de 48 horas, pois período esse onde se evidencia o início da hiperplasia dos ductos biliares, além

dos novos vasos e as células encontra-se no pico de divisão.

No presente estudo a maior concentração, porém sutil, de bandas protéicas no grupo SV, indicou maior proliferação celular, baseados nos trabalhos com células ovais, sugeriu-se que diante de uma agressão hepática, inicia um processo de divisão celular dando origem a hepatócitos ou a células epiteliais biliares (PAKU et al., 2001 e SLOTT et al., 1990), além do que as células ovais apresentam grande quantidade de conexina 43 (ZHANG et al., 1994).

Em se tratando de dois grupos de animais, sendo que um deles, transgênico para conexina 43 (HT), sugere-se ainda, uma menor proliferação celular neste grupo de camundongos, tendo os motivos dos quais, sido acima especificados. Entretanto, de acordo com os resultados da análise quantitativa das bandas protéicas, não houve diferença significativa entre os dois grupos HT e SV, o que sugere, baseado na análise qualitativa, que existe uma diferença, porém é ínfima.

Durante nosso estudo constatou-se através do acompanhamento dos camundongos e dos resultados, que o modelo cirúrgico utilizado é extremamente invasivo, levando a altos percentuais de mortalidade e morbidade (SHERIDAN et al., 1987). Isto se deve as principais *causa mortis*, tais como: infecção hepática e/ou sepse, ocasionadas pela manipulação cirúrgica, obstrução total ducto biliar comum e à colestase (PRADO et al., 2003).

Ainda nos dias de hoje, muitos trabalhos utilizam os mesmos modelos experimentais, buscando encontrar respostas para as complicações sépticas, ocorridas após a obstrução total do ducto biliar comum e muitas vezes estas respostas são controversas. Entretanto, todos os estudos são unânimes em afirmar que este processo leva a um comprometimento do sistema imune, e que a bile é uma importante barreira anti-bacteriana

na parede do intestino delgado.

Esse estudo sugere, fundamentado nos resultados de literatura, o quadro infeccioso e/ou sepse como fatores determinantes na morte dos camundongos, após o procedimento cirúrgico.

Sano et al. (2004) trabalhando com ratos, observaram que após a ligação do ducto biliar comum, havia um aumento considerável da translocação bacteriana e isto se dava à falha na barreira do intestino, ou seja, a ausência da bile no trato gastro-intestinal, segundo o autor, promoveu uma queda significativa no número de linfócitos T CD 4 e CD 8 na lâmina própria do intestino delgado.

Segundo Hoshino et al. (2003), as complicações sépticas são comuns em pacientes com obstrução biliar e isto é atribuído em parte, à disfunção do sistema reticuloendotelial hepático (SRH), ou seja, por diminuição dos macrófagos hepáticos e conseqüentemente, prejudicando a fagocitose.

Wells et al. (1995) sugeriram que o enfraquecimento da função endotóxica do sistema fagocítico mononuclear está diretamente relacionado à obstrução biliar total. A ausência ou baixos níveis de bile no intestino delgado prejudica a emulsificação e efeitos anti-endotóxicos dos sais biliares, resultando em elevados níveis de endotoxinas no intestino que são absorvidos pela circulação portal (SCOTT-CORNNER et al., 1994). O exato mecanismo de translocação bacteriana ainda não está completamente esclarecido, porém a “internalização” de bactérias através dos enterócitos parece ser o passo inicial deste evento (PRADO et al., 2003). Alguns trabalhos *in vitro* têm demonstrado que a bile exerce um importante papel protetor no intestino contra bactérias e concluem ainda que a célula de *Kupffer* expostas a endotoxinas na região portal produz altas quantidades de *PAF* (Fator ativador de plaquetas), um importante indutor da lesão hepatocelular. A bile protege

o duodeno da migração bacteriana através do epitélio na parede intestinal, impedindo a endocitose bacteriana, através dos enterócitos (WELLS et al., 1995).

A colestase extra-hepática leva ao quadro de icterícia, devido ao bloqueio da drenagem da bile para o duodeno, acarretando o acúmulo de bilirrubina nos tecidos. Com isto, inicia-se o processo inflamatório, podendo evoluir para cirrose biliar secundária e/ou infecção bacteriana secundária (“colangite ascendente”), ocasionada pelo refluxo bacteriano, com absorção pelas próprias células intestinais. Os agressores entéricos mais comuns são os coliformes e enterococos, sendo possível ocorrer também sepse pela presença de microorganismos *gram* negativos. O acúmulo de bile, durante a colestase pode favorecer a endotoxemia intestinal e levar a sepse.

Cakmakci et al. (1996) utilizaram o mesmo modelo experimental em ratos, acompanhando-os por 10 dias. Durante a necropsia analisaram outros órgãos tais como: linfonodo mesentérico, pulmão, baço, fígado e quantificaram as análises bacteriológicas. Concluíram que a ausência da bile no intestino promove translocação bacteriana não apenas para o fígado, mas para outras vísceras, como as já citadas.

Dos inúmeros óbitos que ocorreram no pós-operatório em tempo coincidente com alguns dos autores citados, acreditamos que os mesmos eventos patobiológicos acometeram nossos animais.

7 CONCLUSÃO

Diante do exposto podemos concluir que:

Entre os achados macroscópicos do fígado e sinais clínicos dos animais, houve diferenças significantes quanto aos tempos experimentais (48 horas, 7 e 14 dias), pois quanto mais prolongado o tempo pós-cirúrgico, há uma piora do quadro clínico do animal, entretanto, quanto as diferenças microscópicas não houve diferenças significantes quanto aos genótipos HT e SV.

1. A ligação do ducto biliar comum é uma cirurgia invasiva e leva 100% dos animais à piora do quadro clínico, sintomas esses demonstrados pela prostração, icterícia, perda de peso e relacionados aos quadros de colestase e sepse.
2. A principal causa *mortis* tem sido atribuída a sepse, que se desenvolve em alguns camundongos no período pós-cirúrgico.
3. A morbidade e mortalidade dos animais, após e durante o procedimento cirúrgico são significativas nesse experimento.
4. Em 100% dos animais eutanasiados entre 7 e 14 dias, observou-se hepatomegalia, que tornaram-se mais intensas à medida que evoluiu o tempo experimental.
5. A hiperplasia dos ductos biliares foi evidente no primeiro tempo experimental de 48 horas, nos dois grupos de camundongos.
6. Após a análise qualitativa, pelo método de *western blot PCNA* no período de 48 horas, houve uma pequena diferença, apontando maior concentração protéica no grupo SV, entretanto, quando submetidos à análise estatística, não houve diferença significativa entre os dois grupos.

REFERÊNCIAS

AI-LAN QIN; XIA-QIU ZHOU; WEI ZHANG; HONG YU; QIN XIE. Characterization and enrichment of hepatic progenitor cells in adult rat liver. **World Journal Gastroenterology**, Shangais, China, v.10, n. 10, p.1480–1486, 2004.

AKIMOTO, T.; HAYASHI, N.; ADACHI, M.; KOBAYASHI, N.; XUE-JUN ZHANG; OHSUGA, M.; KATSUTA, Y. Viability and Plasma Vitamin K Levels in the Common Bile Duct-Ligated Rats. **Experimental Animal**, Tokyo, Japan, v. 5492, n. 11, p.155-161, 2005.

AVANZO, J. L. **Carcinogenese pulmonar em camundongos portadores de deleção em um dos alelos do gene da Cx 43**: estudo experimental. 2005. Tese (Doutorado em Patologia Experimental e Comparada) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo, 2005.

BANKS, W. J. **Histologia veterinária aplicada**. 2. ed. São Paulo: Editora Manole, 1992, p. 629.

BEYER, E. C. Gap junctions. **International Review Cytology**, v. 137C, n. 3, p. 31–37, 1993.

BEYER, E. C. Molecular cloning and developmental expression of two chick embryo gap junction proteins. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 265, n. 4, p. 14439– 1443, 1990.

BEYER, E. C.; PAUL, D. L.; GOODENOUGH, D. A. Connexin 43: a protein from rat heart homologs to a gap junction protein from liver. **Journal of Cell Biololgy**, v. 105, n. 2, p. 2621 – 2629, 1987.

BERGOFFEN, I.; SCHERER S.S; WANG, S.; ORONZI-SCOTT; BONE, L.; PAUL, D. L.; CHEN, K.; LENSCH, M. W.; CHANCE, P.; FISCHBECK, K. Connexin mutations in X- linked Charcot-Marie Tooth disease. **Science**, v. 262, n. 24, p. 2039-2042, 1993.

BERTHOUD, V. M.; MONTEGNA, E. A.; ATAL, N.; AITHAL, N. H.; BRINK, P. R.; BEYER, E. C. Heteromeric connexons formed by lens connexins, connexin 43 and connexin 56. **European Journal of Cell Biology**, v. 80, n. 22, p. 11-19, 2000.

BODE, H. P.; WANG, L.; CASSIO, D.; LEITE, M. F.; ST-PIERRE, M. V.; HIRATA, K.; OKAZAKI, K.; SEARS M. L.; MEDA, P.; NATHANSON, M. H.; DUFOUR, J. F. Expression and regulation of gap junctions in rat cholangiocytes. **Hepatology**, Germany, v. 36, n. 6, p. 631-641, 2002.

BRAUN, K. M.; SANDGREN, E. P. Cellular origin of regenerating parenchyma in a mouse model of severe hepatic injury. **American Journal of Pathology**, v. 157, n. 2, p. 561–569, 2000.

BRISSETTE, J. L.; KUMAR, N. M.; GILULA, N. B.; HALL, J. E.; DOTTO, G. P. Switch in gap junction protein expression is associated with selective changes in junctional permeability during keratinocyte differentiation. **Proceedings of National Academy of Science of The United States of America**, v. 91, n. 5, p. 6453–6457, 1994.

BRUZZONE, R.; WHITE, T. W.; SCHERER, S. S.; FISCHBECK, K. H.; PAUL, D. L. Null mutations of connexin 32 in patients with X – linked Charcot – Marie - Tooth disease. **Official Publication of the World Federation of Neurology**, v. 13, n. 4, p. 1253–1260, 1994.

BUNDUNOVA, I.; WILLIAMS, G. M. Cell culture assays for chemicals with tumor promoting or inhibiting activity based on the modulation of intercellular communication. **Cell Biology and Toxicology**, v.10, n. 2, p. 71-116, 1994.

CAKMAKCI, M.; TIRNAKSIZ, B.; HAYRAN, M.; BELEK, S.; GURBUZ T.; SAYEK, I. Effects of obstructive jaundice and external biliary diversion on bacterial translocation in rats. **European Journal of Surgery**, Turkey, v. 162, n. 7, p. 567– 571, 1996.

CAMERON, G. R.; MUZAFFAR HASAN, S. Disturbances of structure and function in the liver as the result of biliary obstruction. **Journal of Pathology and Bacteriology**, Indian, v. 75, n. 5, p. 333-349, 1976.

CANBAY, A.; HIGUCHI, H.; BRONK, S. F.; TANIAI, M.; SEBO, T. J.; GORES, G. J. Fas enhances fibrogenesis in the bile duct ligated mouse: A link between apoptosis and fibrosis. **Gastroenterology**, v. 123, n. 4, p. 1323-1330, 2002.

CHANG, C. C.; TROSKO, J. E.; KUNG, H. J.; BOMBICK, D.; MATSUMURA, F. Potential role of the src gene in inhibition of gap-junctional intercellular communication in NIH-3T3 cells. **Proceedings of National Academy of Science of The United States of America**, v. 82, n. 6, p. 5360-5364, 1985.

CHIPMAN, J. K.; MALLY, A.; EDWARDS, G. O. Disruption of Gap Junction in Toxicity and Carcinogenicity. **Toxicological Sciences**, v. 71, n.2, p. 146 - 153, 2003.

CLEMENTS, W. D.; HALLIDAY, I.; MCCAIGUE, M. D.; BARCLAY, R. G.; ROWLANDS, B. J. Effects of Extrahepatic Obstructive Jaundice on Kupffer Cell Clearance Capacity. **Archives of Surgery**, Belfast, Northern Ireland, v. 128, n. 2, p. 200–204, 1993.

DAGLI, M. L. Z.; OMORI, Y.; KRUTOVSKIKH, V.; YAMASAKI, H. Hepatocarcinogenesis in transgenic mice expressing a dominant-negative mutant of connexin 32 only liver. In: Meeting on Hepatocarcinogenesis: from basic research to treatment, 1999 b, Viena, Áustria, proceedings, p. III – 6, de 23 a 26 de Setembro de 1999.

DAGLI, M. L. Z.; WARD, J. M.; MERLINO, G.; ENOMOTO, A.; MARONPOT, T. Liver pathology in genetically engineered mice. In: WARD, J. M.; MAHLER, J. F.; MARONPOT, R. R.; SUNDBERG, J. P. (Ed.). **Pathology of genitically engineered mice**, EUA, Iowa State University Press, proceedings, p. V – 8, 2000.

DESMET, V. J. Modulation of biliary epithelium. In: REUTTER, W.; POPPER, H.; ARIAS, J. M.; HEINRICH, P. C.; KEPLER, D.; LANDMANN, L. (Ed.). **Modulation of liver cell expression**. Lancaster: MTP Press Limited, 1987, p. 195–214.

DERMIETZEL, R.; GAO, Y.; SCMES, E.; VIEIRA, D.; URBAN, M.; KREMER, M.; SPRAY, D. C. Connexin 43 null mice reveal that astrocytes Express multiple connexins. **Brain Research Review**, New York, USA, v. 32, n. 1, p. 45- 46, 2000.

DERMIETZEL, R.; HWANG, T. K.; SPRAY, D. S. The gap junction family: structure, function and chemistry. **Anatatomy and Embryology**, Berlin, v. 182, n. 11, p. 517–528, 1990.

DIEZ, J. A.; AHMAD, S.; EVANS, W. H. Assembly of heteromeric connexons in guinea-pig liver en route to the Golgi apparatus, plasma membrane and gap junctions. **European Journal Biochemistry**, v. 262, n. 1, p. 142– 148, 1999.

ELFGANG, C.; ECKERT, R.; LICHTENBERG-FRATE, H.; BUTTERWECK, A.; TRAUB, O.; KLEIN, R. A.; HULSER, D. F.; WILLECKE, K. Specific permeability and selective formation of gap junction channels in connexin-transfected HeLa cells. **Journal of Cell Biology**, v. 129, n. 4, p. 805–817, 1995.

EVANS, H. E.; DELAHUNTA, A. **Guia para a dissecação do cão**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001, p. 175.

FACTOR, V. M.; RADAIEVA, S. A.; THORGEIRSSON, S. S. Origin and Fate of Oval Cells in Dippin Induced Hepatocarcinogenesis in the Mouse. **American Journal of Pathology**, USA, v. 145, n. 2 , p. 409 – 422, 1994.

GABRIEL, H. D.; JUNG, D.; BUTZLER, C.; TEMME, A.; TRAUB, O.; WINTERHAGER, E.; WILLECKE, K. Transplacental uptake of glucose is decreased in embryonic lethal connexin 26 – deficient mice. **Journal of Cell Biology**, v. 140, n. 6, p.1453-1461, 1998.

GALL, J. A.; BHATHAL, P. S. Origin and involution of hyperplastic bile ductules following total biliary obstruction. **Liver**, Australia, v. 10, n. 4, p. 106–115, 1990.

GIBSON, U. E. M.; HELD, C. A.; WILLIAMS, P. M. A novel method for real time quantitative RT-PCR. **Genomes Methods**, v. 6, n.5, p. 995–1001, 1996.

GONZALEZ, H. E.; EUGENÍN, E. A.; GARCÉS, G.; SOLÍS, N.; PIZARRO, M.; ACCATINO, L.; SÁEZ, J. C. Regulation of hepatic connexins in cholestasis: possible involvement of Kupffer cells and inflammatory mediators. **American Journal Physiology Gastrointest Liver Physiology**, Santiago, Chile, v. 282, n. 4, p. 991–1001, 2002.

GOODENOUGH, D. A.; PAUL, D. L. Beyond the Gap: Functions of Unpaired Connexon Channels. **Molecular Cell Biology**, Reviews, v. 4, n. 12, p. 1–10, 2003.

GUAN, X.; BONNEY, W. J.; RUCH, R. J. Changes in gap junction permeability, gap junction number and connexin 43 expression in lindane-treated rat liver epithelial cells. **Toxicology Applied Pharmacology**, v. 130, n. 1, p. 79-86, 1995.

GUERRIER, A.; FONLUPT, P.; MORAND, I.; RABILLOUD, R.; AUDEBET, C.; KRUTOVSKIKH, V.; GROS, D.; ROUSSET, B.; MUNARI-SILEN, Y. Gap junctions and cell polarity: connexin 32 and connexin 43 expressed in polarized thyroid epithelial cells assemble into separate gap junctions, which are located in distinct regions of the lateral plasma membrane domain. **Journal of Cell Science**, v. 108, n. 7, p. 2609–2617, 1995.

GUSTAFSSON, F.; MIKKELSEN H. B.; ARENSBAK B.; THUNEBERG, L.; NEVE, S.; JENSEN, L. J.; NIELS-HENRIK HOLSTEIN-RATHOLOU, N. Expression of connexin 37, 40, 43 in rat mesenteric arterioles and resistance arteries. **Histochemistry of Cell Biology**, v.119, n. 2, p.139-48, 2003.

HAEFLIGER, J. A.; BRUZZONE, R.; JENKINS, N. A.; GILBERT, D. J.; COPELAND, N. G.; PAUL, D. L. Four novel members of the connexin family of gap junction proteins. Molecular cloning expression, and chromosome mapping. **Journal of Biological Chemistry**, v. 64, n. 3, p. 2037–2057, 1992.

HENNEMANN, H.; DAHL, E.; WHITE, J. B.; SCHWARZ, H. J.; LALLEY, P. A.; CHANG, S.; NICHOLSON, B. J.; WILLECKE, K. Two gap junction genes, connexin 31.1 and 30.3, are closely linked on mouse chromosome 4 and preferentially expressed in skin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 3, p. 17225 – 17233m 1992a.

HERTZBERG, E. L.; SKIBBENS, R. V. A protein homologous to the 27,000 dalton liver gap junction protein is present in a wide variety of species and tissue. **Cell**, v. 39, n. 4, p. 61–69, 1984.

HEYNKES, R.; KOZJEK, G.; TRAUB, O.; WILLECKE, K. Identification of arat liver Cdna and Mrna coding for the 28 kDa gap junction protein. **FEBS Letters**, v. 205, n. 1, p. 56– 60, 1986.

HOSHINO, S.; ZHAOLI, S.; UCHIKURA, K.; TSUGANE, K.; CEPPA, E.; BULKEY, G. B.; KLEIN, A. S. Biliary obstruction Reduces Hepatic Killing and Phagocytic Clearance of Circulating Microorganisms in Rats. **Journal of Gastrointestinal Surgery**, v. 7, n. 2, p. 497–506, 2003.

INTERCELLULAR Calcium-Mediated cell signaling in keratinocytes cultered from Patients with NF-1 or Psoriasis. Chapter 2. Review of the literatures. Disponível em : <http://herkules.oulu.fi/html/i1002636.html>. Acesso em: 22 abr. 2005.

JIANG, J. X.; PAUL, D. L.; GOODENOUGH, D. A. Posttranslational phosphorylation of lens fiber Cx46: a slow occurrence. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 34, n. 4, p. 3558–3565, 1993.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1995, p. 413.

KANO, Y.; LOEWENSTEIN, W. R. Intercellular diffusion. **Science**, Amsterdam, v. 143, n. 11, p. 959-60, 1964.

KELMAN Z. PCNA: structure, functions and interactions. **Oncogene**, USA, v. 14, n. 6, p. 629–640, 1997.

KELSELL, D. P.; DUNLOP, J.; STEVENS, H. P.; LENCH, N. J.; LIANG, J. N.; PARRY, G.; MUELLER, R. F.; LEIGH, I. M. Connexin 26 mutations in hereditary non-syndromic sensorineural deafness. **Nature**, v. 387, n. 1, p. 80-83, 1997.

KIRCHHOFF, S.; NELLES, E.; HAGENDORFF, A.; KRUGER, O.; TRAUB, O.; WILLECKE, K. Reduced cardiac conduction velocity and predisposition to arrhythmias in connexin40-deficient mice. **Current Biology**, Germany, v. 26, n. 5, p. 299-2302, 1998.

KOJIMA, T.; SPRAY, D. C; KOKAI, Y.; CHIBA, H.; MOCHIZUKI, Y.; SAWADA, N. Cx 32 Formation and/or Cx 32 – Mediated Intercellular Communication Induces Expression and Function of Tight Junctions in Hepatocytic Cell Line. **Experimental Cell Research**, Japan, v. 276, n. 1, p. 40–51, 2002.

KRISTIN, M. B.; SANDGREN, E. P. Cellular origin of Regenerating Parenchyma in a Mouse Model of Severe Hepatic Injury. **American Journal of Pathology**, Wisconsin-Madison, EUA, v. 157, n. 2, p. 562–569, 2000.

KRUGER, O.; PLUM, A.; KIM, J. S.; WINTERHAGER, E.; MAXEINER, S.; HALLAS, G.; KIRCHOFF, S.; TRAUB, O.; LAMERS, W. H. Defective vascular development in connexin 45-deficient mice. **Development**, v.127, N. 12, p. 4179-4193, 2000.

KRUTOVSKIKH, V.; YAMASAKI, H. The role of gap junctional intercellular communication (GJIC) disorders in experimental and human carcinogenesis. **Histology and Histopathology**, Lyon, France, v. 12, n. 3, p. 761-768, 1997.

KUMAR, N. M., GILULA, N. B. The Gap Junction Communication Channel. **Cell**, California, USA, v. 84, p. 381 – 388, 1996.

LAI EDWARD, C. S.; CHU KENT, M.; CHUNG-YAU, LO; MOK FRANCIS, P. T.; SHEUNG-TAT, FAN; CHUNG-MAU, LO; JOHN WONG. Surgery for malignant obstructive jaundice: Analysis of mortality. **Surgery**, Hong Kong, v. 112, N. 5, p. 891-896, 1992.

LEDUC, E. H. Cell modulation in liver pathology. **Jorunal Histochemistry Cytochemistry**, v. 7, n. 4, p.253–255, 1959.

LEE, E. The effect of obstructive jaundice on the migration of reticuloendothelial cells and fibroblasts into early experimental granulomata. **British Journal Surgery**, v. 59, n. 11, p. 875–877, 1972.

LEITÃO, R. M. C. Patologia da icterícia obstrutiva. In: SIMPÓSIO: ICTERÍCIA OBSTRUTIVA, 1997, Ribeirão Preto, São Paulo, cap. VI, v. 30, p. 209 – 219.

LERNER, D. L.; YAMADA, K. A.; SCHUESSLER, R. B.; SAFFITZ, J. E. Accelerated onset and increased incidence of ventricular arrhythmias induced by ischemia in Cx 43 deficient mice. **Circulation**, v. 8, n. 5, p. 547-552, 2000.

LOEWENSTEIN, W. R.; KANO, Y. Intercellular communication and the control of tissue growth: lack of communication between cancer cells. **Nature**, v. 209, n. 29, p. 1248–1249, 1966.

MAKOWSKI, L.; CASPAR, D. L. D.; PHILLIPS, W. C.; GOODENOUGH, D. A. Gap junction structures. II, analysis of the X-ray diffraction data. **Journal of Cell Biology**, v. 74, n. 1, p. 629–645, 1977.

MANSSENS, B. J.; SCHALM, L.; SCHULTE, M. J.; BAX, H. R.; MIETE, M.; PEREIRA, A. R. Regeneration of liver cells in the rabbit. **Journal of Pathology and Bacteriology**, v. 64, n. 3, p. 677–678, 1952.

MATHIE, R. T.; NAGORNEY, D. M.; LEWIS, M. H.; BLUMGART, L. H. Hepatic hemodynamics after chronic obstruction of the biliary tract in the dog. **Surgery, Gynecology and Obstetrics**, London, v. 166, n.6, p.125–130, 1988.

MEDA, P.; CHANSON M.; PEPPER, M. S.; GIORDANO, E.; BOSCO, D.; TRAUB, O.; WILLECKE K.; AUOMARI, A.; GROS, D.; BEYER, E. C. In vivo modulation of connexin 43 gene expression and junctional coupling of pancreatic B-cells. **Experimental Cell Research**, v. 80, n. 2, p.192–469, 1991.

MEDA, P.; PEPPER, M. S.; TRAUB, O.; WILLECKE, K.; GROS, D.; BEYER, E. C.; NICHOLSON, B.; PAUL, D.; ORCI, L. Differential expression of gap junction connexins in endocrine and exocrine glands. **Endocrinology**, v. 8, N. 5, p.2333–2371, 1993.

MONTECINO-RODRIGUEZ, E.; LEATHERS, H.; DORSHKIND, K. Expression of connexin 43 (Cx 43) is critical for normal hematopoiesis. **Blood**, USA, v. 96, n. 3, p. 917-924, 2000.

MORAND, I.; FONLUPT, P.; GUERRIER, A.; TROUILLAS, J.; CALLÉ, A.; REMY, C.; ROUSSET, B.; MUNARI-SILEM, Y. Cell to cell communication in the anterior pituitary: evidence for gap junction mediated exchanges between endocrine cells and folliculostellate cells. **Endocrinology**, v. 137, n. 8, p. 3356-3367.

MUNARI-SILEM, Y.; ROUSSET, B. Gap junction-mediated cell-to-cell communication in endocrine glands-molecular and functional aspects: a review. **European Journal of Endocrinology**, Lyon, France, v. 135, n. 3, p. 251 – 64, 1996.

NICHOLSON, B. J.; HUNKAPILLER, M. W.; GRIM, L. B.; HOOD, L. R., REVEL, J. P. Rat liver gap junction protein: properties and partial sequence. **Proceedings of National Academy of Science of The United States of America**, v. 12, n. 78, p. 7594 – 7598, 1981.

NICHOLSON, B. J.; WEBER, P. A.; CAO, F.; CHANG, H.; LAMPE, P.; GOLDBERG, G. The molecular basis of selective permeability of connexins is complex and includes both size and charge. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, n. 4, p. 369–378, 2000.

PAKU, S.; SCHNUR, J.; NAGY, P.; THORGEIRSSON, S. S. Origin and Structural Evolution of the Early Proliferating Oval Cells in Rat Liver. **The American Journal of Pathology**, v. 158, n. 4, p. 1313–1323, 2001.

PAUL, D. L. Molecular cloning of cDNA from rat liver gap junction protein. **The Journal of Cell Biology**, v. 103, n. 4, p. 123– 34, 1986.

PETROCELLI, T.; LYE, S. J. Regulation of transcripts encoding the myometrial gap junctions protein, connexin 43, by estrogen and progesterone. **Endocrinology**, v. 133, n. 1, p. 284–290, 1993.

PRADO, I. B.; SANTOS, M. H. H.; LOPASSO, P.; IRIYA, K.; LAUDANNA, A. A. Cholestasis in a murine experimental model: lesions include hepatocyte ischemic necrosis. **Revista do Hospital das Clínicas**, Brasil, São Paulo, v. 58, n. 1, p. 22-32, 2003.

PIECHOCKI, M. P.; BURK, ROBERT D.; RUCH, R. J. Regulation of connexin 32 and connexin 43 gene expression by DNA methylation in rat liver cells. **Carcinogenesis**, New York, USA, v. 20, n. 3, p. 401– 06, 1999.

RISLEY, M. S.; TAN I. P.; ROY, C.; SAEZ, J. C. Cell, age and stage dependent distribution of connexin 43 gap junctions in testis. **Journal of Cell Science**, v. 103, n. 54, p. 103–181, 1996.

ROBERTSON, J. D. The occurrence of subunit pattern in the unit membranes of club endings in Mauthner cell synapses in Goldfish brains. **Jorunal of Cell Biology**, v. 19, n. 1, p. 201–221, 1963.

ROSMORDUC, O.; WENDUM, D.; CORPEchot, C.; HOUSSET, C. Hepatocellular Hypoxia-Induced Vascular Endotelial Growth Factor Expression and Angiogenesis in Experimental

Biliary Cirrhosis. **American Journal of Pathology**, v.155, n. 4, p.1065–1073, 1999.

SAEZ, J. C. BERTHOUD, V. M.; BRANES, M. C.; MARTINEZ, A. D; BEYER, E.C. Plasma Membrane Channels Formed by Connexins: Their Regulation and Functions. **American Physiological Society**, v.10, n. 4, p. 1359–1400, 2003.

SANDOW, L. S.; LOOFT-WILSON, R.; DORAN, B.; GRAYSON, T. H.; SEGAL, S. S.; HILL, C., E. Expression of homocellular and heterocellular gap junctions in hamster arterioles and feed arteries. **Cardiovascular Research**, Australia, v. 60, n. 3, p. 643-653, 2003.

SANO, T.; AJIKI TETSUO; TAKEYAMA YOSHIFUMI; KURODA YOSHIDAZU. Internal biliary drainage improves decreased number of gut mucosal T lymphocytes and MadCAM-1 expression in jaundiced rats. **Surgery**, v. 136, n. 2, p. 693–699, 2004.

SCHEIBER, J. R.; BECKMANN, M. W.; POLACEK, D.; DAVIES, P. F. Changes in gap junction connexin 43 messenger ribonucleic acid levels associated with rat ovarian follicular development as demonstrated by in situ hybridization. **American Journal of Obstetrics Gynecology**, v. 168, n. 4, p. 1094–1104, 1993.

SCOTT CONNER, C. E.; GROGAN, J. B. Serum and cellular factors in murine obstructive jaundice. **Surgery**. Mississippi, USA, v. 115, n. 1, p. 77–84, 1994.

SHERIDAN, W. G.; WILLIAMS, H. O. L.; LEWIS, M. H. Morbidity and mortality of common bile duct exploration. **British Journal Surgery**, Cardiff, v. 74, n. 12, p. 1095–1099, 1987.

SHIELS, A.; MACKAY, D.; IONIDES, A.; BERRY, V.; MOORE, A., BHATTACHAYA, S. A missense mutation in the human connexin 50 gene (GJA8) underlies autosomal dominant “zonular pulverulent” cataract, on chromosome 1q. **American Journal of Human Genetics**, v. 62, n. 3, p. 526-32, 1998.

SLOTT, P. A.; LIU, M. H.; TAVOLINI, N. Origin, pattern, and mechanism of bile duct proliferation following biliary obstruction in the rat. **Gastroenterology**, v. 99, n. 2, p. 466–477, 1990.

STEINBERG, T. H.; CIVITELLI, R.; GEIST, S. T.; ROBERTSON, A. J.; HICK E.; VEENSTRA, R. D.; WANG, H. Z.; WARLOW, P. M. WESTPHALE, E. M.; LAING, J. G. Connexin 43 and connexin 45 form gap junctions with different molecular permeabilities in osteoblastic cells. **The EMBO Journal**, v. 13, n. 4, p. 744–750, 1994.

STRUCTURE MOLECULAIRES. Centre National Université Poitiers. França. Disponível:
< internet: lab.univ-poitiers.fr/ipbc/FR/ICC/def -cxine.htm> Acesso em: 15 out. 2004.

THIELE, J.; REALE, E. Freeze-fracture study of the junctional complexes of human and rabbit thyroid follicles. **Cell Tiss Res.**, v. 168, n. 2, p.133–140, 1976.

TRAUNER, M.; MEIER, P.; BOYER, J. L. Molecular Pathogenesis of Cholestasis. **Review Article**, Massachussetts, USA, v. 339, n. 17, p.1217–1227, 1998.

TROSKO, J. E.; RUCH, R. J. Cell-cell communication in carcinogenesis. **Front Biosciences**, v. 15, n. 3, p. d208-d236, 1998.

UENO KIMIIHIKO; TETSUO AJIKI; WATANABE HISAMI; ABO TORU; TAKEYAMA YOSJIFUMI; ONOYAMA HIROHIKO; KORODA YOSHIKAZU. Changes in Extrathymic T Cells in the Liver and Intestinal Intraepithelium in Mice with Obstructive Jaundice. **World Journal of Surgery**, New York, v. 28, n. 3, p. 277–282, 2004.

UNGER, V. M.; KUMAR, N. M.; GILULA, N. B.; YEAGER, M. Three dimensional structure of a recombinant gap junction membrane channel. **Science**, v. 283, p. 1176–1180, 1999.

VEENSTRA, R. D.; WANG, H. Z.; BEBLO, D. A.; CHILTON, M. G.; HARRIS, A. L.; BEYER, E. C.; BRINK, P. R. Selectivity of connexin specific gap junctions does not correlate with channel conductance. **Circulation Research.**, v. 77, n. 6, p. 1156–1165, 1995.

WARNER, A. E.; GUTHRIE, S.C.; GILULA N. B. Antibodies to gap junctional protein selectively disrupt junctional communication in the early amphibian embryo. **Nature**, v. 5982, n. 311, p.127–131, 1984.

WELLS, C. L.; JECHOREK, R. P.; ERLANDSEN, S. L. Inhibitory effect of bile on bacterial invasion of enterocytes: Possible mechanism for increased translocation associated with obstructive jaundice. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, USA, v. 23, n. 2, p. 301-307, 1995.

WARD, J. M.; MAHLER, J. F.; MARONPOT, R. M.; SUNDBERG, J. P.; FREDERIDCKSON, R. M. Pathology of genetically engineered mice. Iowa State University Press, Iowa, EUA: p. 394, 2000.

WEIBEL, E. R.; GOMEZ, D. M. A principle for counting tissue structures on random sections. **Journal of Applied. Physiology**, v. 17, n. 7, p. 342–348, 1962.

WILLECKE, K.; JUNGBLUTH, S.; DAHL, E.; HENNEMANN, H.; HEYNKES, R.; GRZESCHIK, K. H. Six genes of the human connexin gene family coding for gap junctional proteins are assigned to four different human chromosomes. **European Journal of Cell Biology**, v. 53, n. 2, p. 275–280, 1990.

XIA, J. H.; LIU, C. Y.; TANG, B. S.; PAN, Q.; HUANG, L.; DAI, H. P.; ZHANG, B. R.; XIE, W.; HU, D. X.; ZHENG, D.; SHI, X. L.; WANG, D. A.; XIA, K.; YU, K. P.; LIAO, X. D.; FENG, Y.; YANG, Y. F.; XIAO, J. Y.; XIE, D. H.; HUANG, J. Z. Mutations in the gene encoding gap junction protein beta-3 associated with autosomal dominant hearing impairment. **Natural Genetics**, v. 20, n. 4, p. 370-373, 1998.

YAMASAKI, H. Gap junction intercellular communication and carcinogenesis. **Carcinogenesis**, Lyon, France, v.17, n. 7, p.1051-1058, 1990.

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

YOU-WEI ZHANG; MAKOTO KANDEA; IKUO MORITA. The Gap Junction-independent Tumor-suppressing Effect of Connexin 43. **The Journal of Biological Chemistry**, Tokyo, v. 7, n. 45, p. 44852–44856, 2003.