

AVALIAÇÃO DAS LESÕES (PRÉ)-NEOPLÁSICAS EM CAMUNDONGOS KNOCKOUT PARA PANEXINA-1 SUBMETIDOS AO MODELO DE HEPATOCARCINOGENESE QUÍMICA

Kaique Alves Luciano; Cícero Júlio Silva Costa; Tereza Cristina da Silva; Bruno Cogliati

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade de São Paulo

kaiquealves@usp.br

Objetivos

A comunicação parácrina exercida pelos canais de Panexina-1 (Panx1) nos hepatócitos tem se destacado como uma via importante para o curso de processos patológicos no fígado¹. Alguns estudos sobre bloqueio genético ou ablação dessa proteína identificaram importante redução da resposta inflamatória em modelos murinos de hepatopatias crônicas^{2,3}. As neoplasias hepáticas geralmente são os estágios terminais das doenças hepáticas crônicas, são condições de difícil tratamento e diagnóstico desafiador. Portanto, este estudo objetivou investigar a incidência de lesões hepáticas neoplásicas em camundongos *knockouts* para Panx1 submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese química.

Métodos e Procedimentos

Camundongos C57BL/6 (CEUA 7236130120), machos, *knockout* para Panx1 (Panx1-KO; n=25) e wild-type (WT, n=35) receberam uma dose única de dietilnitrosamina (DEN, 10 mg/kg), intraperitoneal (i.p.), aos 15 dias de vida. Aos dois meses de idade, os animais receberam 3 aplicações semanais de tetracloreto de carbono (CCl₄, i.p., em doses escalonadas de 0,25 a 1,5 µL/g) durante dois meses. Os animais dos grupos controles de ambos os genótipos (n=5/grupo) receberam apenas os veículos. Após a eutanásia por exsanguinação sob anestesia inalatória (isoflurano), foram calculados a multiplicidade (nº nódulos/camundongo) e volume [(diâmetro menor² × diâmetro maior)/2] dos nódulos acima

de 1 mm³. Estes parâmetros também foram calculados com base em diferentes volumes tumorais, classificados entre 10 e 500 mm³. Na análise estatística, os dados contínuos foram comparados com a curva de Gauss através do teste de distância K-S. Os dados paramétricos foram representados através da média e desvio padrão e analisados pelo teste *t*-Student. Os dados não-paramétricos foram representados através da mediana e percentil e analisados pelo teste de Mann-Whitney. Foi aceito neste estudo risco alfa menor ou igual a 5% (P<0,05).

Resultados

Não houve diferença significativa na mortalidade entre os genótipos analisados. O fígado dos animais submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese química estava aumentado e com múltiplos nódulos neoplásicos (Figura 1). Os camundongos Panx1-KO apresentaram redução significativa na multiplicidade (P=0,04) e volume (P=0,005) dos nódulos em comparação aos camundongos WT (Figura 2). Quando classificados em volumes, os animais WT apresentaram maior número de nódulos hepáticos com volumes >100 mm³, enquanto os animais Panx1-KO apresentaram maior incidência de nódulos entre 10 e 50 mm³ (Figura 3). No entanto, não houve diferença significativa entre os genótipos nessa avaliação.

Conclusões

Os resultados demonstraram que a Panx1 apresenta um importante papel no controle da hepatocarcinogênese.

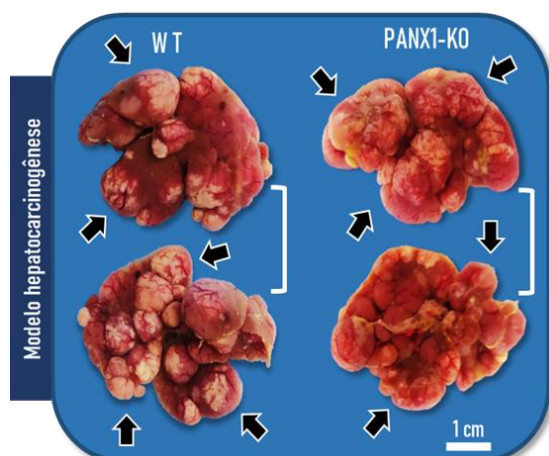


Figura 1. Aspectos macroscópicos do fígado de animais submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese química, demonstrando múltiplas formações nodulares (setas) de diferentes tamanhos, esbranquiçados e com evidente neovascularização.

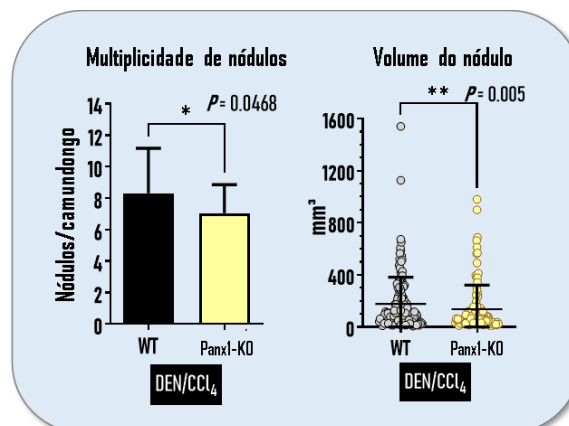


Figura 2. Dados de multiplicidade e volume de nódulos do grupo de animais Panx1-KO vs. WT. Os dados são expressos em média $\pm$ desvio padrão e foram analisados pelos testes t de Student ou Mann-Whitney. (*) $P < 0,05$; (**) $P < 0,001$.

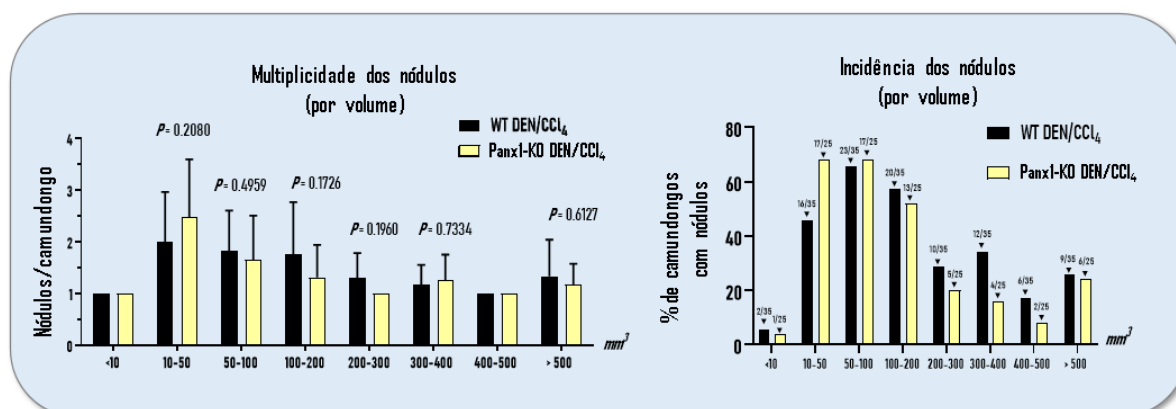


Figura 3. Dados de multiplicidade e incidência dos nódulos, agrupados de acordo com seu volume. Os dados são expressos em média $\pm$ desvio padrão e foram analisados pelos testes t-Student ou Mann-Whitney ($P < 0,05$).

Referências Bibliográficas

1. CRESPO YANGUAS S. et al. Pannexin1 as mediator of inflammation and cell death. *Biochim Biophys Acta Mol. Cell Res*, 1864(1):51-61, 2017.
2. CRESPO YANGUAS, S. et al. Genetic ablation of pannexin1 counteracts liver fibrosis in a chemical, but not in a surgical mouse model. *Arch. Toxicol.*, v. 92, n. 8, p. 2607-2627, 2018.

3. WILLEBRORDS, J. et al. Protective effect of genetic deletion of pannexin1 in experimental mouse models of acute and chronic liver disease. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis. Dis.*, v. 1864, n. 3, p. 819-830, 2018.

EVALUATION OF (PRE)-NEOPLASTIC LESIONS IN KNOCKOUT MICE FOR PANNEXIN-1 SUBMITTED TO THE CHEMICAL HEPATOCARCINOGENESIS MODEL

Kaique Alves Luciano; Cícero Júlio Silva Costa; Tereza Cristina da Silva; Bruno Cogliati

School of Veterinary Medicine and Animal Science - University of São Paulo

kaiquealves@usp.br

Objectives

The paracrine communication exerted by Pannexin-1 (Panx1) channels in hepatocytes has been highlighted as an important pathway for the course of pathological processes in the liver¹. Some studies on genetic blocking or ablation of this protein have identified an important reduction in the inflammatory response in murine models of chronic liver disease^{2,3}. Liver neoplasms are usually the terminal stages of chronic liver diseases, are conditions that are difficult to treat and challenging to diagnose. Therefore, this study aimed to investigate the incidence of neoplastic liver lesions in Panx1 knockout mice submitted to the chemical hepatocarcinogenesis model.

Materials and Methods

Male C57BL/6 (CEUA 7236130120) mice, knockout for Panx1 (Panx1-KO; n=25) and wild-type (WT, n=35) received a single dose of diethylnitrosamine (DEN, 10 mg/kg), intraperitoneal (i.p.), at 15 days of life. At two months of age, the animals received 3 weekly applications of carbon tetrachloride (CCl₄, i.p., in staggered doses from 0.25 to 1.5 μ L/g) for two months. The animals in the control groups of both genotypes (n=5/group) received only the vehicles. After euthanasia by exsanguination under inhalation anesthesia (isoflurane), the multiplicity (number of nodules/mice) and volume [(smaller diameter² $\times$ larger diameter)/2] of nodules above 1 mm³ were calculated. These

parameters were also calculated based on different tumor volumes, classified between 10 and 500 mm³. In the statistical analysis, continuous data were compared with the Gauss curve using the K-S distance test. Parametric data were represented by mean and standard deviation and analyzed by Student's t-test. Non-parametric data were represented using the median and percentile and analyzed using the Mann-Whitney test. In this study, an alpha risk of less than or equal to 5% (P<0.05) was accepted.

Results

There was no significant difference in mortality between the analyzed genotypes. The liver of animals submitted to the chemical hepatocarcinogenesis model was enlarged and had multiple neoplastic nodules (Figure 1). Panx1-KO mice showed a significant reduction in the multiplicity (P=0.04) and volume (P=0.005) of nodules compared to WT mice (Figure 2). When classified into volumes, the WT animals had a greater number of liver nodules with volumes >100 mm³, while the Panx1-KO animals had a higher incidence of nodules between 10 and 50 mm³ (Figure 3). However, there was no significant difference between the genotypes in this assessment.

Conclusions

The results showed that Panx1 plays an important role in the control of hepatocarcinogenesis.

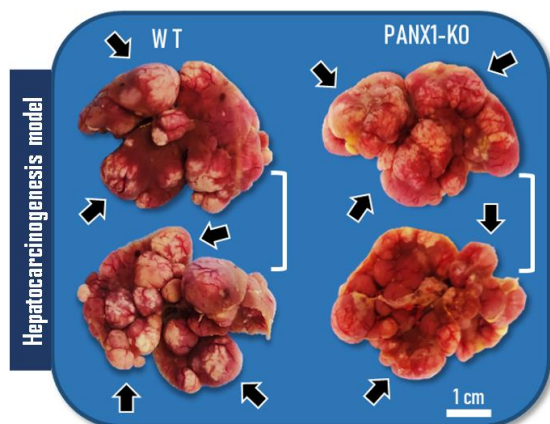


Figure 1. Macroscopic aspects of the liver of animals submitted to the chemical hepatocarcinogenesis model, showing multiple nodular formations (arrows) of different sizes, whitish and with evident neovascularization.

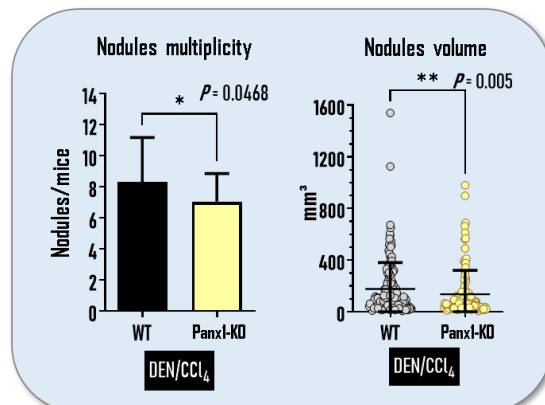


Figure 2. Nodule multiplicity and volume data from the group of animals Panx1-KO vs. WT. Data are expressed as mean ± standard deviation and were analyzed using Student's t test or Mann-Whitney test. (*) $P < 0,05$; (**) $P < 0,001$.

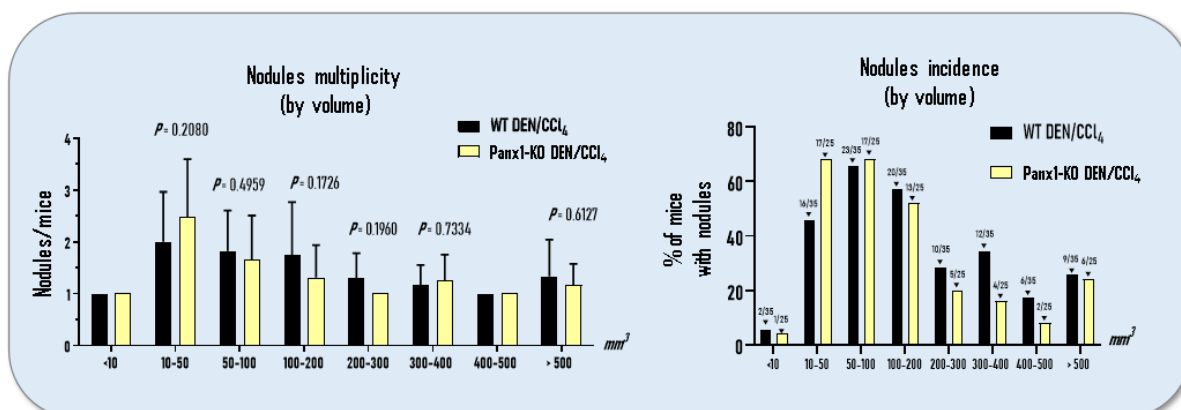


Figure 3. Data on the multiplicity and incidence of nodules, classified according to their volume. Data are expressed as mean ± standard deviation and were analyzed using Student's t test or Mann-Whitney test ($P < 0.05$).

References

1. CRESPO YANGUAS S. et al. Pannexin1 as mediator of inflammation and cell death. *Biochim Biophys Acta Mol. Cell Res*, 1864(1):51-61,2017.
2. CRESPO YANGUAS, S. et al. Genetic ablation of pannexin1 counteracts liver fibrosis in a chemical, but not in a surgical mouse model. *Arch. Toxicol.*, v. 92, n. 8, p. 2607-2627, 2018.
3. WILLEBRORDS, J. et al. Protective effect of genetic deletion of pannexin1 in experimental mouse models of acute and chronic liver disease. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis. Dis.*, v. 1864, n. 3, p. 819-830, 2018.