ALEXANDRE MAXIMILIANO TREVISAN

**Avaliação da lesão após isquemia e reperfusão
hepática em camundongos “knockout” heterozigotos
para expressão da conexina 43**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências.

Programa de Ciências em Gastroenterologia

Orientador: Prof. Dr. Wellington Andraus

São Paulo

2018

ALEXANDRE MAXIMILIANO TREVISAN

**Avaliação da lesão após isquemia e reperfusão
hepática em camundongos “knockout” heterozigotos
para expressão da conexina 43**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências.

Programa de Ciências em Gastroenterologia

Orientador: Prof. Dr. Wellington Andraus

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 5890, de 20 de dezembro de 2010.

A versão original está disponível na Biblioteca FMUSP)

São Paulo

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Trevisan, Alexandre Maximiliano

Avaliação da lesão após isquemia e reperfusão
hepática em camundongos knockout heterozigoto para
expressão da conexina 43 / Alexandre Maximiliano
Trevisan. -- São Paulo, 2018.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.

Programa de Ciências em Gastroenterologia.
Orientador: Wellington Andraus.

Descritores: 1.Junções comunicantes 2.Conexina 43
3.Isquemia 4.Reperfusão 5.Fígado 6.Comunicação
celular 7.Camundongos knockout

USP/FM/DBD-353/18

Responsável: Eidi Raquel Franco Abdalla - CRB-8/4901

DEDICATÓRIA

Dedico meu Doutorado a minha esposa, amiga, companheira e mãe dos meus filhos, **ADRIANA RIBEIRO HOMEM**, sem ela nada aconteceria. Por ter deixado de realizar os próprios sonhos para que eu pudesse realizar o meu.

Aos meus **filhos** Enzo Homem Trevisan, Alexia Homem Trevisan e meu enteado Guilherme Homem, que muitas vezes aguentaram meu mau humor e até fizeram alguns minutos de silêncio para me ajudar.

AGRADECIMENTOS

Ao Wellington Andraus pela amizade profícua, pelo estímulo positivo, pela orientação na condução desta tese, pela paciência e dedicação nos ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Bruno Cogliati, pela amizade, ajuda, ensinamentos, coorientação, dedicação, revisão e paciência.

Ao Prof. Dr. Luiz Augusto Carneiro D’Albuquerque, pelo exemplo de liderança, pela confiança pessoal e profissional a mim depositada.

Ao amigo Thiago Pinheiro Arrais Aloia, pela cooperação indispensável para viabilização do projeto.

Ao Dr. José Jukemura pela cobrança rigorosa das regras no setor de pós-graduação.

A todo pessoal do grupo de transplante de fígado por me acolherem tão bem.

As amigas Sandra Sampietri, Vilminha Libério, Alessandra Crescenzi, Márcia Saldanha Kubrusly, Erika Regina Leal de Freitas, Cinthia Lanchotte Ferreira, Alcione Sanches Alexandre, Ana Coelho, Mariliza Otani, Karina Segatto.

EPRÍGRAFE

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Normalização

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: Adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3^a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviatura dos títulos e periódicos de acordo com List of Journals Indexed in Index Medicus.

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Fisiopatologia da isquemia e reperfusão	3
1.1.1 Citocinas envolvidas e recrutamento de neutrófilos na IR	3
1.1.2 Mediadores da Matriz Extracelular (MEC) e células estreladas hepáticas (HSCs)	4
1.2 Comunicação celular	6
1.2.1 Conexinas	7
Conexina 43	9
1.2.2 Interações celulares e expressão de conexinas no fígado	9
1.3 Justificativa do estudo	11
2 OBJETIVO	12
3 MATERIAIS E MÉTODOS	14
3.1 Animais geneticamente modificados	15
3.2 Genotipagem	16
3.3 Delineamento experimental	17
3.4 Análise bioquímica	23
3.5 Exame histopatológico do fígado	24
3.6 Análise estatística	24
4 ASPECTOS ÉTICOS	25
5 RESULTADOS	28
6 DISCUSSÃO	34
7 CONCLUSÃO	41
8 ANEXO	44
9 REFERÊNCIAS	46

LISTAS

ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP	Difosfato de adenosina
ALT	Alamina-aminotransferase
AMP	Monofosfato de adenosina
AST	Aspartato-aminotransferase
ATP	Trifosfato de adenosina
BT	Bilirrubina total
CK	Células de Kupffer
Cx	Conexina
Cxs	Conexinas
DHL	Desidrogenase láctea
DP	Desvio padrão
ERO	Espécies reativas de oxigênio
Et al	E outros
FA	Fosfatase alcalina
GGT	Gama glutamil-transferase
HSCs	Células estreladas hepáticas
IA	Índice apoptótico
IFN-gama	Interferon-gama
IL	Interleucinas
IR	Isquemia e Reperfusão
KO	Knockout
MEC	Matriz extracelular
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NO	Óxido nítrico
PAF	Fator ativador de plaquetas
PBS	Phosphate buffered saline (tampão fosfato salino)

SpO ₂	Medida estimada de oxigênio do sangue arterial medido através de oxímetro
TNF	Fator de necrose tumoral
TGF	Fator de Crescimento Transformador
Tunel	Transferase terminal de deoxinucleotídeos Biotina-dUTPnickendlabeling
UCs	Unões comunicantes

FIGURAS

- Figura 1** - Diagrama esquemático de mecanismos celulares de lesão de reperfusão e isquemia hepática dentro de um sinusoide de fígado e da área circundante contendo hepatócitos. Inicial falha de perfusão sinusoidal devido ao tamponamento de plaquetas, então as células de Kupffer ativam as células T CD4 + que ativam células T natural killer (NKT), que determina lesões nas células endoteliais sinusoidais (SEC) e dos hepatócitos, seguido por ativação de neutrófilos, adesão e transmigração causando mais lesão celular 5
- Figura 2** - Ilustração de dois hemicanais ou Connexon (hexágonos laranja), formado por seis conexinas (tubulares) fazendo a ligação entre duas células (membranas amarelo e azul). Ao lado a esquematização do citoplasma com o Loop da conexina (vermelho) 6
- Figura 3** - **a)** Representação estrutural das conexinas, demonstrando a presença de 4 domínios transmembrânicos, 2 alças extracelulares e alça intracelular. **b)** Representação esquemática das possíveis organizações das conexinas para formar *connexons* homo e heteroméricos; e de *connexons* para formar canais homo e heterotípicos 8
- Figura 4** - Caixas de policarbonato na sala com fotoperíodo de 12 horas de claro e 12 horas de escuro, sob condições controladas de temperatura (22 +- 2 graus Celsius) e umidade relativa do ar (45-60%) 16

Figura 5 - Fluxograma dos grupos dos experimentos	18
Figura 6 - Equipamento de anestesia Sommo Suite (small animal anesthesia system) máscara nasal, cama térmica, oxímetro, termômetro, material cirúrgico e microscópio óptico	19
Figura 7 - Afastamento por pinças expondo o Clampe locado abaixo do lobo lateral direito, comprimindo tríade portal	21
Figura 8 - À esquerda, o desenho com vista ventral do fígado de rato selvagem antes do clampeamento. Observa-se exposição da veia porta (azul), artéria hepática (vermelho) e ducto biliar comum (verde). Após clampeamento da tríade (observa-se pinça - cinza sob veia porta). Indução da isquemia e mudança de cor (marrom claro) do lobo esquerdo lateral e do lobo medial do fígado	22
Figura 9 - Fígado de camundongo selvagem, após 1 hora de isquemia (clampeamento da tríade) observa-se mudança de cor da área da isquemia (vermelho claro) do lobo esquerdo lateral e do lobo medial do fígado (70% do fígado)	22
Figura 10 - Antes da retirada com clampeamento e isquemia lobular visível	23
Figura 11 - Comparação dos resultados da enzima hepática (ALT) entre o grupo geneticamente modificado, Knockout heterozigoto para Cx43 (GM) e o grupo controle, selvagens	29
Figura 12 - Comparação dos resultados da enzima hepática (AST) entre o grupo geneticamente modificado, Knockout heterozigoto para Cx43 (GM) e o grupo controle, selvagens	30
Figura 13 - Comparação dos resultados da enzima hepática (GGT) entre o grupo geneticamente modificado, Knockout heterozigoto para Cx43 (GM) e o grupo controle, selvagens	31

- Figura 14** - Aspecto microscópico de fígado de camundongo Knockout heterozigoto para Cx43 submetido à isquemia hepática durante 60 minutos seguida por 24 horas de reperfusão. Pode-se observar a presença de necrose hepatocelular grave e células inflamatórias sinusoidais (hematoxilina-eosina; **1** aumento de 100X e **2** aumento de 400X). 32
- Figura 15** - Aspecto microscópico de fígado de camundongo Knockout selvagem submetido à isquemia hepática durante 60 minutos seguida por 24 horas de reperfusão. Pode-se observar discreta desorganização parenquimatosa e degeneração vacuolar. Ausência de necrose hepatocelular (hematoxilina-eosina; **1** aumento de 100X e **2** aumento de 400X). 32
- Figura 16** - Mecanismo de ação do Carbenoxolone, inibindo hemicanal e junção Gap e do TAT-Gap 19 inibindo seletivamente o hemicanal 38
- Figura 17** - Estrutura de uma conexina, composta por 2 *loops* extracelular e um intracelular, 2 *tails* intracelular. Pode-se observar o local de ação dos Peptídeos miméticos e a sequências de aminoácidos 39

TABELA

Tabela 1 -	Expressão das conexinas nos diferentes tipos celulares hepáticos	10
-------------------	--	----

RESUMO

Trevisan AM. *Avaliação da lesão após isquemia e reperfusão hepática em modelos experimentais com camundongos knockout heterozigotos para expressão da conexina 43* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

As conexinas são as principais proteínas componentes das junções do tipo GAP no fígado. Existem poucos estudos sobre o papel das junções GAP nas lesões hepáticas, principalmente nas células não-parenquimatosas. O processo de isquemia e de reperfusão (IR) é um fenômeno complexo que está muito presente na prática clínica e envolve inúmeras vias metabólicas, e acredita-se que a comunicação celular parece ser uma via importante de interação entre células hepáticas, que respondem às alterações da homeostase e insultos. O objetivo da pesquisa foi comprovar a participação da conexina Cx43 na lesão de IR hepática, em um modelo experimental em roedores. A utilização de animais deficientes para Cx43 (“Knockout” heterozigotos Cx43+/-) permitiu verificar a evolução da lesão de IR, na deficiência desta conexina. A lesão de IR foi induzida pelo clampeamento do pedículo hepático durante uma hora. Realizou-se então a comparação dos níveis de enzimas hepáticas entre os animais “Knockout” e o grupo controle. Com isso se comprovou que a presença da Cx43 melhora o prognóstico em lesões hepáticas. Atualmente, com medicações capazes de bloquear ou aumentar a presença da Cx43 e, tendo em vista os altos índices de doenças hepáticas no Brasil e no mundo, esta é uma importante contribuição nesta área do conhecimento.

Descritores: Junções comunicantes; Conexina 43; Isquemia; Reperfusão; Fígado; Comunicação celular; Camundongos knockout; Modelo experimental.

ABSTRACT

Trevisan AM. *Evaluation of injury following ischemia and hepatic reperfusion in experimental knockout heterozygous mouse models for expression of connexin 43* [Thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2018.

Connexins are the main protein components of the gap junctions in the liver. There are few studies on the role of gap junctions on liver injury, and they are mainly on non-parenchymal cells. The process of ischemia and reperfusion (IR) is a complex phenomenon that involves many metabolic processes, and we believe that cellular communication is an important interaction mechanism between hepatic cells that respond to alteration of homeostasis and insults. The aim of the project was to prove that connexin Cx43 plays an important role in lesions in hepatic IR in experimental rodent models. The use of Cx43 deficient models (knockout heterozygous Cx43+/-) allowed us to verify the evolution of the liver injury from IR in the deficiency of this connexin. The IR lesion was induced by clamping the hepatic pedicle for one hour. We then carried out a comparison of the levels of hepatic enzymes between the knockout mice and the control group. This demonstrated that the presence of Cx43 altered the prognosis for liver injury. Given that there are medications capable of blocking or increasing the presence of Cx43 selectively or not, and bearing in mind the high rates of hepatic pathologies in Brazil and the rest of the world, this article contributes to understanding of the participation of connexin 43 in liver injury during ischemia and reperfusion.

Descriptors: GAP junctions; connexin 43; ischaemia; reperfusion; liver; cell communication; mice knockout, experimental model.

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

As cirurgias hepáticas, como o transplante e as ressecções, têm aumentado de maneira exponencial nas últimas décadas. Durante os procedimentos cirúrgicos, é de grande importância o controle do sangramento, através da exclusão total ou parcial do fluxo sanguíneo para o fígado (Fausto, 2000; Pacheco et al., 2001; Gurusamy et al., 2009; Haddad et al., 2015). Este procedimento leva à privação do aporte de oxigênio ao tecido remanescente, causando injúria tecidual (Ishikawa et al., 1999; Kohli et al., 1999; Daemen et al., 2002; Xiao et al., 2015).

Embora a restauração do fluxo sanguíneo, em um órgão isquêmico, seja essencial para prevenir dano celular irreversível, a reperfusão por si própria pode agravar o dano celular isquêmico. Por exemplo, as alterações histológicas induzidas por 3 horas de isquemia intestinal, seguidas por 1 hora de reperfusão, são mais graves do que as induzidas por 4 horas de isquemia intestinal isolada (Castro e Silva et al., 2002). Sabe-se que a isquemia hepática, ao mesmo tempo em que evita ou minimiza sangramentos durante a cirurgia, induz diferentes intensidades de sofrimento hepatocelular. Dentro de determinados limites, pacientes suportam melhor a isquemia hepática do que os efeitos deletérios de grandes hemorragias e consequentes transfusões de sangue e derivados (Makuuchi et al., 1989; Belghiti et al., 1996). Por outro lado, fígados esteatócitos, muito comuns na sociedade de hoje, estão mais suscetíveis (Andraus et al., 2010).

A lesão de isquemia e de reperfusão (IR) hepática pode ser conceituada como um conjunto de distúrbios circulatórios e metabólicos, que evolui com disfunção hepática e dano tissular secundário ao período sequencial de isquemia do fígado (em temperatura normal ou resfriado) seguido de sua reperfusão sanguínea (Vollmar et al., 1994). O dano decorrente de IR é uma das principais causas de má-função do enxerto após o transplante hepático e influencia diretamente a sobrevida dos pacientes. Os danos causados pela IR no fígado transplantado são complexos e pouco

compreendidos, envolvendo numerosas vias metabólicas e seus mecanismos fisiopatológicos ainda não estão totalmente esclarecidos.

1.1 Fisiopatologia da Isquemia e Reperfusão

A lesão celular provocada pela IR é condicionada pelo tempo de isquemia e pelo momento da reperfusão, podendo abranger desde alterações bioquímicas até necrose celular (Borghi-Scoazec et al., 1997; Collard; Gelman, 2001; Castro e Silva et al., 2002).

Na fase inicial de dano (até 2 h após reperfusão) ocorre edema das células de Kupffer (CK) e se observa desequilíbrio entre a produção de óxido nítrico (NO) e a produção de endotelinas, fatores que contribuem para a redução do lúmen sinusoidal e consequente disfunção microcirculatória. Estudos recentes mostram que o NO pode exercer efeito protetor sobre o fígado, reduzindo a produção de endotelinas e a disfunção microcirculatória. Os eventos que ocorrem nesta fase inicial desencadeiam vários processos de ativação e síntese de mediadores em cascata, que culminam com migração de neutrófilos na fase mais tardia (6 h a 24 h após a reperfusão) (Lentsch et al., 2000; Cottart et al., 2003; Miranda et al., 2004; Kurata et al., 2005; Massip-Salcedo et al., 2007). Os neutrófilos somados as células endoteliais sinusoidais irão determinar lesão na microcirculação. Os danos são muito semelhantes entre trinta e oitenta e cinco minutos (Huguet et al., 1992).

1.1.1 Citocinas envolvidas e recrutamento de neutrófilos na IR

Após as primeiras horas de reperfusão, as citocinas pró-inflamatórias, principalmente, o fator de necrose tumoral (TNF-alfa) e interleucinas (IL-6 e IL-1) recrutam e ativam células CD4+ (Linfócitos-T), as quais produzem GM-CSF (fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos, interferon-gama (IFN-gama) e fator de necrose tumoral-alfa (TNF-alfa). Estas citocinas participam facilitando a migração, a ativação e a adesão de neutrófilos aos sinusoides hepáticos (Lentsch et

al., 2000; Romanque et al., 2005; Massip-Salcedo et al., 2007). A interação entre neutrófilos e as células endoteliais sinusoidais é pré-requisito para o desenvolvimento da lesão da microvascularização. A adesão e a migração dos neutrófilos ativados através do endotélio leva à destruição de tecidos pela liberação de radicais livres, enzimas proteolíticas e peroxidase, mediados pelas ações do fator ativador de plaquetas (PAF) e de leucotrieno B4 (Miranda et al., 2004; Romanque et al., 2005).

1.1.2 Matriz Extracelular (MEC) e células estreladas hepáticas (HSCs)

O dano de IR com consequente estresse oxidativo tem sido apontado como uma das causas de fibrose hepática, seguida de uma fase citotóxica envolvendo células endoteliais sinusoidais e hepatócitos (Lu et al., 2002). As CK têm papel importante na lesão citotóxica inicial pela secreção de mediadores pró-inflamatórios (Hirokawa et al., 2002; Teoh; Farrell, 2003). A fibrose hepática é uma resposta comum a diferentes mecanismos de lesão crônica e ocorre como consequência da transformação de HSC em miofibroblastos com excessiva deposição de matriz extracelular (Jiang et al., 2004; Jeong et al., 2004; Kisseleva; Brenner, 2007; Cheng et al., 2008).

Trata-se de um processo dinâmico resultante do depósito excessivo de componentes da matriz extracelular do qual participam as HSCs, CK, citocinas e fatores de crescimento que determina um desequilíbrio dos mecanismos homeostáticos entre síntese e degradação de colágeno (Kisseleva; Brenner, 2007; Moreno; Battaler, 2008; Pereira et al., 2009).

Os eventos que se sucedem, após o dano hepático, levam à formação de corpos apoptóticos que são fagocitados pelas CK, HSCs e hepatócitos saudáveis. As CK e as HSCs liberam citocinas pró-fibrogênicas (TGF alfa-1 e proteína inflamatória dos macrófagos – MIP-2), causando ativação de HSCs que passam a sintetizar colágeno tipo I, cuja deposição leva à fibrose (Kisseleva; Brenner, 2007). As células mesenquimais hepáticas e hepatócitos hipóxicos também sintetizam TGF- β 1, que é um potente indutor de fibrogênese nas células efectoras de fibrose hepática (Figura 1).

Fonte: Datta et al., 2013.

Figura 1 - Diagrama esquemático de mecanismos celulares de lesão de reperfusão e isquemia hepática dentro de um sinusoide de fígado e da área circundante contendo hepatócitos. Inicial falha de perfusão sinusoidal devido ao tamponamento de plaquetas, então as células de Kupffer ativam as células T CD4 +, que ativam células T natural killer (NKT), que determina lesões nas células endoteliais sinusoidais (SEC) e dos hepatócitos, seguido por ativação de neutrófilos, adesão e transmigração causando mais lesão celular

Além das citocinas e outros fatores solúveis que agem promovendo a ativação e síntese de colágeno pelas HSC, que são capazes de estabelecer comunicações entre si (Bataller; Brenner, 2005) e com outras células do microambiente hepático. Estas interações celulares se fazem, frequentemente, por junções do tipo gap das quais participam as conexinas. Existem evidências que as interações entre HSC são importantes na regulação da ativação, do metabolismo e expressão de moléculas de superfície destas células. Entretanto, são poucos os trabalhos que estudaram estes aspectos após o dano hepático.

1.2 Comunicação celular

A comunicação celular é um pré-requisito básico para a manutenção da homeostase de um tecido em interação de diferentes redes de sinalização extracelular, intracelular e intercelular entre as células que o formam. Com o aparecimento de organismos multicelulares houve a necessidade de mecanismos que permitissem a comunicação celular direta, para que as células atuassem de maneira coordenada. Estes mecanismos de comunicação dependem da difusão intercelular de moléculas sinalizadoras e os outros requerem o contato célula-célula ou célula-matriz. A comunicação celular através dos canais das conexinas é imprescindível para uma correta coordenação e função da maioria dos tecidos (Bosco et al., 2011). Este é um tipo de comunicação intercelular. Esta comunicação entre duas células adjacentes, mediante o desenvolvimento de uniões intercelulares especializadas, denominadas complexos de adesão, permite a formação de canais de comunicação direta (Figura 2) (Wang et al., 2013).

Fonte: Wang *et al.*, 2013.

Figura 2 - Ilustração de dois Hemicanais ou Conexon (hexágonos laranja), formado por seis conexinas (tubulares) fazendo a ligação entre duas células (membranas amarelo e azul). Ao lado a esquematização do citoplasma com o Loop (extracelular) da conexina (vermelho)

Os complexos de adesão proporcionam uma firme estrutura ao tecido (uniões aderentes, uniões estreitas e desmossomas), permitindo que as células adjacentes se mantenham muito próximas entre si e possam formar canais de conexinas (Cxs) entre ambas as células que permitem o contato entre citoplasmas celulares (uniões comunicantes, UCs). As UCs são formadas por dois hemicanais e estes por seis proteínas cada (Cxs). As Cxs estão inseridas na membrana celular e alinhadas com as outras células em uma precisão tal, que a luz de uma se une com a da outra. Elas formam uma união entre as células, levando a um espaço de 2 nm, bem menor do que os 25 nm comumente formados. Quando essa conexão se abre proporciona o transporte de íons entre os citoplasmas. Permite também a conexão elétrica entre as células, que se unem facilitando, por exemplo, conexões sinápticas elétricas diretas em que o potencial de ação não necessitará de um mensageiro químico entre o espaço sináptico.

1.2.1 Conexinas

As conexinas são proteínas localizadas entre as membranas celulares. São responsáveis pela comunicação célula-célula, extracelular e intracelular (Bai; Wang, 2014). Classificadas de acordo com o peso molecular (de 26 a 59 kDa), precedido por Cx, por exemplo: Cx 26, Cx 43, Cx 32. Hoje em dia já foram catalogados 21 tipos (Beyer et al., 1987).

A primeira descrição das junções *gap* foi realizada por Loewenstein et al. (1965). Loewenstein e Kanno em 1967 demonstraram a incapacidade de troca de íons entre células tumorais hepáticas de ratos. No mesmo ano, Revel e Karnovsky apresentaram a estrutura hexagonal das subunidades presentes nas junções intercelulares da membrana plasmática de hepatócitos, que receberam a denominação de canais comunicantes do tipo *gap*. Alguns anos depois, Goodenough (1974) isolou e apresentou as duas proteínas presentes nas junções comunicantes de hepatócitos de camundongo, com pesos moleculares de 26 e 32 kDa, sendo denominadas de conexinas (Cx).

Em resumo, as conexinas possuem três funções básicas: 1 - formar os hemicanais que permitem a comunicação entre a célula-célula, célula e a matriz extracelular e intracelular; 2 - formar as Unidades Comunicantes que permitem a transferência de pequenas moléculas entre células adjacentes; e 3 - exercem funções de forma independente na atividade de canais, podendo controlar a proliferação celular (Eiberger et al., 2001). Várias conexinas apresentam expressão tecido-específica, por outro lado, muitos tecidos apresentam expressão de diferentes conexinas. (Martin PEM, 2018)

As conexinas podem interagir entre si, formando *conexons* homoméricos (formado por 6 conexinas iguais) ou heteroméricos (formados por 6 conexinas diferentes). Por sua vez, os *conexons* também podem interagir entre si, constituindo canais homotípicos (formados por *conexons* iguais) ou heterotípicos (formados por *conexons* diferentes) (Figura 3). Estas diferentes combinações resultam em diferentes funções das junções gap formadas, pois cada Cx possui diferentes propriedades na permeabilidade, condutividade, condutância e abertura do canal (Hanner et al., 2010).

Fonte: Mese et al., 2008.

Figura 3 - **a)** Representação estrutural das conexinas, demonstrando a presença de 4 domínios transmembrânicos, 2 alças extracelulares e 1 alça intracelular. **b)** Representação esquemática das possíveis organizações das conexinas para formar *conexons* homo e heteroméricos; e de *conexons* para formar canais homo e heterotípicos

1.2.1.1 *Conexina 43*

A Cx 43 está presente em vários tipos celulares (Tabela 1). Foi descrita, pela primeira vez, em 1987 por Beyer et al., em miocárdio de rato (Beyer et al., 1987). Posteriormente, em 1990, Jhappan et al. descreveram a longitude total do transcrito primário da Cx43 no miocárdio humano e no de rato. O gene da Cx43 em humanos se localiza no cromossomo 6 (6q22.31;ID: 2697), dando lugar a um transcrito de 14.168 pb, que se traduz em 382 aminoácidos. A Cx43 é fosforilada ao longo do ciclo de vida, sofrendo mudanças conformacionais, resultando em diferentes isoformas (P0, P1 e P2), apresentando propriedades distintas (Miranda, 2011).

1.2.2 Interações celulares e expressão de conexinas no fígado

As conexinas (Cx) são as principais proteínas componentes das junções intercelulares encontradas no fígado e estão localizadas na membrana plasmática das células. As Cx32 e Cx26 são expressas por hepatócitos: a primeira se encontra uniformemente distribuída em todas as regiões do fígado, enquanto a segunda é preferencialmente expressa na região acinar periportal (Wekerle et al., 1994; Maes et al., 2014).

As células endoteliais das artérias e veias hepáticas expressam Cx37 e Cx40, enquanto a maioria das células não parenquimatosas expressam Cx43, incluindo as células estreladas hepáticas (HSCs) (Vinken et al., 2013), CKs, colangiócitos, células ovais/progenitoras e células mesoteliais da cápsula de *Glisson*. Alguns relatos ocasionais descrevem a expressão da Cx26 nas células sinusoidais endoteliais, com baixíssima expressão de Cx43 ou Cx32 (Byrd et al., 2005; Crespo Yanguas et al., 2016) (Tabela 1).

Tabela 1 - Expressão das conexinas nos diferentes tipos celulares hepáticos

Células Hepáticas	Conexinas (Cx)
Hepatócitos	32 e 26
Colangiócitos	43 e 32
Células estreladas (Ito)	43 e 26
Células de <i>Kupffer</i>	43 e 26
Células endoteliais sinusoidais	26, 43/32
Células endoteliais de vasos e artérias	43
<i>Células mesoteliais (cápsula de Glisson)</i>	43

Fonte: (modificado por Crespo Yanguas et al., 2016)

O primeiro relato sobre a comunicação intercelular mediada pelas junções gap nas HSCs, antigamente conhecidas como células de Ito ou lipócitos, foi realizado por Geerts et al. (1993). Anos mais tarde, Byrd et al. (2005) mostraram que as HSCs quiescentes (ou seja, ainda armazenadoras de vitamina A em lipossomos) expressam Cx43 e uma pequena quantidade de Cx26. Quando estas células são ativadas em miofibroblastos apresentam aumento na expressão da Cx43 com localização preferencial na superfície celular, e aumento na expressão de Cx26, porém localizada ao redor do núcleo.

Os estudos relativos às conexinas e às doenças hepáticas não avaliaram em particular a Cx43 e, mais especificamente, em fígados que sofreram injúria de IR. Os estudos de IR hepática se restringiram às proteínas Cx26 e Cx32 até o presente momento.

A alteração dos complexos de adesões das UCs afeta a função do tecido e sua resposta a diferentes injúrias podendo agravar uma lesão ou desencadear o desenvolvimento de doenças (Liu et al., 2005). O fígado tem uma conhecida capacidade de regeneração perante as agressões causadas por ressecções cirúrgicas, transplantes, traumas, infecções ou intoxicações medicamentosas que pode ser bastante influenciada por fatores ainda não bem avaliados como a presença aumentada da Cx43 ou sua inibição (Fausto, 2000; Salomão *et al.*, 2012).

1.3 Justificativa do Estudo

Como demonstrado, a Cx43 está amplamente presente no fígado e desempenha papéis fundamentais em outros órgãos. A IR do fígado está presente na prática clínica em inúmeros procedimentos, como ressecções hepáticas e transplantes.

Na literatura não são encontrados estudos que avaliem o papel da Cx43 nas lesões de IR hepática até o presente momento.

2 OBJETIVO

2 OBJETIVO

Avaliar as alterações histoquímicas do fígado de camundongos com diminuição da expressão de conexina 43 (knockout heterozigoto) à lesão de isquemia e reperfusão.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho experimental foi realizado no LAPMOL (Laboratório de Patologia Morfológica e Molecular, Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, USP) em parceria com Laboratório de Investigação Médica - LIM 37 (Laboratório de Transplante e Cirurgia de Fígado) na FMUSP (Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo) e CETEC (Centro de Experimentação e Treinamento em Cirurgia) do Hospital Israelita Albert Einstein, na cidade de São Paulo.

3.1 Animais geneticamente modificados

Camundongos, geneticamente modificados, heterozigotos para o gene Cx43 foram originalmente estabelecidos por Reaume et al, (1995) e adquiridos do Laboratório Jackson (Paris) pela International Agency for Research on Cancer (IARC), Lyon, França. Estes animais foram gentilmente doados pelo Dr. Hiroshi Yamasaki ao Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP).

O background genético original destes camundongos foi proveniente da linhagem C57BL/6, a qual foi cruzada com camundongos CD1 para gerar camundongos heterozigotos (Cx43^{+/-}), deficientes em um dos alelos do gene da Cx43, e com background genético da linhagem CD1. Como os camundongos knockout homozigotos para Cx43 (Cx43^{-/-}) morrem ao nascer devido a malformação cardíaca (Reaume et al., 1995), neste trabalho foram utilizados camundongos Knockout heterozigotos (deficientes em Cx43^{+/-}) e selvagens (wild-type; Cx43^{+/+}).

Os animais permaneceram em caixas de policarbonato, em sala com fotoperíodo de 12 horas de claro e 12 horas de escuro, sob condições controladas de temperatura (22 +- 2 graus Celsius) e umidade relativa do ar (45-60%). Os animais

receberam água (filtrada pH $\pm$ 7,0) e ração (Nuvilab CR1, Nuvital Nutrientes Ltda, Brasil) *ad libitum* por todo o período experimental. Os animais eram provenientes do biotério do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP).

Figura 4 - Caixas de policarbonato, em sala com fotoperíodo de 12 horas de claro e 12 horas de escuro, sob condições controladas de temperatura (22 ± 2 graus Celsius) e umidade relativa do ar (45-60%)

3.2 Genotipagem

Para a identificação e controle do genótipo dos animais, que foram utilizados neste experimento, se utilizou um fragmento de 0,5 cm da cauda de cada animal. O fragmento foi digerido em tampão de extração (acrescido de proteinase K), durante 2 horas em banho-maria a 65°C para a extração do DNA. Após a digestão, foi

adicionado tampão de lise, homogeneizado e as amostras foram centrifugadas durante 20 minutos (15.000 rpm e a 4°C). Cerca de 200 µL da fase aquosa foi transferido para um novo tubo, sendo adicionado 400 µL de etanol absoluto e 20 µL de acetato de sódio 3M (pH 5,2) a fim de precipitar o DNA. Após centrifugação por 10 minutos e 5.000 rpm (4°C), o DNA foi lavado com etanol 70% e dissolvido em 200 µL de TE (Tris/EDTA). Após a quantificação no biofotômetro, o DNA de cada camundongo foi analisado por PCR com primers para o gene: **Cx 43**.

Senso 5'CCCCACTCTCACCTATGTCTCC3'

AntiSenso5'ACTTTTGCCGCCTAGCTATCCC3'

A reação da polimerase em cadeia (PCR) para a Cx43 foi realizada durante 1 ciclo, na condição de 94 °C por 2 minutos, 35 ciclos a 94 °C por 30 s, 55 °C por 1 minuto, 72 °C por 4 minutos, 1 ciclo a 72 °C por 4 minutos e 1 ciclo a 4 °C por 60 minutos.

3.3 Delineamento experimental

Neste trabalho foram utilizados camundongos machos, adultos, com dezoito semanas de idade, pesando 30±2 g, deficientes em Cx43^{+/-} heterogêneos e selvagens (*wild-type*; C57 BL/6Cx43^{+/+}).

É recomendado o mesmo sexo e idade, pois pode haver diferenças na resposta da injúria hepática (Schulz et al., 2015). Os animais foram alocados por sorteio em três grupos experimentais:

- a) **Grupos controles (Cx43^{+/+}-SHAM)**: nos quais os animais foram anestesiados e não submetidos à lesão de IR (laparotomia simples com manipulação de órgãos abdominais). O grupo foi formado por 1 animal por subgrupo. Subgrupos: 1 e 24 horas.

- b) **Grupos IR (Cx43^{+/+})**: foi realizada uma laparotomia mediana, na qual os ligamentos do fígado foram seccionados e as estruturas do hilo portal do lobo hepático mediano e lateral foram “*clampeados*” por 60 minutos (Isquemia). Depois de provocada a isquemia hepática, a cavidade abdominal foi fechada (início da contagem do tempo de reperfusão) em plano único e os animais foram divididos em Subgrupos: 1 e 24 horas (horas = tempo de reperfusão). O subgrupo de uma hora após a isquemia foi formado por 6 animais e o de 24 horas por 10 animais em um total de 16.
- c) **Grupos IR (Cx43^{+/-})**: o procedimento cirúrgico e os tempos de isquemia e reperfusão foram os mesmos dos subgrupos do grupo “b” (Tabela 2). O subgrupo de uma hora após a isquemia foi formado por 6 animais e o de 24 horas por 10 animais em um total de 16.

Figura 5 - Demonstração da quantidade de animais necessária para satisfazer os tempos de reperfusão, em cada grupo especificado

Para o procedimento cirúrgico foi desenvolvido um PROTOCOLO desde indução anestésica até cuidados pós-operatórios (Abe et al., 2009). Alimentação básica, com ração e água, foi mantida a vontade até o momento do procedimento. Durante o procedimento cirúrgico, clampeamento e reperfusão, os camundongos foram mantidos em temperatura controlada através do uso de Cama térmica.

Os animais foram anestesiados com isoflurano, via inalatória através de equipamento específico de anestesia em roedores (Foto 1).

A dosagem do isoflurano (difluorometil 1-cloro-2,2,2-trifluoretil éter) na indução pré-anestésica é de 5% dentro de uma câmara, depois foi mantido com 2,5%, sendo que a dose poderia ser aumentada ou diminuída, conforme o tempo do procedimento ou as reações dos cobaias.

© 2013 Kent Scientific Corporation, Documentation Version 2.12.07

Figura 6 - Equipamento de anestesia Sommo Suite (small animal anesthesia system) máscara nasal, cama térmica, oxímetro, termômetro, material cirúrgico e microscópio óptico

Depois de anestesiados, os animais foram imobilizados através das patas traseiras e dianteiras, sendo afastadas e fixadas. Realizou-se o procedimento de tricotomia de todo o abdome, e na sequência a assepsia com Clorexidina aquosa 0,2%, tendo sido realizada uma incisão mediana de 3 cm no meio do abdome e finalizado até o processo xifoide. Detalhe importante envolve não estender a incisão mais acima, pois poderia atingir vasos o que acarretaria em um indesejável sangramento ativo.

A dissecação sempre foi feita com hastes flexíveis com pontas de algodão (cotonetes) umedecidos com solução fisiológica aquecida. Foram usadas 2 gazes umedecidas do lado direito da incisão (esquerdo do camundongo) para fixação das estruturas. Reiniciou-se a dissecação até expor a veia porta e estruturas adjacentes. Caso a tríade portal não estivesse seguramente visível se poderia seccionar o ligamento (usando tesoura) entre o lobo quadrado e o lateral esquerdo.

Depois da exposição adequada se fez o clampeamento com a pinça não traumática nas estruturas expostas (veia porta, artéria hepática e ducto biliar) logo abaixo do lobo lateral direito (Foto 2). Caso o clampe estivesse no local desejado, imediatamente se observa o clareamento dos lobos medial e lateral esquerdo (70% do fígado) (Figura 4).

Camundongo selvagem (wild-type)

Figura 7 - Afastamento por pinças expondo o “Clamp” locado abaixo do lobo lateral direito, comprimindo tríade portal

Quando não ocorre esta alteração de coloração, o clampeamento é refeito. Esta manobra cirúrgica exige muito cuidado devido à fragilidade das estruturas vasculares hepáticas no camundongo. Enquanto foram aguardados 60 minutos de isquemia, a temperatura da cobaia teve de ser mantida, sendo utilizada a manta térmica e solução fisiológica aquecida no peritônio. Gazes umedecidas foram mantidas recobrimdo o intestino. Depois da retirada da pinça foi possível observar a revascularização hepática, o padrão respiratório e então foi feita sutura na musculatura e pele com Mononylon 4-0. Não houve necessidade de curativo oclusivo

Os cuidados pós-operatórios envolveram analgésico, controle térmico e inspeção da ferida operatória. Todos os grupos foram sacrificados por overdose de isoflurano, logo após o período destinado de reperfusão. O descarte foi recolhido como lixo hospitalar, seguindo as regras estabelecidas.

Fonte: Abe et al., 2009

Figura 8 - À esquerda o desenho com vista ventral do fígado de rato selvagem antes do clampeamento. Observa-se exposição da veia porta (azul), artéria hepática (vermelho) e ducto biliar comum (verde). Após clampeamento da tríade (observa-se pinça - cinza sob veia porta). Indução da isquemia e mudança de cor (marrom claro) do lobo esquerdo lateral e do lobo medial do fígado

Figura 9- Fígado de camundongo selvagem, após 1 hora de isquemia (clampeamento da tríade) observa-se mudança de cor da área isquêmica (vermelho claro) do lobo esquerdo lateral e do lobo medial do fígado (70% do fígado)

Figura 10 - Antes da retirada com clampeamento e isquemia lobular visível

3.4 Análise bioquímica

Após anestesia e antes da eutanásia, 1 ml de sangue dos animais foi coletado por punção cardíaca para avaliação da funcionalidade hepática. O material foi centrifugado e o soro armazenado em freezer -80 °C. Foram analisados os seguintes parâmetros bioquímicos: FA, ALT, AST e GGT. As análises foram feitas em analisador bioquímico automático Vet Test 8008 (*QBC Analyzer, IDEXX Laboratories Ltd, Chalfont St Peter, UK*).

Segundo alguns autores, as aminotransferases são, atualmente, os marcadores mais sensíveis da lesão isquemia / reperfusão do fígado (Bulkley, 2000; Clavien et al., 2000).

3.5 Exame histopatológico do fígado

Após o sacrifício o fígado foi retirado, cortado e fixado em solução de Formol 10% e foram aguardadas 24 horas para fixação, os fragmentos foram processados e incluídos em paraplast histológico, sendo obtidos cortes de 5 μ m em micrótomo e, então, corados pelas técnicas de hematoxilina-eosina (H.E.) e picrossírius para avaliação histopatológica.

Este procedimento foi realizado em todos os camundongos Knockout que mantiveram o mesmo padrão histopatológico descrito na Foto 5. Por problemas técnicos, apenas duas lâminas dos Selvagens foram lidas, não podendo assim realizar um trabalho estatístico com estas informações.

3.6 Análise estatística

Análise descritiva: média, DP, mediana e percentis. Estatística não paramétrica: 2 grupos independentes (Wilcoxon-Mann-Whitney).

4 ASPECTOS ÉTICOS

4 ASPECTOS ÉTICOS

Todos os procedimentos foram realizados em conformidade com as legislações vigentes no Brasil, Lei nº. 6638 (Diário Oficial da União – 08/05/1979), que estabelece normas para práticas didático-científicas da vivisseção de animais, assim como regulamenta o registro dos biotérios e centro de experimentação.

Atendendo ao decreto que estipula ser o exercício da medicina de animais de laboratório atividade profissional privativa do médico veterinário – Decreto Lei nº 6.4704 de 17/06/1969 (Capítulo II artigo segundo itens “c” e “d”) – de modo que todo o biotério deve ter médico veterinário especializados em animais de laboratório para supervisão do mesmo.

Todos os procedimentos operacionais foram embasados em *Guide for the care and use for Laboratory animals* – ILAR/EUA e manual para técnicos em bioterismo (COBEA – Brasil), em acordo com o *Ethical Guidelines for Investigation of Experimental Pain in Conscious Animals*, como indicado pela *Internacional Association for the Study of Pain* (IASP). Essas diretrizes obedecem às normas propostas pela Declaração Universal dos Direitos dos Animais (Unesco - 27/01/1978) e Princípios Internacionais orientadores para pesquisa Biomédica envolvendo animais (*Council for Internacional Organizations of Medical Sciences* – CIOMS) (Pinto Kruel et al., 2007).

CERTIFICADO DE BIOSSEGURANÇA E NORMAS PARA A 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), 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 na área de criação do Biotério da FMVZ–USP, que foi especialmente preparada para recebê-los. Para tanto, foram vedadas todas as possíveis passagens de insetos e de camundongos, encontrando-se os animais em caixas com filtros apropriados. Havia cartazes indicativos da presença deles nos locais em que foram manipulados.

DTpPEP - Centro de Bioterismo da FMUSP com número 6033 e nome cadastrado como PROJETOFSPP 0034/17 LIM37 , número da CEUA 0034/17

- DOCUMENTO = APÊNDICE

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

O modelo experimental para IR parcial (70%) em camundongos se mostrou efetivo para a avaliação proposta e factível não apresentando mortalidade durante o procedimento.

Avaliamos estatisticamente a comparação das enzimas hepáticas entre um grupo de camundongos modificados (GM) e um grupo de camundongos selvagens, submetidos a 1 hora de isquemia e sacrificados após 24 horas de reperfusão.

	GM					Selvagem				
	Média	DP	Median a	P25	P75	Média	DP	Median a	P25	P75
ALT	4166	3763	1592	1424	7404	307	318	187	75	397
AST	7231	7738	2522	1648	15892	471	256	447	217	658
GGT	9,4	5	7,6	7,2	12	1,7	1,6	1,1	0,6	2,4

Classificações				
	grupo	N	Mean Rank	Sum of Ranks
ALT	GM	10	15,50	155,00
	Selvagem	10	5,50	55,00
	Total	20		
AST	GM	10	15,50	155,00
	Selvagem	10	5,50	55,00
	Total	20		
GGT	GM	9	14,67	132,00
	Selvagem	10	5,80	58,00
	Total	19		

Test Statistics ^a			
	ALT	AST	GGT
Mann-Whitney U	,000	,000	,000
Wilcoxon W	55,000	55,000	58,000
Z	-3,780	-3,780	-3,431
Sig. Assint. (2 caudas)	,000	,000	,001
Sig exata [2*(Sig. de 1-cauda)]	,000 ^b	,000 ^b	,000 ^b

a. Variável de agrupamento: grupo
b. Não corrigido para vínculos.

Figura 11 - Comparação dos resultados da enzima hepática (ALT) entre o grupo geneticamente modificado, Knockout heterozigoto para Cx43 (GM) e o grupo controle, selvagens

Na avaliação da lesão hepática após IR, através da medida de ALT, o grupo Knockout heterozigoto, ou seja, com menor expressão da Cx43, mostrou valores significativamente maiores, quando comparado com o grupo controle selvagem.

Quando usada a AST, para avaliar a lesão hepática por IR, notou-se uma diferença semelhante do que encontrado com a ALT, com um p próximo de zero (Figura12). Também na avaliação da GGT foi observada uma diferença significativa com $p = 0,001$, entretanto confirmando que no grupo com menor expressão da Cx43 a lesão é significativamente maior (Figura 13).

	GM					Selvagem				
	Média	DP	Median a	P25	P75	Média	DP	Median a	P25	P75
ALT	4166	3763	1592	1424	7404	307	318	187	75	397
AST	7231	7738	2522	1648	15892	471	256	447	217	658
GGT	9,4	5	7,6	7,2	12	1,7	1,6	1,1	0,6	2,4

Classificações				
grupo	N	Mean Rank	Sum of Ranks	
ALT GM	10	15,50	155,00	
ALT Selvagem	10	5,50	55,00	
ALT Total	20			
AST GM	10	15,50	155,00	
AST Selvagem	10	5,50	55,00	
AST Total	20			
GGT GM	9	14,67	132,00	
GGT Selvagem	10	5,80	58,00	
GGT Total	19			

Test Statistics ^a			
	ALT	AST	GGT
Mann-Whitney U	,000	,000	,000
Wilcoxon W	55,000	55,000	58,000
Z	-3,780	-3,780	-3,431
Sig. Assint. (2 caudas)	,000	,000	,001
Sig. exata [2*(Sig. de 1-cauda)]	,000 ^b	,000 ^b	,000 ^b

a. Variável de agrupamento: grupo
b. Não corrigido para vínculos.

Figura 12 - Comparação dos resultados da enzima hepática (AST) entre o grupo geneticamente modificado, Knockout heterozigoto para Cx43 (GM) e o grupo controle, selvagens

Figura 13 - Comparação dos resultados da enzima hepática (GGT) entre o grupo geneticamente modificado, Knockout heterozigoto para Cx43 (GM) e o grupo controle, selvagens.

Nos 2 camundongos do grupo Shan, tanto com sacrifício após 1 hora e após 24 horas tiveram uma variação das ALT, AST e GGT dentro dos padrões da normalidade.

Conforme esperado, os grupos avaliados após 1 hora de reperfusão, não possuem uma diferença estatisticamente significativa. Camundongos selvagens com uma média de ALT de 74,6 U/L e AST de 49,3 U/L enquanto o grupo de camundongos Knockout heterozigotos para Cx43 tiveram um resultado médio de 79,4 U/L na ALT e 52,3 U/L na AST.

Foram coletadas amostras para exame de histopatologia de todos os camundongos, mas foi possível a interpretação adequada apenas nas amostras dos camundongos Knockout, após 24 h de isquemia, que mantiveram um padrão histopatológico com desorganização parenquimatosa intensa e necrose grave em 100% das amostras (Figura 14). Enquanto no grupo controle de camundongos selvagens, apenas duas amostras coletadas foram factíveis de ser realizado o estudo histopatológico. No procedimento de fixação do material ocorreu um erro o que impossibilitou adequada interpretação das demais lâminas. Nestas duas amostras foi verificado uma desorganização parenquimatosa discreta sem localizar áreas de necrose (Figura 15). Apesar de não ter sido possível realizar um trabalho estatístico com estas informações, foi evidente a grande diferença entre os grupos nas amostras coletadas, em que se notou uma intensa degeneração nos camundongos com deficiência da Cx43.

Figura 14 - Aspecto microscópico de fígado de camundongo Knockout heterozigoto para Cx43 submetido à isquemia hepática durante 60 minutos seguida por 24 horas de reperfusão. Pode-se observar a presença de necrose hepatocelular grave e células inflamatórias sinusoidais (hematoxilina-eosina; **1** aumento de 100X e **2** aumento de 400X).

Figura 15 - Aspecto microscópico de fígado de camundongo Knockout selvagem submetido à isquemia hepática durante 60 minutos seguida por 24 horas de reperfusão. Pode-se observar discreta desorganização parenquimatosa e degeneração vacuolar. Ausência de necrose hepatocelular (hematoxilina-eosina; **1** aumento de 100X e **2** aumento de 400X).

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Foram encontrados resultados estatisticamente significativos demonstrando que na lesão por IR, em fígado de camundongos deficientes da Cx43 (knockout heterozigotos), estes desenvolveram maior lesão quando comparados com os camundongos selvagens (grupo controle).

Com base em conhecimento da literatura, este foi o primeiro trabalho que estudou a lesão hepática em animais com deficiência da Cx43.

A escolha pelos animais (“Mus Musculus”) usados no projeto ocorreu por vários motivos, entre estes o fato da continuação de um trabalho já desenvolvido no serviço com estudo das conexinas no fígado de camundongos. Por ser este modelo de animal mais utilizado no mundo para experimentos, que tem correspondência em seres humanos (Capecchi, 2005) e apresenta grandes vantagens, como ser evolutivamente muito semelhante aos humanos, ativação gênica e evolução embriológica, que lembra muito o desenvolvimento humano. Um dos menores mamíferos do mundo com uma geração de descendentes rápida e numerosa (Mazzaccara et al., 2008). Neste caso, principalmente, o fato dos camundongos possuírem uma linhagem Knockout heterozigótica com deficiência na Cx43. Os canais de Cx43 exercem importantes funções mediando a comunicação celular em tecidos dos sistemas, como: vascular, digestivo, reprodutor e o nervoso (Nielsen et al., 2012).

A Cx43 está implicada com o desenvolvimento normal do coração. Este fato foi inicialmente observado quando ratos *Knockout* homozigotos para Cx43 morriam ao nascer, devido a uma obstrução da saída do ventrículo esquerdo (Stone, 1995; Reaume et al., 1995). Nos vasos sanguíneos, a Cx43 participa da regulação da pressão sanguínea e, no sistema vascular, a Cx43 permite a propagação do potencial de ação entre os cardiomiócitos, junto com a Cx40 e a Cx37. Já foi descrita a presença da Cx43, em âmbito mitocondrial nos cardiomiócitos, nos quais exerce uma função protetora essencial para a sobrevivência após um processo de isquemia, associada à proteção que exerce no pré-condicionamento, o qual permite as células

aumentarem sua resistência ao processo isquêmico (Rodrigues-Sinovas et al., 2004; Boengler et al., 2005). A expressão Cx43 no fígado é modificada quando ocorrem agressões às células do órgão. Ratos submetidos a diferentes modelos de indução de colestase apresentaram aumento transitório da expressão de Cx43 no fígado (Remirez et al., 2002). Também foi demonstrado que os colangiócitos obtidos de animais com lesão hepática expressam *in vivo* ou quando cultivados *in vitro* a conexina Cx43 (She et al., 2002). Outras populações celulares como as células ovais (Zhang; Thorgeisson, 1994) e as células mesoteliais da cápsula de Glisson também expressam Cx43 (Vinken et al., 2013).

Em 2008, o grupo de Koch et al. fez a importante observação de que a expressão de Cx43 está associada ao estabelecimento de comunicações intercelulares funcionais entre as células de Kupffer ativadas. Os autores mostraram que condições inflamatórias *in vivo* ou *in vitro* induzem a expressão de Cx43 e a ativação de CKs que estabelecem junções funcionais.

As HSCs têm importante participação na fisiopatogenia de doenças hepáticas. Quando ativadas e diferenciadas em miofibroblastos, estas células são as principais responsáveis pela produção e pela degradação de componentes da matriz extracelular (MEC) hepática localizada nas regiões peri sinusoidais ou nos septos fibrosos (Friedman, 2008). As HSCs ativadas expressam quantidade significativa de Cx43 e estabelecem eficiente comunicação celular apenas entre si (Byrd et al., 2005).

Xu et al. (2009) mostraram que a expressão da Cx43 nas HSCs pode ser modulada pelos níveis de TGF β -1 e que a expressão da Cx43 interfere diretamente na proliferação destas células. O tratamento *in vitro* das HSCs com TGF β -1 (citocina com ação pró-fibrogênica) reduziu a expressão gênica da Cx43, associada ao aumento em sua fosforilação e consequente redução da comunicação intercelular. No mesmo trabalho, utilizando RNA de interferência para o gene da Cx43, os autores observaram que a menor expressão de Cx43 estava associada à redução da proliferação celular das HSC.

Gingalewski e Maio (1997) mostraram redução de RNAm de Cx32 em regiões isquêmicas após 1 hora de reperfusão e seu desaparecimento após 24 horas.

Nas regiões não isquêmicas, a expressão de Cx32 diminuiu apenas após 4 horas de reperfusão.

Diminuição na expressão de Cx26 e Cx32 no período de isquemia seguido de um aumento significativo após a reperfusão também foi observado por Nakashima et al., 2003, acompanhada por aumento dos teores de cálcio, possivelmente, relacionados à comunicação intercelular através das junções GAP.

Além disso, poucos estudos mostram a participação das junções GAP na lesão de IR. Sabe-se que após o período isquêmico ocorre remodelamento no tecido hepático com a participação de citocinas, metaloproteinases, HSCs, células de Kupffer, etc. No entanto, não existem estudos que relatam a participação da conexina 43 nesse contexto.

Com frequência, as conexinas e seus canais são encontrados abaixo dos níveis normais em Insuficiência Hepática Aguda (induzida por drogas), Hepatites, Colestases, Fibroses, Cirrose, Esteatose não alcoólica e Hepatocarcinoma (Vinken et al., 2013). Com isso, a ideia de inibi-las parece promissora. No entanto, estudos semelhantes demonstram resultados diferentes. Maes et al. em 2016 observaram um aumento de morte celular em camundongos Knockouts heterozigotos – Cx43 quando comparados aos selvagens, na falência hepática medicamentosa (Acetaminophen). Entretanto, quando foi usado inibidor de hemicanal, observaram diminuição da lesão hepática nesses camundongos (Maes et al., 2017). Este trabalho está de acordo como a primeira parte do estudo de Maes et al., (2016), mostrando que a deficiência de Cx43 é um fator que propicia maior lesão hepática. Drogas com efeito de inibição podem determinar alterações ainda não conhecidas, que modificam os achados finais em teste *in vivo*.

Têm sido observados vários estudos que avaliam as funções das Cx43 em diferentes tecidos, como observado por Cogliati et al. (2016) no reparo de tecidos cutâneos. Estas mesmas funções podem ser canalizadas para tratamento de doenças fibroproliferativas e distúrbios fibróticos em órgãos específicos.

Diversos estudos demonstraram resultados diferentes quando varia o método de agressão utilizado no fígado. Com isso é possível verificar que são inúmeras as

possibilidades, as variações de como e qual conexão bloquear em determinado tipo específico de patologia.

Há vários produtos disponíveis. Novos estudos estão comparando um com outro ou a somatória deles, como realizado por *Martim PEM*, em 2018, em feridas de pele, em que compararam o *Connexin Mimetic Peptide Gap 27* com *SiRNA Cx43 Knockdown*, ou por Vinken em 2018, quando testou substâncias com diferentes mecanismos de ação como o de inibir global (Carbenoxolone) ou seletivamente (TAT-Gap19) as Gap junctions e hemicanais de comunicação, como demonstrado nas figuras 4 e 5.

Com a definição das vantagens e das desvantagens na inibição de comunicações celulares se terá, em breve, novas opções de terapias no campo da hepatologia.

Fonte: Crespo Yanguas et al., 2016.

Figura 15 - Mecanismo de ação do Carbenoxolone inibindo hemicanal e junção Gap e do TAT-Gap19 inibindo seletivamente o hemicanal

Fonte: Mathieu Vinken, 2017

Figura 16 - Estrutura de uma conexina, composta por 2 *loops* extracelular e um intracelular, 2 *tails* intracelular. Pode-se observar o local de ação dos Peptídeos miméticos e a sequência de aminoácidos

Limitações deste estudo envolvem os problemas técnicos ocorridos no preparo das lâminas para realização do estudo histopatológico.

Novos estudos serão necessários para definir as vantagens e as desvantagens na inibição de comunicações e se estas serão seletivas ou não.

Superando estes desafios, em breve, novas opções de terapias no campo da hepatologia serão lançadas no mercado para uso clínico.

Até agora poucas pesquisas publicaram estudos translacionais convincentes em relação aos estudos das junções Gap (Becker et al., 2016). Entretanto, alguns serviços, nas mais diferentes áreas, deram início ao uso de medicamentos com este fim.

A cada publicação crescem as chances de desvendar as minúcias destas proteínas e, assim, alcançar um desfecho satisfatório.

O desenvolvimento deste modelo experimental de IR, em fígado de camundongos, proporciona melhor entendimento na presença de elementos como as conexinas nas lesões teciduais determinadas pela inflamação causada pelos radicais livres, assim como para outros pesquisadores interessados em manter essa mesma linha de estudo.

Como observado nas tabelas estatísticas, as alterações encontradas foram significativas entre os grupos estudados, podendo comprovar a importância da Cx 43 nessas circunstâncias. De acordo com os métodos utilizados nesta pesquisa é possível concluir com resultados preliminares que a lesão por IR é mais grave no fígado de animais geneticamente modificados, que expressam menos a Cx43.

7 CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

De acordo com os métodos empregados no experimento é possível concluir que camundongos com diminuição da expressão da Conexina 43 (“knockout” heterozigoto) têm uma pior resposta, quando comparados ao grupo controle, apresentando lesão hepática significativamente maior, quando submetidos à isquemia e reperfusão do fígado.

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Avenida Dr. Arnaldo, 455
Pacaembu – São Paulo – SP

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificamos que a proposta intitulada “**Avaliação da Lesão pós Isquemia e Reperfusão Hepática em Modelos Experimentais com Camundongo Knockout para Expressão da Conexina 43**”, registrada com o nº **034/17**, sob a responsabilidade de **Wellington Andraus** e **Alexandre Maximiliano Trevisan**, apresentada pelo Departamento de Gastroenterologia - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Faculdade de Medicina da USP em 06.04.17

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Início: 10-01-2017 Término: 09-11-2017
Espécie/linhagem/raça	Camundongo C57 BL/6
Nº de animais	72
Peso/Idade	8 semanas
Sexo	machos
Origem	Biotério FMUSP

CEUA-FMUSP, 06 de Abril de 2017

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

Comissão de Ética no Uso de Animais da FMUSP
e-mail: ceua@fm.usp.br

9 REFERÊNCIAS

7 REFERÊNCIAS

Abe Y, Hines IN, Zibari G, Pavlick K, Gray L, Kitagawa Y, Grisham MB. Mouse model of liver ischemia and reperfusion injury: method for studying reactive oxygen and nitrogen metabolites in vivo. *Free Radic Biol Med*. 2009;46(1):1-7.

Andraus W, Souza GF, Oliveira MG, Haddad LB, Coelho AM, Galvão FH, Leitão RM, D'Albuquerque LA, Machado MC. S-nitroso-N-acetylcysteine ameliorates ischemia-reperfusion injury in the steatotic liver. *Clinics (Sao Paulo)*. 2010;65(7):715-21.

Bai D, Wang AH. Extracellular domains play different roles in gap junction formation and docking compatibility. *Biochem J*. 2014;458(1):1-10.

Battaller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest*. 2005;115(2):209-18.

Becker DL, Phillips AR, Duft BJ, Kim Y, Green CR. Translating connexin biology into therapeutics. *Semin Cell Dev Biol*. 2016;50:49-58.

Belghiti J, Noun R, Zante E, Ballet T, Sauvanet A. Portal triade clamping or hepatic vascular exclusion for major liver resection; a controlled study. *Ann Surg*. 1996;224(2):155-61.

Bennett MV, Goodenough DA. Gap junctions, electrotonic coupling, and intercellular communication. *Neurosci Res Program Bull*. 1978;16(3):1-486. Beyer EC, Paul DL, Goodenough DA. Connexin43: a protein from rat heart homologous to a gap junction protein from liver. *J Cell Biol*. 1987;105(6 Pt 1):2621-9.

Boengler K, Dodoni G, Dominguez-Sinovas A, Cabestrero A, Ruiz-Meana M, Gres P, Konietzka I, Lopez-Iglesias C, Garcia-Dorado D, Di Lisa F, Heusch G, Schulz R. Connexin 43 in cardiomyocyte mitochondria and its increase by ischemic preconditioning. *Cardiovasc Res*. 2005;67(2):234-44.

Borghi-Scoazec G, Scoazec JY, Durand F, Bernuau J, Belghiti J, Feldmann G, Henin D, Degott C. Apoptosis after ischemia-reperfusion in human liver allografts. *Liver Transpl Surg.* 1997;3(4):407-15.

Bosco D, Haeffliger JA, Meda P. Connexins: key mediators of endocrine function. *Physiol Rev.* 2011;91(4):1393-445.

Bulkley GB. Preconditioning for protection from ischemia injury; discriminating cause from the effect from epiphenomenon. *Ann Surg.* 2000;232(2):163-5.

Castro e Silva Jr O, Centurion S, Pacheco EG, Brisotti JL, Oliveira AF, Dal Sasso K. Basics aspects of the ischemia reperfusion injury and of the ischemic preconditioning. *Acta Cir Bras.* 2002;17 (Supl 3):96-100.

Capecchi MR. Gene targeting in mice: functional analysis of the mammalian genome for the twenty first century. *Nat Rev Genet.* 2005;6(6):507-12.

Cheng F, Li Y, Feng L, Li S. Hepatic stellate cell activation and hepatic fibrosis induced by ischemia/reperfusion injury. *Transplant Proc.* 2008;40(7):2167-70.

Clavien PA, Yadav S, Sindram D, Bentley RC. Protective effects of ischemic preconditioning for liver resection performed under inflow occlusion in humans. *Ann Surg.* 2000;232(2):155-62.

Cogliati B, Menecier G, Wilebrords J, Da Silva TC, Maes M, Pereira IVA, Crespo-Yangas S, Hernandez-Blazquez FJ, Dagli MLZ, Vinken M. Connexins, pannexins, and their channels in fibroproliferative diseases. *J Membr Biol.* 2016;249(3):199-213.

Collard CD, Gelman S. Pathophysiology, clinical manifestations, and prevention of ischemia-reperfusion injury. *Anesthesiology.* 2001;94(6):1133-8.

Cottart CH, Nivet-Antoine V, Do L, Al-Massarani G, Descamps G, Xavier-Galen F, Clot JP. Hepatic cytoprotection by nitric oxide and the cGMP pathway after ischaemia-reperfusion in the rat. *Nitric Oxide*. 2003;9(2):57-63.

Crespo Yanguas S, Willebrords J, Maes M, da Silva TC, Veloso Alves Pereira I², Cogliati B, Zaidan Dagli ML, Vinken M. Connexins and pannexins in liver damage. *EXCLI Journal* 2016;15:177-86.

Daemen M, de Vries B, Buurman WA. Apoptosis and inflammation in renal reperfusion injury. *Transplantation*. 2002;73(11):1693-700.

Datta G, Fuller BJ, Davidson BR. Molecular mechanisms of liver ischemia reperfusion injury: Insights from transgenic Knockout models. *World J Gastroenterol*. 2013;19 (11):1683-98.

Eiberger J, Degen J, Romualdi A, Deutsch U, Willecke K, Söhl G. Connexin genes in the mouse and human genome. *Cell Commun Adhes*. 2001;8(4-6):163-5.

Fausto N. Liver regeneration. *J Hepatol*. 2000;32(1 Suppl):19-31.

Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology*. 2008;134(6):1655-69.

Geerts A, Greenwel P, Cunningham M, De Bleser P, Rogiers V, Wisse E, Rojkind M. Identification of connective tissue gene transcripts in freshly isolated parenchymal, endothelial, Kupffer and fat storing cells by northern hybridization analysis. *J Hepatol*. 1993;19(1):148-58.

Gingalewski C, De Maio A. Differential decrease in connexin 32 expression in ischemic and non ischemic regions of rat liver during ischemia/reperfusion. *J Cell Physiol*. 1997;171(1):20-7.

Gurusamy KS, Kumar Y, Sharma D, Davidson BR. Methods of vascular occlusion for elective liver resections. *Cochrane Database Syst Rev*. 2007;(4):CD006409. Update in: *Cochrane Database Syst Rev*. 2009;(1):CD006409.

Haddad L, Cassenot AJ, Andraus W, de Martino RB, Ortega NR, Abe JM, D'Albuquerque LA. Factors associated with mortality and graft failure in liver transplants: a hierarchical approach. *PloS One*. 2015 Aug 14;10(8):e0134874.

Hanner F, Sorensen CM, Holstein-Rathlou NH, Peti-Peterdi J. Connexins and the kidney. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2010;298(5):R1143-55.

Hirokawa F, Nakai T, Yamaue H. Storage solution containing fructose-1,6-bisphosphate inhibits the excess activation of Kupffer cells in cold liver preservation. *Transplantation*. 2002;74(6):779-83.

Huguet C, Gavelli A, Chieco PA, Bona S, Harb J, Joseph JM, Jobard J, Gramaglia M, Lasserre M. Liver ischemia for hepatic resection: where is the limit? *Surgery*. 1992;111(3):251-9.

Ishikawa Y, Yamamoto Y, Kume M, Yamagami K, Yamamoto H, Kimoto S, Sakai Y, Yamamoto M, Yamaoka Y. Heat shock preconditioning on mitochondria during warm ischemia in rat livers. *J Surg Res*. 1999;87(2):178-84.

Jeong WII, Do SH, Yun HS, Song BJ, Kim SJ, Kwak WJ, Yoo SE, Park HY, Jeong KS. Hypoxia potentiates transforming growth factor-beta expression of hepatocyte during the cirrhotic condition in rat liver. *Liver Int*. 2004;24(6):658-68.

Jhappan C, Stahle C, Harkins RN, Fausto N, Smith GH, Merlino GT. TGF α overexpression in transgenic mice induces liver neoplasia and abnormal development of the mammary gland and pancreas. *Cell*. 1990;61(6):1137-46.

Jiang HQ, Zhang XL, Liu L, Yang CC. Relationship between focal adhesion kinase and hepatic stellate cell proliferation during rat hepatic fibrogenesis. *World J Gastroenterol*. 2004;10(20):3001-5.

Kisseleva T, Brenner DA. Role of hepatic stellate cells in fibrogenesis and the reversal of fibrosis. *J Gastroenterol Hepatol*. 2007;22(supl 1):S73-8.

Koch CG, Li L, Sessler DI, Figueroa P, Hoeltge GA, Mihaljevic T, Blackstone EH. Duration of red-cell storage and complications after cardiac surgery. *N Engl J Med*. 2008;358(12):1229-39.

Kohli V, Selzner M, Madden JF, Bentley RC, Clavien PA. Endothelial cell and hepatocyte deaths occur by apoptosis after ischemia-reperfusion injury in the rat liver. *Transplantation*. 1999;67(8):1099-105.

Kurata H, Takaoka M, Kubo Y, Katayama T, Tsutsui H, Takayama J, Ohkita M, Matsumura Y. Protective effect of nitric oxide on ischemia/reperfusion-induced renal injury and endothelin-1 overproduction. *Eur J Pharmacol* 2005;517(3):232-9.

Lentsch AB, Kato A, Yoshidome H, MacMasters KM, Edwards MJ. Inflammatory mechanisms and therapeutic strategies for warm hepatic ischemia/reperfusion injury. *Hepatology*. 2000;32(2):169-73.

Liu H, Radisky DC, Bissell MJ. Proliferation and polarity in breast cancer: untying the Gordian knot. *Cell Cycle*. 2005;4(5):646-9.

Loewenstein WR, Kanno Y. Intercellular communication and tissue growth. I. Cancerous growth. *J Cell Biol*. 1967;33(2):225-34.

Loewenstein WR, Socolar SJ, Higashino S, Kanno Y, Davidson N. Intercellular communication: renal, urinary bladder, sensory, and salivary gland cells. *Science*. 1965;149(3681):295-8.

Lu G, Shimizu I, Cui X, Itonaga M, Tamaki K, Fukuno H, Inoue H, Honda H, Ito S. Interferon-alpha enhances biological defense activities against oxidative stress in cultured rat hepatocytes and hepatic stellate cells. *J Med Invest.* 2002;49(3-4):172-81.

Maes M, Decrock E, Cogliati B, Oliveira AG, Marques PE, Dagli ML, Menezes GB, Menecier G, Leybaert L, Vanhaecke T, Rogiers V, Vinken M. Connexin and pannexin (hemi)channels in the liver. *Front Physiol.* 2014;4:405.

Maes M, McGill MR, da Silva TC, Abels C, Lebofsky M, Monteiro de Araújo CM, Tiburcio T, Veloso Alves Pereira I, Willebrords J, Crespo Yanguas S, Farhood A, Beschin A, Van Ginderachter JA, Zaidan Dagli ML, Jaeschke H, Cogliati B, Vinken M. Involvement of connexin43 in acetaminophen-induced liver injury. *Biochim Biophys Acta.* 2016;1862(6):1111-21.

Makuuchi M, Takayama T, Gunven P, Kosuge T, Yamazaki S, Hasegawa H. Restrictive versus liberal blood transfusion policy for hepatectomies in cirrhotic patients. *World J Surg.* 1989;13(5):644-8.

Martin PEM, Faniku C, O'Shaughnessy E, Lorraine C, Johnstone SR, Graham A, Greenhough S. The connexin mimetic peptide Gap27 and Cx43-Knockdown reveal differential roles for connexin43 in wound closure events in skin model systems. *Int J Mol Sci.* 2018 Feb 18;19(2).

Massip-Salcedo M, Roselló-Catafau J, Prieto J, Avila MA, Peralta C. The response of the hepatocyte to ischemia. *Liver Int.* 2007;27(1):6-16.

Mazzaccara C, Labruna G, Cito G, Scarfo M, De Felice M, Pastore L, Sachetti L. Age-related reference intervals of the main biochemical and hematological parameters in C57BL/6J, 129SV/EV and C3H/HeJ mouse strains. *PLoS One.* 2008;3(11):e3772.

Mese G, Valiunas V, Brink PR, White TW. Connexin26 deafness associated mutations show altered permeability to large cationic molecules. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2008;295(4):C966-74.

Miranda AR. Avaliação da expressão e localização da conexina 43 na injúria isquêmica renal aguda [Dissertação Mestrado]. São Paulo: Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares IPEN; 2011.

Miranda LEC, Viaro F, Ceneviva R, Evora PRB. As bases experimentais da lesão por isquemia e reperfusão do fígado. Revisão. *Acta Cir Bras*. 2004;19(1):1-12.

Moreno M, Bataller R. Cytokines and renin-angiotensin system signaling in hepatic fibrosis. *Clin Liver Dis*. 2008;12(4):825-52.

Nakashima Y, Kohno H, EL-Assal ON, Dhar DK, Ono T, Yamanoi A, Nagasue N. Sequential changes connexin32 and connexin26 in ischemia-reperfusion of the liver in rats. *Hepatol Res*. 2003;27(1):67-75.

Nielsen MS, Axelsen LN, Sorgen PL, Verma V, Delmar M, Holstein-Rathlou NH. Gap junctions. *Compr Physiol*. 2012;2(3): 1981-2035.

O'Carroll SJ, Gorrie CA, Velamoor S, Green CR, Nicholson LFB. Connexin43 mimetic peptide is neuroprotective and improves function following spinal cord injury. *Neurosci Res*. 2013;75(3):256-67.

Pacheco EG, Ramalho FS, Ramalho LN, Zucoloto S, Castro e Silva Jr O, Oliveira AF. Efeitos do pré-condicionamento hepático em ratos cirróticos, submetidos à isquemia e reperfusão hepática: resultados preliminares. *Acta Cir Bras*. 2001;16(Supl 1):41-3.

Pereira RM, dos Santos RA, Da Costa Dias FL, Teixeira MM, Simões e Silva AC. Renin-angiotensin system in the pathogenesis of liver fibrosis. *World J Gastroenterol*. 2009;15(21):2579-86.

Pinto Kruel CR, Sherer de Fraga R, Dal Molin S, Mota SM, Gasperin G, Cerski CT, de Oliveira JR, Alvares da Silva MR. Hepatic reperfusion in rats: A new model with portal arterialization in studying early ischemia-reperfusion injury. *Transplant Proc.* 2007;39(10):3015-8.

Reaume AG, de Sousa PA, Kulkarni S, Langille BL, Zhu D, Davies TC, Juneia SC, Kidder GM, Rossant J. Cardiac malformation in neonatal mice lacking connexin43. *Science.* 1995;267(5205):1831-4.

Remirez D, Fernández V, Tapia G, González R, Videla LA. Influence of C-phycocyanin on hepatocellular parameters related to liver oxidative stress and Kupffer cell functioning. *Inflamm Res.* 2002;51(7):351-6.

Retamal MA, Cortés CJ, Reuss L, Bennett MV, Sàez JC. S-nitrosylation and permeation through connexin 43 hemichannels in astrocytes: induction by oxidant stress and reversal by reducing agents. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2006;103(12):4475-80.

Revel JP, Karnovsky MJ. Hexagonal array of subunits in intercellular junctions of the mouse heart and liver. *J Cell Biol.* 1967;33(3):C7-C12.

Rodrigues-Sinovas A, Garcia-Dorado D, Ruiz-Meana M, Soler-Soler J. Enhanced effect of gap junction uncouplers on macroscopic electrical properties of reperfused myocardium. *J Physiol.* 2004;559(Pt 1):245-57.

Romanque P, Uribe M, Videla LA. Mecanismos moleculares en el daño por isquemia-reperfusión hepática y en el preconditionamiento isquémico. *Rev Med Chil.* 2005;133(4):469-76.

Salomão LS, Young SB, Galhardo MA, Pereira LA, Pires AR, Boaventura GT, Ferreira AM, Martinho JM. Evaluation of liver regeneration by modulation with ischemic preconditioning after ischemia and reperfusion and partial hepatectomy. *Rev Col Bras Cir.* 2012;39(3):211-5.

Schulz R, Gorge PM, Gorbe A, Ferdinandy P, Lampe PD, Leybaert L. Connexin 43 is an emerging therapeutic target in ischemia/reperfusion injury, cardioprotection and neuroprotection. *Pharmacol Ther.* 2015;153:90-106.

She QB, Chen N, Bode AM, Flavell RA, Dong Z. Deficiency of c-Jun-NH₂-terminal kinase-1 in mice enhances skin tumor development by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Cancer Res.* 2002;62(5):1343-8.

Stone A. Connexin knockout provides a link to heart defects. *Science.* 1995;267(5205):1773.

Teoh NC, Farrell GC. Hepatic ischemia reperfusion injury: pathogenic mechanisms and basis for hepatoprotection. *J Gastroenterol Hepatol.* 2003;18(8):891-902.

Vinken M, Maes M, Vanhaecke T, Rogiers V. Drug induced liver injury: mechanisms, types and biomarkers. *Curr Med Chem.* 2013;20(24):3011-21.

Vollmar B, Glasz J, Leiderer R, Post S, Menger MD. Hepatic microcirculatory perfusion failure is a determinant of liver dysfunction in warm ischemia-reperfusion. *Am J Pathol.* 1994;145(6):1421-31.

Xiao ZY, Banan B, Jia J, Manning PT, Hiebsch RR, Gunasekaran M, Upadhyaya GA, Frazier WA, Mohanakumar T, Lin Y, Chapman WC. CD47 blockade reduces ischemia reperfusion injury and improves survival in a rat liver transplantation model. *Liver Transpl.* 2015;21(4):468-77.

Xu J, Li D, Ke Z, Liu R, Maubach G, Zhuo L. Cathepsin S is aberrantly overexpressed in human hepatocellular carcinoma. *Mol Med Rep.* 2009;2(5):713-8.

Wang N, De Bock M, Decrock E, Bol M, Gadicherla A, Vinken M, Rogiers V, Bukauskas FF, Bultynck G, Leybaert L. Paracrine signaling through plasma membrane hemichannels. *Biochim Biophys Acta,* 2013;1828(1):35-50.

Wekerle H, Kojima K, Lannes-Vieira J, Lassmann H, Linington C. Animal models. *Ann Neurol*. 1994;36(Suppl S1):S47-53.

Yamasaki H, Naus CC. Role of connexin genes in growth control. *Carcinogenesis*. 1996;17(6):1199-213.

Zhang M, Thorgeirsson SS. Modulation of connexins during differentiation of oval cells into hepatocytes. *Exp Cell Res*. 1994;213(1):37-42.