RICARDO ROMÃO GUERRA

**Efeito do tratamento com fatores hepatotróficos em
ratas (Wistar) induzidas experimentalmente à cirrose
por Tioacetamida**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação
em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres
da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
da Universidade de São Paulo, para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Departamento:

Cirurgia

Área de concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Prof. Dr. Francisco Javier Hernandez Blazquez

São Paulo

2006

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

8/1
BIBLIOTECA VIRGINIE BUFF D'ÁRICE
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
E ZOOTECNIA DA USP
1/12/06

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínie Buff D'Árice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1806
FMVZ

Guerra, Ricardo Romão

Efeito do tratamento com fatores hepatotróficos em ratos (Wistar) induzidas experimentalmente à cirrose por Tioacetamida / Ricardo Romão Guerra. — São Paulo: R. R. Guerra, 2006.
185 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Departamento de Cirurgia, 2006.

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

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Javier Hernandez Blazquez.

1. Cirrose. 2. Tioacetamida. 3. Fatores hepatotróficos. 4. Modulação da matriz extracelular. 5. Progranulina. I. Título.

ERRATA

Página	Parágrafo	Linha	Onde se lê	Leia-se
144	3	21	redução de MMP 13	aumento de MMP 13
145	2	11	pró-fibrótico	pró-fibrolítico

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

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Efeito do tratamento com fatores hepatotróficos sobre o fígado de ratas *wistas* com cirrose induzida experimentalmente por tioacetamida", Protocolo nº510/2004, utilizando 100 ratos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Francisco Javier Hernandez Blazquez, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado "ad referendum".

(We certify that the Research "Effect of the treatment with hepatotrophic factors on the liver of rats wistar with cirrhosis induced by thioacetamide", protocol number 510/2004, utilizing 100 rats, under the responsibility of Prof. Dr. Francisco Javier Hernandez Blazquez, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendum", meeting.

São Paulo, 03 de setembro de 2004

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

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: GUERRA, R. R.

Título: Efeito do tratamento com fatores hepatotróficos em ratas (Wistar) induzidas experimentalmente à cirrose por Tioacetamida

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Agradecimentos

Aos professores, funcionários e colegas (incluse os que já nos deixaram) da Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo....não citarei o nome de todos para não cometer a injustiça de esquecer alguém;

Ao meu orientador, Prof. Dr. Francisco Javier Hernandez Blazquez, que sempre depositou e demonstrou confiança em meu trabalho;

À empresa Fórmula Medicinal, que sempre apoiou nossas pesquisas com entusiasmo, além de ser os fatores hepatotróficos para as pesquisas;

À Prof^a. Dr^a. Maria Angélica Miglino, Coordenadora do Curso de Pós-Graduação, pela confiança em minha pessoa e em meu trabalho desde de que engresei na Anatomia;

Aos colegas de Anatomia que já foram injetar ratos comigo: Fernanda, Thiago, Fernando, Diogo, Danila, Laura...com certeza foram mais, desculpe a memória;

Aos alunos da IC que sempre deram força nos experimentos: Mauricio, Mafaldo, Gabriel, Bruno (agora Pós-graduando) e Cíntia (estes também injetaram e injetam ratos!);

Aos colegas de laboratório: Alex, Thiago, Josy, Paula, Diogo, Gisele, Arlei, Tânia;

À Prof^a. Dr^a. Maria Lucia Dagli, por ter disponibilizado seu laboratório durante parte do experimento;

Ao Zé Luiz e a Cintia pela força no laboratório da Malu;

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) pela concessão da bolsa;

Ao Prof. Dr. Andrew Bateman por ter disponibilizado, nos últimos 9 meses, seu laboratório no Hôpital Royal Victoria da McGill University - Health Centre para meus trabalhos;

À minha família, pela oportunidade de estar estudando;

Ao meu amor Danila, pelo companherismo durante esta etapa da minha vida.

RESUMO

GUERRA, R. R. **Efeito do tratamento com fatores hepatotróficos em ratas (Wistar) induzidas experimentalmente à cirrose por Tioacetamida.** [Effect of hepatotrophic factors on thioacetamide-induced cirrhosis in rats]. 2006. 185 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

A cirrose é caracterizada por fibrose e por nódulos regenerativos que resultam na desorganização da arquitetura tecidual, sendo considerado um estágio irreversível. A administração de fatores hepatotróficos exógenos (FHE) poderia estimular a proliferação celular de células hepáticas e reduzir a cirrose induzida em ratos. Deste modo, os FHE atuariam na remodelação da matriz extracelular (ECM). Os objetivos desse trabalho foram avaliar os efeitos dos FHE em ratos cirróticos induzidos experimentalmente por tioacetamida. Foram realizadas análises histopatológicas, imunoistoquímica para BrdU, mensuração de colágeno, microscopia eletrônica de varredura, análises bioquímicas de função hepática e avaliação da expressão gênica de colágeno $\alpha 1$, TGF $\beta 1$, TIMP I, MMP 2 e Plau, por PCR em tempo real. Após administração de FHE obteve-se diminuição da expressão gênica dos genes fibrogênicos: colágeno $\alpha 1$, TGF $\beta 1$, TIMP I e MMP 2. Durante a remodelação da ECM foram observadas melhoras morfofuncionais, com diminuição do número de nódulos regenerativos parenquimais, diminuição da espessura dos septos fibrosos e reaparecimento de veias centrolobulares. Foi observado aumento do peso e volume do fígado dos ratos, assim como aumento na relação fígado/carcaça. Os animais tratados com FHE apresentaram redução de 29,62% do colágeno parenquimal total, quando comparados com sua própria biópsia antes do tratamento. Animais não submetidos ao tratamento com FHE tiveram um acréscimo de 8,7% de colágeno. Os índices de função hepática revelaram decréscimo significativo nos níveis de gamaglutamiltranspeptida (GGT), alanina aminotransferase e aspartato aminotransferase. Desta forma, os FHE atuaram na remodelação da matriz extracelular hepática em fígados cirróticos pela diminuição da expressão

de genes fibrogênicos e não necessariamente pelo aumento da expressão de genes fibrolíticos. Ademais, animais cirróticos apresentaram em seu fígado e intestino progranulina, um novo fator de crescimento. Propomos, dessa forma, a utilização da progranulina como um possível marcador clínico e alvo terapêutico para doenças hepáticas.

Palavras-chave: Cirrose. Tioacetamida. Fatores hepatotróficos. Modulação da matriz extracelular. Progranulina.

ABSTRACT

GUERRA, R. R. **Effect of hepatotrophic factors on thioacetamide-induced cirrhosis in rats**. [Efeito do tratamento com fatores hepatotróficos em ratas (Wistar) induzidas experimentalmente à cirrose por Tioacetamida]. 2006. 185 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

Cirrhosis is characterized by fibrosis and regenerative nodules, which result in the disorganization of the hepatic architecture, being considered an irreversible situation. The administration of exogenous hepatotrophic factors (EHF) could stimulate hepatic regeneration in hepatocytes cells and reduce the cirrhosis induced in rats. The aim of this work was to evaluate the effect of EHF in rat cirrhosis induced experimentally by thioacetamide. It was carried out histopathological analysis; BrdU immunoperoxidase, collagen measurement, scanning electron microscopy; biochemical analysis for hepatic function and analysis on gene expression for collagen $\alpha 1$, TGF β 1, TIMP I, MMP 2, and Plau by real time PCR. After the EHF administration, it was observed a reduction in the expression of fibrogenic genes as: collagen $\alpha 1$, TGF $\beta 1$, TIMP I and MMP 2. During the extracellular matrix (ECM) remodeling morphofunctional improvements were observed, with decrease of regenerative nodules and fibrous septa thickness as well as reappearance of central vein. It was observed increase in liver weight, volume and in the relation liver/carcass. The animals treated with EHF had a reduction of 29.62% in the total collagen when compared with their own biopsy before treatment, while the non-treated animals had an increase of 8.7%. The index of hepatic functions had significant improvement in the levels of gamma-glutamyltranspeptidase (GGT), alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase. Therefore, the EHF acts on the extracellular matrix remodeling through reduction of fibrogenic gene expression and not necessarily by fibrolytic genes expression increase. In addition, we have found progranulin, a new growth

factor, in liver and intestine of cirrhotic animals. Hence, we propose the utilization of progranulin as a clinical marker and a therapeutic target for hepatic diseases.

Key words: Cirrhosis. Thioacetamide. Hepatotrophic factors. Extracellular matrix modulation. Progranulin.

LISTA DE ABREVIações

α-SM actin	α - smooth muscle actin
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DAB	3,3 diaminobenzidina
ECM	Matriz extracelular
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
HP	Hepatectomia Parcial
HSC	Células estreladas hepáticas
LGF	Fator de crescimento hepático
MMP	Metaloproteinase
PAI	Inibidor de ativador de plasminogênio
PBS	Phosphate Buffer Saline
PCNA	Antígeno nuclear de proliferação celular
PCR	Reação de polimerase em cadeia
RNA	Ácido ribonucleico
RNA_m	Ácido ribonucleico mensageiro
RT-PCR	Reação de polimerização em cadeia por transcriptase reversa
SSC	Cloreto de sódio e citrato de sódio
TGFβ1	Fator de crescimento transformador
TIMP	Inibidor tecidual de metaloproteinase
TNFα1	Fator de necrose tumoral
tPA	Ativador de plasminogênio tecidual
uPAR	Receptor de uroquinase ativador de plasminogênio
uPA	Uroquinase ativador de plasminogênio

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Acompanhamento do peso dos animais durante a indução da cirrose comparada com o peso dos animais destinados a controle..... 95
- Figura 2 - **2a** - Gráfico da relação entre peso do fígado e peso da carcaça dos animais dos grupos controle, HF e FS. Letras diferentes são significantes estatisticamente, para o valor de $\alpha = 0,05$ com teste de Tukey. **2b** - Gráfico comparando o volume do fígado dos ratos dos grupos controle, FH e SF. Letras diferentes são significantes estatisticamente, para o valor de $\alpha = 0,05$ com teste de Tukey. **2c** - Gráfico comparando o peso do fígado dos animais dos grupos controle, HF e SF. Letras diferentes são significantes estatisticamente, para o valor de $\alpha = 0,05$ com teste de Tukey..... 97
- Figura 3 - **3a** – Gráficos dos níveis sorológicos de indicadores de função hepática para GGT, alanina aminotransferase, fosfatase alcalina, aspartato aminotransferase e triglicerídeos. **3b** – Gráficos dos níveis sorológicos de indicadores de função hepática para albumina, bilirrubina, proteína total, creatinina e bilirrubina total..... 99
- Figura 4 - Fotomicrografia de fígado controle demonstrando histologia de um fígado normal. **A:** Veia centrolobular, indicada pelo **trevo**, na qual desembocam os sinusóides e para onde confluem os cordões de hepatócitos. **B:** Tríades hepática, composta pela veia hepática (**estrela**), artéria hepática (**seta**) e ducto biliar (**ponta de seta**). Coloração hematoxilina-eosina. Barra: 100 μ m..... 102
- Figura 5 - Fotomicrografia do parênquima hepático representando os animais dos grupos controle, FH e SF, corado com picrossírius. **A:** Controle, parênquima hepático sadio. **B:** FH, estrutura parênquimal hepática alterada, com septos fibrosos delgados (**seta**), evidenciando a regressão dos mesmos. **C:** SF, estrutura parênquimal alterada, com presença de nódulos regenerativos (**estrela**) e septos fibrosos espessos (**seta**). Barra: 200 μ m..... 105
- Figura 6 - **A:** Fígado cirrótico dos animais do grupo SF, coloração de fibras reticulinas. **B:** Fígado cirrótico dos animais do grupo SF, coloração de tricomio de Masson. **Seta** indica fibras reticulares e **ponta de seta**, proliferação de ductos biliares.

Barras: A: 100 µm e B: 200 µm.....	106
Figura 7 - A: Fígado cirrótico com hepatócitos apresentando lesão nuclear. B: Fígado cirrótico apresentando deposição de hemosiderina nos septos fibrosos. Ponta de seta indica hepatócitos com lesão nuclear e seta hemosiderina. Barra: 40 µm.....	106
Figura 8 - Fotomicrografia de parênquima hepático, representando animais dos grupos controle, FH e SF, corado com PAS. A e B: controle, o fígado normal é pouco positivo à PAS, quando comparado com fígado cirrótico. Observa-se maior positividade nas áreas centrolobulares (trevo) do que nas tríades hepáticas (estrela). C: FH, o fígado tratado com FH apresenta positividade à PAS maior do que o fígado de animais controles, porém, menor do que fígados sem tratamento (D). Seta indica citoplasma com grande positividade para PAS. Barras: A: 200 µm, e B, C e D: 100 µm.....	107
Figura 9 - Gráfico da média da quantificação de colágeno parenquimal (lóbulo hepático), por animal do grupo SF, antes e depois de tratados com solução fisiológica.....	109
Figura 10 - Gráfico da média da quantificação de colágeno parenquimal (lóbulo hepático), por animal do grupo FH, antes e depois de tratados com fatores hepatotróficos.....	109
Figura 11 - Gráfico de comparação das médias da porcentagem média da área de colágeno no fígado e desvio-padrão do Grupo FH (N=24) antes do tratamento ($11,13 \pm 2,21$) e depois do tratamento com fatores hepatotróficos ($7,83 \pm 1,93$), com diferença significativa ($p=0,001$) para o Teste t pareado.....	110
Figura 12 - A: microfotografia de fígado de animal no momento da biópsia, antes do tratamento com fatores hepatotróficos. B: microfotografia de fígado do mesmo animal após o tratamento com fatores hepatotróficos, na qual fica evidente a redução da proporção de colágeno.....	111
Figura 13 - Gráfico da relação de nódulos regenerativos por mm ² (RN/mm ²) por animal do grupo SF, antes e depois do tratamento com solução fisiológica.....	112
Figura 14 - Gráfico da relação de nódulos regenerativos por mm ² (RN/mm ²) por animal do grupo FH, antes e depois do tratamento com fatores hepatotróficos.....	112
Figura 15 - Gráfico de comparação das médias do número de nódulos regenerativos por mm ² e desvio-padrão do Grupo FH (N=10)	

antes do tratamento ($3,84 \pm 1,39$) e depois do tratamento com fatores hepatotróficos ($2,99 \pm 1,19$), com redução significativa de 22,14% ($p=0,001$) para o Teste T pareado.....	113
Figura 16 - A: microfotografia de fígado de animal do Grupo SF mostrando grande quantidade de colágeno e nódulos regenerativos. B: microfotografia do fígado de animal após o tratamento com fatores hepatotróficos, na qual fica evidente a diminuição dos septos fibrosos e da quantidade de nódulos regenerativos.....	114
Figura 17 - A: Septo fibroso de fígado cirrótico com células positivas para BrdU. B: Proliferação de ductos biliares em fígado cirrótico, apresentando células positivas para BrdU. Seta indica células em proliferação celular. Ponta de seta demonstra ducto biliar em formação. Barra: 100 μm	115
Figura 18 - A, C e E são fotomicrografias de intestino que serviram como controle positivo para a marcação de BrdU em fígados dos grupos controle, FH e SF (B, D e F). A e B: Grupo controle, nota-se a ausência de marcação por BrdU. C e D: Grupo FH, o grupo tratado com FH apresenta menos marcação que o grupo SF, o mesmo é representado pelas figuras E e F . Seta representa célula em proliferação celular. Barra: 100 μm	116
Figura 19 - Gráfico referente ao índice de proliferação celular de hepatócitos nos grupos controle, FH e SF. Os grupos FH e SF são estatisticamente iguais ($p>0,05$).....	117
Figura 20 - Gráficos das expressões relativas dos genes envolvidos na modulação da matriz extracelular hepática: colágeno α 1, TGF β 1, TIMP I, MMP 2 e uPA.....	121
Figura 21 - Microscopia eletrônica de varredura de fígados normais. A: superfície de fígado normal. Barra: 300 μm . B: sinusóide observado sob criofatura. Barra: 30 μm . C: veia centrolobular, mostrando confluência dos sinusóides lobulares após criofatura. Barra: 50 μm . D, E e F: fígados submetidos a corrosão por NaOH, mostrando fibras colágenos e proteoglicanas. Barra, respectivamente, 20 μm , 50 μm e 50 μm	126
Figura 22 - Microscopia eletrônica de varredura de fígados cirróticos. A: superfície de fígado cirrótico. Barra: 500 μm . B e C: superfície de fígados cirróticos submetidos a corrosão por NaOH. Barra A e B: 300 μm . D: fígado cirrótico submetido a corrosão por NaOH, mostrando leucócitos. Barra: 10 μm . E: veia centrolobular de fígado cirrótico mostrado após criofatura. Observa-se sinusóides menos evidentes, devido a colagenização dos mesmos. Barra: 50 μm . F: fígado cirrótico	

submetido a corrosão por NaOH, mostrando fibras colágenas mais espessas de forma ordenada. Barra: 30 μm . **G e H:** nódulos regenerativos de fígados cirróticos submetidos a corrosão por NaOH, apresentando arcabouço de fibras colágenas espessas. Barra G e H: 50 μm . **I:** organização colágena de fígado cirrótico submetido a corrosão por NaOH. Barra: 20 μm . **J:** fígado cirrótico submetido a corrosão por NaOH, com presença de fibras colágenas espessas com formação estrelar. Barra: 10 μm 127

Figura 23 - Fotomicrografias de áreas de proliferação de ducto biliar em fígados cirróticos. **A:** Imunoistoquímica para progranulina. **B:** Hibridização *in situ* para progranulina. As áreas fortemente marcadas são os ductos biliares, compostos por células epiteliais dos ductos biliares (**setas**). Barra: 100 μm 129

Figura 24 - Fotomicrografias da localização da proteína da progranulina no fígado de ratas utilizando imunoistoquímica. **A e C:** animais controles. **B e D:** animais cirróticos. Nas figuras **A e C** não foi utilizado hematoxilina. Observar nos septos fibrosos (**setas**) áreas marcadas (**ponta de seta**). Barra: 100 μm 130

Figura 25 - Fotomicrografias da localização do RNA de progranulina através de hibridização *in situ*. **A:** Animal controle, sense. **B:** Animal controle, anti-sense. **C:** Animal cirrótico, sense. **D:** Animal cirrótico, anti-sense. Barra: 100 μm 131

Figura 26 - Fotomicrografias the intestino. **A e C:** animais controles. **B e D:** animais cirróticos. Fotomicrografias **A e B:** imunoistoquímica para progranulina. **C e D:** hibridização *in situ* para progranulina. Observar células epiteliais intestinais marcadas para progranulina na imunoistoquímica (**seta**) e macrófagos situados no tecido conjuntivo dos vilos intestinais (**ponta se seta**) na hibridização *in situ*. Barra. 100 μm 132

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Comparação entre as médias de vários parâmetros de massa e volume, no grupo de animais tratados com solução fisiológica (Grupo SF) e tratados com fatores hepatotróficos (Grupo FH) – São Paulo - 2006.....	96
Tabela 2 -	Valores (média e desvio-padrão) da concentração no soro sangüíneo de indicadores de função hepática em animais sadios não tratados (grupo Controle), animais cirróticos tratados com solução salina (grupo SF) e tratados com fatores hepatotróficos (grupo FH) – São Paulo - 2006	101
Tabela 3 -	Comparação da média das áreas ocupadas pelo colágeno entre o espaço porta e a veia centrolobular (lóbulo hepático), em porcentagem, no grupo de animais tratados com solução fisiológica (Grupo SF) e tratados com fatores hepatotróficos exógenos (Grupo F), antes a após o tratamento – São Paulo – 2006.....	110
Tabela 4 -	Comparação da média do número de nódulos regenerativos por mm ² no grupo de animais tratados com solução fisiológica (Grupo SF) e tratados com fatores hepatotróficos exógenos (Grupo FH), antes a após o tratamento – São Paulo – 2006.....	113
Tabela 5 -	Index de proliferação hepatocitária dos grupos controle, FH e SF para BrdU – São Paulo -2006.....	117
Tabela 6 -	Expressão relativa do RNAm do colágeno 1 normalizado ao do β -actina em fígado de ratos. Os valores representam a média, com o desvio-padrão entre parênteses. Grupo controle, animais sadios; grupo SF, animais cirróticos tratados com solução salina; grupo FH, tratados com fatores hepatotróficos – São Paulo – 2006.....	122
Tabela 7 -	Expressão relativa do RNAm do TGF β 1 normalizado ao da β -actina em fígado de ratos. Os valores representam a média, com o desvio-padrão entre parênteses. Grupo controle, animais sadios; grupo SF, animais cirróticos tratados com solução salina; grupo FH, tratados com fatores hepatotróficos – São Paulo – 2006.....	145
Tabela 8 -	Expressão relativa do RNAm do MMP 2 normalizado ao da β -actina em fígado de ratos. Os valores representam a média, com o desvio-padrão entre parênteses. Grupo controle, animais sadios; grupo SF, animais cirróticos	

	tratados com solução salina; grupo FH, tratados com fatores hepatotróficos – São Paulo – 2006.....	123
Tabela 9 -	Expressão relativa do RNAm do TIMP I normalizado ao da β -actina em fígado de ratos. Os valores representam a média, com o desvio-padrão entre parênteses. Grupo controle, animais sadios; grupo SF, animais cirróticos tratados com solução salina; grupo FH, tratados com fatores hepatotróficos – São Paulo – 2006.....	123
Tabela 10 -	Expressão relativa do RNAm do Plau normalizado ao da β -actina em fígado de ratos. Os valores representam a média, com o desvio-padrão entre parênteses. Grupo controle, animais sadios; grupo SF, animais cirróticos tratados com solução salina; grupo FH, tratados com fatores hepatotróficos – São Paulo.....	124

QUADROS

Quadro 1 -	Composição da solução de fatores hepatotróficos.....	79
Quadro 2 -	Primers a serem utilizados no trabalho.....	89

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	25
2	OBJETIVOS	31
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
3	REVISÃO DE LITERATURA	34
3.1	FÍGADO.....	34
3.1.1	Histologia	35
3.1.2	Circulação	36
3.1.3	Embriologia	37
3.2	PROLIFERAÇÃO CELULAR E REGENERAÇÃO HEPÁTICA...	38
3.3	CÉLULAS HEPÁTICAS.....	41
3.3.1	Células estreladas hepáticas (HSCs)	42
3.3.2	Células endoteliais dos sinusóides	44
3.3.3	Hepatócitos	44
3.3.4	Células de Kupffer	45
3.3.5	Miofibroblastos	46
3.3.6	Células epiteliais dos ductos biliares	46
3.4	PROCESSOS PATOLÓGICOS.....	47
3.4.1	Fibrose	47
3.4.2	Cirrose	48
3.5	PROVAS DE FUNÇÃO HEPÁTICA.....	50
3.6	CITOCINAS ENVOLVIDAS NA ATIVAÇÃO DE HSCS: FATOR DE CRESCIMENTO TRANSFORMADOR β 1 (TGF β 1) E FATOR DE NECROSE TUMORAL α 1 (TNF α 1).....	52

3.6.1	TGFβ1	53
3.6.2	TNFα1	54
3.6.3	TGFβ1 e TGFβ1 no processo fibrótico agudo e crônico	54
3.7	GENES ENVOLVIDOS NA MODULAÇÃO DA MATRIZ EXTRACELULAR	55
3.7.1	Metaloproteinases (MMPs) e inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs)	55
3.7.1.1	<i>MMP 2 e 9 (Gelatinases A e B)</i>	57
3.7.1.3	<i>MMP 1, 8 e 13 (Colagenases)</i>	57
3.7.2	Uroquinase ativador de plasminogênio (uPA), Receptor de uroquinase ativador de plasminogênio (uPAR), Ativador de plasminogênio ativador (tPA) e Inibidor de ativador de plasminogênio (PAI)	58
3.7.3	Colágeno α1	60
3.8	MODELOS DE CIRROSE INDUZIDA EXPERIMENTALMENTE	61
3.8.1	Tetracloreto de carbono (CCl₄)	61
3.8.2	Tioacetamida (TAA)	62
3.8.3	Dimetilnitrosamida (DMN)	63
3.9	TRATAMENTO À FIBROSE E CIRROSE	64
3.9.1	Hepatectomia parcial	65
3.9.2	Medicamentosas	66
3.9.3	Terapia gênica	68
3.9.4	Fatores Hepatotróficos (FH)	69
3.10	PROGRANULINA	72
4	MATERIAIS E MÉTODOS	77
4.1	ANIMAIS	77
4.2	MANEJO DOS ANIMAIS NO PERÍODO EXPERIMENTAL	77

4.3	PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....	77
4.3.1	Anestesia.....	80
4.3.2	Colheita e processamento das amostras sanguíneas.....	80
4.3.3	Eutanásia dos animais.....	80
4.3.4	Processamento do fígado para histologia.....	81
4.3.5	Fixação e inclusão para microscopia de luz.....	81
4.4	COLORAÇÕES PARA MICROSCOPIA DE LUZ.....	81
4.5	IMUNOISTOQUÍMICA PARA BROMODEOXIURIDINA (BRDU).....	82
4.6	AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA.....	83
4.7	QUANTIFICAÇÃO DO COLÁGENO PARENQUIMAL.....	83
4.8	QUANTIFICAÇÃO DO NÚMERO DE NÓDULOS REGENERATIVOS.....	84
4.9	CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE ALBUMINA, PROTEÍNA TOTAL, ASPARTATO AMINOTRANSFERASE (AST), ALANINA AMINOTRANSFERASE (ALT), BILIRRUBINA, BILIRRUBINA TOTAL, CREATININA, TRIGLICERÍDIOS, FOSFATASE ALCALINA (FA) E GAMAGLUTAMILTRANSPEPTIDASE (GGT)	84
4.10	REAÇÃO POLIMERASE EM CADEIA TEMPO REAL (RT-PCR).....	85
4.10.1	Extração de RNA total pelo método Trizol.....	85
4.10.2	Quantificação RNA total.....	86
4.10.3	Tratamento do RNA total com DNaseI.....	86
4.10.4	Transição Reversa.....	87
4.10.5	PCR em Tempo Real no ABIPrism® 7000 Sequence Detection Systems (Applied Biosystems).....	87
4.10.6	Primers e sondas.....	89
4.11	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).....	89

4,12	IMUNOISTOQUÍMICA PARA PROGRANULINA.....	90
4.13	HIBRIDIZAÇÃO <i>IN SITU</i> PARA PROGRANULINA.....	91
5	RESULTADOS	94
5.1	MACROSCÓPICOS.....	94
5.2	PESO DOS ANIMAIS.....	94
5.3	PESO DO FÍGADO, VOLUME DO FÍGADO, RELAÇÃO FÍGADO/CARÇA.....	95
5.4	FUNÇÕES HEPÁTICAS.....	98
5.5	MICROSCÓPICAS.....	102
5.5.1	Histologia normal	102
5.6	AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA.....	102
5.6.1	Grupo SF	103
5.6.2	Grupo FH	104
5.7	MENSURAÇÃO DO COLÁGENO.....	108
5.8	QUANTIFICAÇÃO DO NÚMERO DE NÓDULOS DE REGENERAÇÃO.....	111
5.9	IMUNOISTOQUÍMICA PARA BRDU.....	114
5.10	PCR REAL TIME.....	118
5.10.1	Extração de RNA	118
5.10.2	Resultado de titulação de PCR das amostras para uPA, Col α 1, MMP II, MMP XIII, TGFβ e TIMP 1 normalizado com β-actina	118
5.10.3	Resultados da padronização e verificação da eficiência dos primers desenhados	118
5.10.4	Resultados da amplificação do PCR em tempo real para MMP II, TGFβ1, Plau, colágenoα1, TIMP I nas amostras de fígado	119
5.11	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	125

5.12	PROGRANULINA.....	128
5.12.1	Imunoistoquímica	128
5.12.2	Hibridização <i>In Situ</i>	130
6	DISCUSSÃO	134
6.1	O MODELO DE TIOACETAMIDA PARA CIRROSE HEPÁTICA EM RATOS.....	134
6.2	MEDIDAS DE MASSA E MACROSCOPIA.....	136
6.3	AVALIAÇÕES SOROLÓGICAS.....	136
6.4	QUANTIFICAÇÃO DO COLÁGENO.....	138
6.5	PROLIFERAÇÃO HEPATOCITÁRIA	142
6.6	EXPRESSÃO GÊNICA DE GENES ENVOLVIDOS NA REMODELAÇÃO DA ECM.....	144
6.7	PROGRANULINA EM RATOS CIRRÓTICOS.....	146
7	CONCLUSÕES	149
	REFERÊNCIAS	152

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Cirrose tem sido genericamente definida como uma doença crônica do fígado, na qual destruição difusa e regeneração das células do parênquima hepático ocorrem. Em adição, um difuso aumento no tecido conjuntivo resulta na desorganização da arquitetura lobular e vascular (CONN; ATTERBURY, 1987). O aumento da matriz extracelular (ECM) no processo cirrótico é caracterizado principalmente por acúmulo de colágeno tipo I, que é produzido em sua maioria pelas células estreladas hepáticas (HSC) (FRIEDMAN, 1993; SCHAEFER et al., 2003).

As HSCs ocupam localização perisinusoidal, ou espaço de Disse (LEE et al., 2003). Em fígados normais, as HSCs são células não pró-fibróticas (ARTHUR et al., 1998), apresentando fenótipo quiescente, porém durante o processo fibrótico hepático, as mesmas proliferam e se transformam em células miofibroblásticas (HSCs ativadas) (LEE et al., 2003; ZHANG et al., 1999) produzindo ECM nos espaços de Disse (AKIYOSHI; TERADA, 1999).

A ativação de HSC é resultado de uma complexa interação de diferentes fatores, como citocinas (FRIEDMAN, 1999) e fatores de crescimento (SVEGLIATI-BARONI et al., 1999), produzidos por células de Kupffer, hepatócitos e leucócitos infiltrados. Fatores como TGF β 1 e TNF α (MARTI et al., 1993) que atuam mediante uma situação de injúria hepática (FRIEDMAN, 1999; SVEGLIATI-BARONI et al., 1999).

As HSC ativadas sintetizam e liberam não apenas muitos componentes do tecido conjuntivo, como colágeno 1 e 3 (ARTHUR, 2000; FRIEDMAN, 2000; MIZOBUCHI et al., 1998), mas também os inibidores de degradação da matriz, como os TIMPs I e II (inibidor tecidual de metaloproteinase 1 e 2) (KNITTEL et al., 1999; RAMADORI, 1991) e o PAI I e II (inibidor de ativador de plasminogênio I e II) (LEYLAND et al., 1996).

Os TIMPs são responsáveis pela inibição das metaloproteinases (LEE et al., 2003; LI et al., 2004), enzimas com atividade fibrolítica (KNITTEL et al., 1999; MIZUTANI et al., 2001). Eles ligam-se ao sítio ativo das MMPs ativas, assim como nas terminações carboxílicas das proenzimas, inibindo desse modo sua atividade e prevenindo sua ativação (BASBAUM; WERB, 1996; RIES; PETRIDES, 1995).

Já o PAI, forma complexos estáveis, proteolicamente inativos com o uPA (QUAX et al., 1990). A função do uPA é degradar plasminogênio em plasmina, um degradador direto e indireto (ativa metaloproteinases) da ECM (MANGNALL et al., 2004).

O estado cirrótico do fígado é um processo auto perpetuante, sendo considerado irreversível. O transplante de fígado é a única terapia de tratamento definitivo em alguns casos de cirrose crônica (FRIEDMAN, 2004). Devido às dificuldades em se realizar transplantes, o meio científico busca outras soluções para essa enfermidade.

Uma das tentativas para um possível tratamento da cirrose foi a hepatectomia parcial. O uso da hepatectomia parcial para regeneração de fígados cirróticos surgiu da constatação de que fígados cirróticos mantêm um potencial regenerativo que pode ser usado por esta técnica (ANDIRAN et al., 2000; BENGMARK et al., 1966; DELHAYE et al., 1999; ISLAMI et al., 1958; RABINOVICI; WIENER, 1961; SAAD, 1972, 1975). Contudo, verificou-se que fígados cirróticos tendem a regenerar-se cirroticamente (ANDIRAN et al., 2000; CORPECHOT et al., 2002; NOGUCHI et al., 1990; WILASRUMEE et al., 2004).

Pelo fato das HSC desempenharem um papel central no processo fibrótico, elas são alvos das pesquisas sobre terapias medicamentosas para cessar ou reverter a cirrose (BATALLER; BRENNER, 2001; FRIEDMAN, 2003; WATSON, 2004). O fator de crescimento hepático (OE et al., 2003; SATO et al., 2000) e o losartam inibem a ativação de HSCs hepáticas e de miofibroblastos (DIAZ-GIL et al., 1999; RAMALHO et al., 2002). Igualmente atuam os anti-oxidantes, como o alfa-tocoferol (ANDIRAN et al., 2000; HOUGLUM et al., 2001). A glioxina induz as HSCs à apoptose (DEKEL, 2003; FRIEDMAN, 2003). A triiodotironina (MALIK et al., 2003),

a halofuginona, (SPIRA et al., 2002) e as vitaminas C e E (SOYLU et al., 2006) também reduzem a progressão da fibrose. Outros medicamentos também foram usados com bons resultados, como a pirfenidona (GARCIA et al., 2002), o retinil palmitato e a 5'-metiltioadenosina (MIZOBUCHI et al., 1998; SIMILE et al., 2001). Uma lista mais exaustiva de substâncias com potencial atividade antifibrinogênica é apresentada no trabalho de Pinzani et al. (2005).

Também têm sido testadas terapias gênicas, como por exemplo, o tratamento de fígados fibróticos e cirróticos com antagonistas de receptores de TGF β 1 (PINZANI et al., 2005) ou com a administração direta de RNAm de metaloproteinases em fígados cirróticos (SALGADO et al., 2000).

É sabido que o tamanho do fígado é influenciado pelo estado nutricional. Sendo assim, outra possível maneira de interferir na regeneração hepática fundamenta-se no fato de que os processos proliferativos do fígado podem ser modulados por fatores alimentares. Experimentos de desnutrição protéico-energética mostraram que o fígado de ratos desnutridos regenera-se mais lentamente após a hepatectomia parcial (DOYLE et al., 1968). Seu peso em animais intactos desnutridos reduz-se 27%, por hipoplasia e atrofia (PARRA et al., 1995a). Seguiu-se, assim, uma série de publicações visando a modulação nutricional da regeneração hepática e da proliferação dos hepatócitos por fatores hepatotróficos presentes nos alimentos.

Parra et al. (1992) testaram uma solução de fatores hepatotróficos (FH), baseada em uma solução hospitalar de nutrição parenteral, com aminoácidos, vitaminas e sais minerais. Administraram-na por via intraperitoneal (portal), o que proporcionou um aumento de 34,5% da massa hepática. O mesmo grupo adicionou hormônios (insulina, glucagon e triiodotironina) a solução, levando a um aumento de massa ainda maior, 67%, principalmente pela proliferação celular. Em adição, houve uma diminuição da porção fibrosa da matriz extracelular, sendo cogitado uma possível ação fibrinolítica (PARRA et al., 1995b). Quando o tratamento com FH adicionado de hormônios foi administrado a ratos hepatectomizados, houve aumento da proliferação de 17% e diminuição da proporção de colágeno hepático.

Diante desses resultados, Pereira et al. (2003) administraram FH juntamente com hormônios em ratos induzidos a fibrose por dimetilnitrosamida. Eles demonstraram acentuada diminuição de colágeno periportal e intersticial, aumento do peso do fígado e melhora das funções hepáticas.

Sendo assim, neste trabalho é avaliada a hipótese de que os FH aumentam a proliferação celular hepática, melhoram os índices bioquímicos de funções hepáticas e diminuem a deposição de ECM no fígado, levando a uma remodelação da ECM em ratos cirróticos induzidos experimentalmente por tioacetamida. Esses eventos aconteceriam por estímulos que inativariam as HSC, com conseqüente diminuição da produção de ECM e inibidores de degradação. Esses eventos levariam a uma melhora da arquitetura e vascularização hepática. Com isso, diminuiria a produção de TGF β 1, levando a uma diminuição da produção de ECM e de inibidores de enzimas fibrolíticas. Esse processo seria então auto-suficiente.

Para isso, avaliou-se a expressão gênica do colágeno α 1, MMP 2, MMP 13, TIMP I, Plau e TGF β 1 pela técnica de PCR tempo real; o índice de atividade celular de hepatócitos com imunoistoquímica para BrdU; o colágeno hepático e o número de nódulos regenerativos; os índices alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase, fosfatase alcalina, gamaglutamiltranspeptidase, bilirrubina total, bilirrubina, proteína total, creatinina, triglicerídeos e albumina; a morfologia do fígado por microscopia eletrônica de varredura; o peso, volume e densidade do fígado, peso da carcaça, relação fígado/carcaça e o peso semanal dos animais.

Em adição, foi testada a presença do fator de crescimento progranulina nos fígados de animais cirróticos, através de imunoistoquímica e hibridização *in situ*. A progranulina é um novo fator de crescimento que estimula proliferação (LU e SERRANO, 2000; HE et al., 2002; TANGKEANGSIRISIN et al., 2004), ancoramento e crescimento independente celular (BATEMAN e BENNETT, 1998; CHEUNG et al., 2004; PAN et al., 2004; TANGKEANGSIRISIN et al., 2004), desenvolvimento (DANIEL et al., 2003) e confere tumorigênese epitelial e promove invasão tumoral (DONALD et al., 2001; JONES et al., 2003; PAN et al., 2004; TANGKEANGSIRISIN et al., 2004; WANG et al., 2003). Para isso, partimos da premissa que a progranulina

é expressa em fígados cirróticos. Atuando como mediador inflamatório hepático na ativação de células de Kupffer e consequentemente na ativação das HSCs, assim como na proliferação desse tipo celular e de fibroblastos. Podendo deste modo, ser utilizado como marcador clínico para cirrose e alvo terapêutico para doenças hepáticas.

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

Avaliar a capacidade dos fatores hepatotróficos de atuarem na modulação da matriz extracelular, melhorando a condição morfológica e funcional de fígados de ratos cirróticos, induzidos experimentalmente por tioacetamida.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Verificar se os fatores hepatotróficos modificam o quadro histopatológico em fígados de ratos com cirrose experimentalmente induzida por tioacetamida;
2. Verificar se os fatores hepatotróficos reduzem a densidade volumétrica do colágeno parequimal e o número de nódulos regenerativos em fígados cirróticos;
3. Avaliar se os fatores hepatotróficos modificam a condição funcional do fígado cirrótico através de provas de função hepática;
4. Verificar se os fatores hepatotróficos estimulam a regeneração e proliferação hepatocitária em fígados cirróticos;
5. Verificar se os fatores hepatotróficos, como tratamento, agem na remodelação da matriz extracelular em fígados cirróticos;
6. Verificar os genes envolvidos no aumento da matriz extracelular hepática após injúria crônica por tioacetamida;
7. Verificar a expressão de genes envolvidos na remodelação da matriz extracelular em fígados cirróticos tratados com fatores hepatotróficos;

8. Verificar a presença de proteína e expressão gênica de progranulina em fígados de ratos cirróticos.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3 REVISÃO DE LITERATURA

O leitor encontrará nesta revisão de literatura temas referentes às características anatômicas, funcionais, embriológicas e patológicas regenerativas do fígado. Em seguida, são apresentadas citocinas envolvidas na ativação das células estreladas, genes envolvidos na modulação da matriz extracelular, modelos experimentais de indução de cirrose e terapias aplicadas no tratamento de afecções hepáticas.

3.1 FÍGADO

O fígado é o maior órgão sólido do corpo, constituindo aproximadamente 2 a 5% do peso corpóreo em adultos e 5% em recém nascidos. A anatomia clássica destinge, no fígado humano, dois lobos principais (direito e esquerdo) e dois acessórios (quadrado e caudado). Os fígados de ratos possuem lobo lateral esquerdo, lateral direito, medial direito, medial esquerdo, dois processos papilares e o processo caudado. Os três últimos são considerados lobos caudados. Entretanto, hoje gastroenterologistas dão mais atenção a anatomia vascular funcional do fígado (BISMUTH, 1988). O órgão é dividido em setores e segmentos com suplementos sanguíneos aferentes e eferentes independentes e vias biliares sem circulação colateral entre os segmentos, numerou-se então o fígado em 8 segmentos (I a VIII) (DAWSON; TAN, 1992).

Esse órgão com funções específicas, é interposto como um guardião entre o trato digestivo (e baço) e o resto do corpo. Por essa interposição, o fígado é provido com um suplemento duplo: ele recebe sangue da veia portal e da artéria hepática. Essas vias importam uma grande quantidade de endobióticos e xenobióticos, incluindo nutrientes, assim como substâncias tóxicas derivadas do sistema digestivo. A principal função do fígado envolve eficiente captação de aminoácidos, carboidratos, lipídios e vitaminas, assim como seu subsequente armazenamento, conversão metabólica e liberação no sangue e bile. Igualmente importante, é a

biotransformação hepática, que converte substâncias hidrofóbicas insolúveis em água, que podem ser excretadas pela urina e bile (BERK et al., 1987). Por causa das incontáveis funções metabólicas e secreção no sangue, o fígado é considerado uma glândula endócrina. Ao mesmo tempo, a produção de bile e secreção o faz também ser descrito como uma glândula exócrina (POPPER, 1988).

O fígado é o órgão principal no que diz respeito à degradação de produtos tóxicos, sejam eles resultado de processos metabólicos ou oriundos do meio externo. A degradação dos xenobióticos e produtos tóxicos de reações metabólicas é feita por enzimas monoxigenases transferase, como por exemplo, o citocromo P450, uma monoxigenase que contém um grupamento heme. A atuação destas enzimas difere de organismo para organismo e entre espécies, o que pode explicar as diferentes respostas de cada indivíduo a uma mesma quantidade de substância (ARIAS et al., 1995).

3.1.1 Histologia

O fígado é um órgão multicelular, composto de hepatócitos e outras populações de células não parenquimais. Além de três subpopulações de células sinusoidais bem conhecidas (células de Kupffer, células endoteliais e células estreladas hepáticas), existem também células epiteliais dos ductos biliares e células mesoteliais da cápsula de Glisson (GRISHAM, 1983).

As células hepáticas são agrupadas em cordões que se anastomosam entre si, formando unidades morfológicas chamadas de lóbulos hepáticos. Cada lóbulo possui uma forma poliédrica de tecido hepático de mais ou menos 0,7 por 2 mm. Em certos animais, como o porco, os lóbulos hepáticos são separados entre si por uma nítida faixa de tecido conjuntivo. Isso, porém, não ocorre em humanos e em ratos, onde vários lóbulos se encostam uns nos outros em quase toda sua extensão. Em algumas regiões, os lobos ficam separados por vasos e tecido conjuntivo. São essas, as regiões que ocupam os cantos dos poliedros, as quais são chamadas de espaço porta ou tríades hepáticas. Cada tríade apresenta um ramo da veia porta, um

da artéria hepática, um ducto biliar e vasos linfáticos, envoltos por uma bainha de tecido conjuntivo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999).

No lóbulo, as células hepáticas dispõem-se em placas orientadas radialmente. Cada placa é constituída por células dispostas em uma só camada. Essas placas celulares são perfuradas e, freqüentemente, anastomosam-se, resultando num labirinto complexo, que dá ao lóbulo um aspecto esponjoso. O espaço entre as placas hepatocitárias é ocupado por capilares sinusóides, denominados sinusóides hepáticos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999).

Rappaport et al. (1954) descreveram o conceito de ácino hepático. O ácino hepático diferentemente do lóbulo hepático, tem como centro o espaço porta. O parênquima acinar foi então dividido em três zonas: zona acinar I, região ao redor do espaço porta; zona II, zona acinar intermediária e zona III, ao redor da veia centrolobular.

3.1.2 Circulação

O fígado é dotado de uma circulação sanguínea peculiar, pois diferentemente dos demais órgãos, o fígado recebe considerável volume de sangue venoso através da veia porta, além do sangue arterial provindo da artéria hepática. Portanto, a veia porta e a artéria hepática são os vasos aferentes do fígado, enquanto que os vasos eferentes são as veias hepáticas, por onde o sangue sai do órgão (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999).

A veia porta e a artéria hepática se dividem várias vezes, até formarem os vasos interlobulares, nos espaços portas. Esses ramos se dividem no espaço porta, vascularizando e abrindo-se nos lóbulos hepáticos, nos sinusóides. Sendo assim, os sinusóides recebem tanto sangue venoso como sangue arterial, que aí se misturam (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999).

O sangue que tem como partida os vasos do espaço porta, percorre o lóbulo hepático e é drenado pela veia centrolobular, ramo inicial da veia hepática localizada centralmente no lóbulo hepático (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999). Ao adotar o modelo de Rappaport et al. (1954), pode-se dizer que a zona acinar I, é a zona mais oxigenada e nutrida do ácino e a zona acinar III a menos.

Entretanto, o escoamento da bile produzida pelos hepatócitos, tem trajeto oposto. A bile é escoada através de canalículos biliares, delimitados apenas pela membrana de duas células, até o ducto biliar, situado no espaço porta (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999).

3.1.3 Embriologia

Em humanos, o fígado se origina, assim como a vesícula biliar e as vias biliares, de um brotamento da porção caudal do intestino anterior, no início da quarta semana. O divertículo hepático se desenvolve a partir de duas populações celulares do endoderma. Fatores de crescimento de fibroblastos (FGF), secretados em níveis suficientes pelo coração em desenvolvimento, interagem com células bipotenciais e induzem a formação do divertículo hepático. O divertículo hepático se expande para o septo transversal, uma massa de mesoderma esplâncico situada entre o coração e o intestino médio. O septo transversal forma o mesentério ventral nessa região. O divertículo hepático cresce rapidamente dividindo-se em duas porções, à medida que penetra por entre as camadas do mesentério ventral. A parte maior é o primórdio do fígado. As células endodérmicas em proliferação originam cordões entrelaçados de células hepáticas e células epiteliais de revestimento dos ductos biliares intra-hepáticos. Os cordões hepáticos se anastomosam em torno de espaços revestidos por endotélio, os primórdios dos sinusóides hepáticos. O tecido fibroso, o tecido hematopoético e as células de Kupffer são derivados do mesênquima do septo transversal (MOORE; PERSAUD, 2004).

O fígado cresce rapidamente e, da quinta a décima semana, ocupa uma grande porção da cavidade abdominal superior. A quantidade de sangue oxigenado

que flui da veia umbilical para o fígado determina o seu desenvolvimento e sua segmentação funcional. Inicialmente, os lobos direito e esquerdo são aproximadamente do mesmo tamanho, porém o direito logo se torna maior. A hematopoese se inicia durante a sexta semana, dando ao fígado uma aparência vermelho-vibrante. Na nona semana, o fígado é responsável por 10% do peso total do feto. A formação da bile pelas células hepáticas começa durante a décima semana. A porção caudal do divertículo hepático origina a vesícula biliar, e o pedículo do divertículo forma o ducto cístico (MOORE; PERSAUD, 2004).

No rato, o fígado emerge no 10º dia embrionário (E10) e adquire seus limites anatômicos por volta do E12 (HOUSSAINT, 1980; SHIOJIRI, 1984) e as células parenquimais entre os dias E10-13. No fígado de ratos as células parenquimais são morfologicamente homogêneas até o dia E15-17, já os ductos biliares são identificados entre os dias E17-18. As células endoteliais e as de Kupffer já estão presentes no E10. Células hematopoiéticas são observadas no fígado após o E12, desaparecendo após o nascimento (MARTIN; FELDMANN, 1988). Nesse período, os hepatócitos representam uma população epitelial diplóide, e exibem uma ativa, porém transitória atividade proliferativa, sofrendo depois uma poliploidização (MARCEAU et al., 1982). É também sabido, que o fígado embrionário precoce contém células epiteliais progenitoras bipotenciais, que são capazes de se diferenciar em hepatócitos e células epiteliais biliares (MARCEAU et al., 1989).

3.2 PROLIFERAÇÃO CELULAR E REGENERAÇÃO HEPÁTICA

Regeneração e modulação tecidual são controladas por múltiplos processos que incluem migração celular, invasão, proliferação e degradação e síntese de moléculas da matriz extracelular (ECM) (FAUSTO et al., 1995; HARUYAMA et al., 2000).

A proliferação do fígado pode ser induzida por dois modelos distintos: regeneração compensatória e hiperplasia direta (COLUMBANO; SHINOZUKA, 1996). Na regeneração compensatória, o evento inicial é uma injúria hepática

(química/viral) ou secção cirúrgica de volume hepático. Esses eventos são seguidos de proliferação, inicialmente de hepatócitos e então de outras populações de células hepáticas, para rapidamente restaurar a massa hepática normal (MICHALOPOULOS, 1977). O melhor modelo experimental para regeneração hepática é a hepatectomia parcial de 70% em ratos, na qual a proliferação das células é um evento secundário em resposta a secção cirúrgica. Nesse caso a massa hepática volta ao seu valor normal entre 7 e 14 dias em ratos e em 21 dias em humanos. A hepatectomia parcial é considerada o maior estimulador de proliferação para hepatócitos (BUCHER, 2000).

Em contraste, na hiperplasia direta, hepatócitos são estimulados a proliferar por mitose na ausência de injúria hepática ou secção, resultando no aumento da massa hepática, além do normal. A massa hepática subsequente volta ao seu volume normal após a retirada do estímulo mitogênico, através da deleção apoptótica do excesso de células (COLUMBANO et al., 1985).

Apesar dos níveis de proliferação dos hepatócitos serem extremamente baixos durante a vida adulta, eles são capazes de rápida proliferação em resposta a um estímulo ou injúria (GRISHAM, 1983). Entretanto, a reconstrução normal do tecido implica no crescimento de outros tipos celulares (MARCEAU et al., 1988), como as células estreladas (HSCs) que após insulto químico hepático sofrem uma massiva, porém transitória proliferação (GRISHAM, 1980; SELL; LEFFERT, 1982).

A determinação dos índices mitóticos e a localização das áreas de mitose revelam que o processo de proliferação hepatocelular não é sincrônico: mitoses são primeiro achados nos hepatócitos das áreas periportais (HARKNESS, 1952), depois nos da zona intermediária, e só então, na zona da veia hepática terminal ou central (RABES et al., 1976). Isso indica que o processo de duplicação do DNA depende de condições intracelulares ou microambientais que são diferentes nas várias partes do lóbulo hepático (RABES et al., 1976).

Rabes et al. (1976) descreveu que o ciclo celular dos hepatócitos leva 33 horas, sendo que a fase G1 dura 20 horas, a S 7,7 horas e a G2 5,3 horas. Utilizando tiamida, ele demonstrou que a síntese de DNA hepatocelular começa

entre 15-18 horas após uma hepatectomia, com pico de proliferação celular após aproximadamente 24 horas (ANDIRAN, 2000; MANGNALL et al., 2004; RABES et al., 1976). Em camundongos o pico de proliferação celular após hepatectomia parcial é de 40 horas e em homem de 180-200 horas (MANGNALL et al., 2004). Também é de conhecimento que na regeneração hepática, o estado de hipoxia diminui o índice mitótico e atrasa seu pico de proliferação (TALARICO, 1969).

Vários índices podem ser associados à regeneração hepática como o peso e volume do fígado, índice mitótico, quantidade de DNA, imunoistoquímica para antígenos nucleares, expressão gênica ou quantidade de algumas proteínas do soro (SAKAMOTO et al., 1999).

Após um estímulo regenerativo, como por exemplo, uma hepatectomia parcial, hepatócitos restauram a massa original do fígado tanto em fígados normais como em fígado cirrótico pela síntese de DNA e replicação. Por outro lado, os índices de regeneração serão diferentes entre fígados normais e cirróticos concomitante com as diferenças estruturais (ANDIRAN et al., 2000).

Em fígados normais a atividade celular marcada por BrdU e PCNA é aproximadamente nula, já para animais cirróticos é respectivamente, $4,3 \pm 3,5$ e $6,5 \pm 5\%$. Os valores após hepatectomia parcial em ratos normais e cirróticos foram $46,2 \pm 8,7$ e $27,8 \pm 7,5\%$ para BrdU, e $83,7 \pm 6,5$ e $51,3 \pm 6,8\%$ para PCNA. (ANDIRAN et al., 2000).

Em pacientes humanos cirróticos o índice de proliferação celular é maior do que em pacientes com fígado normal com tendência a decréscimo durante a evolução da cirrose (DELHAYE et al., 1996). Porém os mecanismos pela qual a regeneração de hepatócitos diminui com o aumento da severidade da cirrose continuam desconhecidos (DELHAVE et al., 1999). Os mesmos autores comprovaram que pacientes com alto índice de positividade para PCNA tinham índices de sobrevivência maior. Sendo assim, pesquisadores tem indícios de que o índice de proliferação dos hepatócitos poderia ser útil no prognóstico de doenças hepáticas benignas (FANG et al., 1994; KAYANO et al., 1992) ou malignas (NG et al., 1994; TARAO et al., 1993).

A determinação da capacidade de proliferação celular pode ser feita por imunistoquímica por meio da incorporação de BrdU no DNA (HATAKEYAMA et al., 2002; IIMURO et al., 2003; MALIK et al., 2003). BrdU é um análogo sintético de timidina, que tem sido usada desde 1982 para avaliar os índices de proliferação celular (GRATZNER, 1982). A positividade para BrdU é um parâmetro eficaz no estudo da citocinética e proliferação celular. Na avaliação da regeneração hepática, a detecção de incorporação de BrdU é menos trabalhosa e consome menos tempo que autoradiografia de incorporação por timidina, a qual precisa radioativar precursores de DNA (AKAO et al., 2002). Sob condições normais, hepatócitos tem um índice de regeneração muito baixo, sendo assim, quase nenhuma atividade mitótica e incorporação por BrdU é encontrada (ANDIRAN et al., 2000).

Outro método para determinação de proliferação celular é a de PCNA (proliferation cell nuclear antigen). O PCNA é uma proteína nuclear associada com o ciclo celular, que atua como cofator para a DNA polimerase- λ . Foi originalmente detectado por Miyachi et al., em 1978, durante experimentos com soro de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico, em virtude de sua reação positiva com núcleos de células em proliferação e negativa com células restantes de tecido normal humano. Sua distribuição no ciclo celular aumenta a partir da fase G1, atingindo o pico máximo em S, diminuindo a partir da fase G2, e passando a exibir níveis tão baixos na fase M e em células quiescentes, que não é identificado por métodos imunistoquímicos (MORIS; MATHEWS, 1989). A expressão desta proteína tem sido usada rotineiramente como um marcador de proliferação celular (COLTRERA; GOWN, 1991; DELHAYE et al., 1999).

Os índices de PCNA são superiores aos de BrdU, porque não requerem injeção *in vivo* do antígeno (ANDIRAN et al., 2000) e porque são menos específicas, marcado não apenas as células na fase S do ciclo celular, mas também células no final da fase G1 (MORIS; MATHEWS, 1989).

3.3 CÉLULAS HEPÁTICAS

O fígado é composto por células parenquimais, representada por hepatócitos. Além dessas, o fígado possui células não-parenquimais: células estreladas hepáticas, células endoteliais dos sinusóides, células epiteliais dos ductos biliares, células de Kupffer, miofibroblastos e fibroblastos.

3.3.1 Células estreladas hepáticas (HSC)

Células estreladas ocupam localização perisinusoidal, conhecida como espaço de Disse, com extensões citoplasmáticas entre as células da linha endotelial dos sinusóides (LEE et al., 2003). Essas células são conhecidas como lipócitos hepáticos, células estocadoras de gordura, células de Ito ou células estreladas hepáticas.

Em fígados normais, HSC são células não fibrogênicas, contendo grande quantidade de vitamina A (ARTHUR et al., 1998). Apresentam muitas integrinas em sua superfície, incluindo $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha v\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$ e $\alpha 6\beta 4$ (CARLONI et al., 1996; IWAMOTO et al., 1999). Dentre elas, as integrinas mais importantes para o colágeno tipo I são $\alpha 1\beta 1$ e $\alpha 2\beta 1$ (GULLBERG et al., 1992; KIRCHHOFFER et al., 1990). Em HSCs ativadas existe um receptor para colágeno que não é integrina, o discoidin domain receptor-2 (FRIEDMAN, 2000).

Durante a fibrose, as mesmas proliferam, se transformam em células miofibroblásticas (HSC ativadas) e perdem seu estoque de vitamina A (LEE et al., 2003; ZHANG et al., 1999), produzindo ECM nos espaços de Disse (AKIYOSHI; TERADA, 1999). Há inclusive desenvolvimento de um aparato contrátil que inclui aumento de expressão de miosina e α -actina não estrutural (SCHAEFER et al., 2003). A ativação de HSC é resultado de uma complexa interação de diferentes fatores, como citocinas (FRIEDMAN, 1999) e fatores de crescimento (SVEGLIATI-BARONI et al., 1999), produzidos por células de Kupffer, hepatócitos, leucócitos infiltrados, tais como TGF $\beta 1$ e TNF α (MARTI et al., 1993). Outros fatores contribuem para a ativação das HSCs, como: stress oxidativo (SVEGLIATI-BARONI et al., 1999)

e modificação na atividade de troca entre Na^+/H^+ (ARTHUR et al., 1998; DI SARIO et al., 2004).

As HSCs ativadas sintetizam e liberam não apenas muitos componentes do tecido conjuntivo, como colágeno 1 e 3 (ARTHUR, 2000; FRIEDMAN, 2000; MIZOBUCHI et al., 1998), mas também os inibidores de degradação da matriz como os TIMPs I e II (KNITTEL, 1999; RAMADORI, 1991). Sendo assim, participam na progressão da fibrose hepática (FRIEDMAN, 1993). Recentemente, tem sido descrito que as HSC produzem urokinase plasminogen activator (uPA), tissue-type plasminogen activator (tPA) e plasminogen activator inhibitor (PAI) em culturas primárias e *in vivo* (LEYLAND et al., 1996). Entretanto, a função das HSCs na regulação do sistema ativador de plasminogênio (PA) durante a fibrose ainda é desconhecida (ZHANG et al., 1999).

As HSCs tem a habilidade de expressar significativa quantidade de enzimas degradadoras de matriz (KNITTEL et al., 1999), como os membros da família das MMPs; são elas MMPs 1, 2, 3, 9, 10, 13 e 14 (DI SARIO et al., 2004; LEE et al., 2003; SCHAEFER et al., 2003), stromelisinase e a metaloproteinase de membrana I (MT1-MMP) (KNITTEL, 1999).

Benyon et al. (1996) descreveram que HSCs ativas aumentam expressão de MMP 2 e TIMP II em culturas até o sétimo dia, e que o aumento de MMP 2 é responsável pela degradação da membrana basal normal de hepatócitos (SAKAIDA et al., 2004). Alcolado et al. (1997) demonstram que em cirrose o aumento de expressão de MMP 2 pode ativar mais HSCs, o que contribui para a amplificação do processo fibrótico.

Para a marcação das HSCs, tem sido usado por muitos pesquisadores a desmina. Porém muitos estudos tem mostrado que apenas 50% das HSCs centrolobulares são positivas para desmina em fígados normais (BALLARDINI et al., 1994; NIKI et al., 1996). Em contraste, GFAP (Glial fibrillary acidic protein) tem mostrado ser um bom marcador para HSC em fígados normais (NIKI et al., 1996). Sendo assim, GFAP é usado para marcar HSCs quiescentes. Quando ativadas, as mesmas passam a ser positivas para α SMA, portanto para as HSCs ativas, a

marcação pode ser realizada pela α -SMA (DEKEL et al., 2003; SALGADO et al., 2000).

Nos primeiros estágios de ativação, as HSC são muito mais susceptíveis ao efeito estimulatório do $\text{TNF}\alpha$ do que do $\text{TGF}\beta 1$, o qual as estimulam principalmente na produção agentes degradantes de matriz (gelatinase B, collagenases e stromelisina 1 e 2). Enquanto que em estágios mais avançados de ativação, as HSC são estimuladas principalmente pelo $\text{TGF}\beta 1$, produzindo principalmente inibidores de degradadores de matriz (KNITTEL et al., 1999).

Dentre as tentativas para um possível tratamento de processos fibróticos e cirróticos, estão as pesquisas enfocadas na tentativa de prevenir a ativação de HSCs e de acelerar sua apoptose ou inativação (SAKAIDA et al., 2004).

3.3.2 Células endoteliais dos sinusóides

Células endoteliais encontram-se formando os sinusóides hepáticos, juntamente com outras células não parenquimais. Elas têm numerosas funções em várias atividades biológicas, incluindo atividade de transporte, coagulação, fibrinólise, inflamação, resposta imune, regulação da pressão sanguínea, angiogênese, metabolismo lipídeo e síntese de componentes do estroma (RIEDER et al., 1992).

Células endoteliais sinusoidais sintetizam gelatinase A e B (UPADHYA et al., 1997) e são as responsáveis pela liberação de PAI I em fígados normais (ZHENG et al., 2005).

3.3.3 Hepatócitos

As células parenquimais ou hepatócitos tem forma poliédrica, medem de 20 a 30 μm de diâmetro em fígado normal e apresentam um ou dois núcleos. Quinze por cento de seu volume celular é representado por retículo endoplasmático, sendo sua organela mais característica. O hepatócito conta com mais de 1000 mitocôndrias, aproximadamente 300 lisossomas, 50 complexos de Golgi e um citoesqueleto tipicamente organizado (FELDMANN, 1989).

Tem grande versatilidade funcional, com funções glandulares endócrinas e exócrinas. Além de sintetizar, neutralizar e acumular vários compostos, transportam corantes do sangue para a bile. O hepatócito atua na síntese protéica, secreção da bile, acúmulo de metabólitos, função metabólica (MIZOBUCHI et al., 1998) e desintoxicação e neutralização (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999). Os hepatócitos tem como inibidor de proliferação, *in vivo* e *in vitro*, o TGF β 1 (DELHAYE et al., 1999).

Hepatócitos também são responsáveis pela produção de collagenases e stromelisina (ROEB et al., 1993). Em adição produzem fatores necessários para a ativação do proMMP13, liberados pelas HSCs e miofibroblastos (SHAEFER et al., 2003). Em contraste às células não parenquimais, os hepatócitos expressam TIMP I e II e metaloproteinases 2 e 9 (não ativas) em baixos níveis (KNITTEL et al., 1999; ROEB et al., 1993).

3.3.4 Células de Kupffer

Células de Kupffer são estreladas na forma e aderidas a parede sinusoidal, mas podem migrar ao lúmen (MACPHEE et al., 1992). Funcionam como recicladoras de todo tipo de material velho, desnecessário ou alterado, ocupando a posição de macrófagos hepáticos. Após ativação, elas secretam produtos com efeitos biológicos potentes, incluindo proteases e citocinas com influência no parênquima e em outras células não parenquimais (VAN DEN OORD et al., 1991).

Elas são ativadas por radicais livres e produzem mediadores pro-inflamatórios, que resulta no estopim da cascata inflamatória (THOMPSON et al., 1998).

As células de Kupffer estão envolvidas com a expressão principalmente de gelatinase-B (KNITTEL et al., 1999), além de collagenases, TIMP I (WINWOOD et al., 1995) e da secreção de outras MMPs (DI SARIO et al., 2004).

Entretanto, podem produzir radicais livres de injúria tecidual, pela iniciação da lipoperoxidação, o que leva a modificações irreversíveis nas estruturas das membranas celulares e de suas funções (BAUTISTA et al., 1990).

3.3.5 Miofibroblastos

População de fibroblasto, a qual apresenta característica fenotípica e funcional parecida, mas não idêntica com HSC ativada (SCHAEFER et al., 2003).

Apresentam expressão de gelatinase A e B, stromelisina, MMP 13 (SCHAEFER et al., 2003) e TIMP I e II (KNITTEL et al., 1999).

3.3.6 Células epiteliais dos ductos biliares

São as células formadoras dos ductos biliares, representam de 3-5% da população celular hepática. Elas desempenham importantes funções fisiológicas, modificam a composição da bile pela secreção de água, proteínas e bicarbonato, e fazem a reabsorção de glicose, glutamato, ânions e proteínas (DESMET, 1991).

As células epiteliais dos ductos biliares, assim como outras células não parenquimais expressam TIMPs (HERBST et al., 1997).

3.4 PROCESSOS PATOLÓGICOS

Aqui serão abordados aspectos da fibrose hepática e da cirrose.

3.4.1 Fibrose

Fibrose hepática é comumente o resultado patológico de várias injúrias hepáticas crônicas, entre elas: toxidade, estresse oxidativo, peroxidação lipídica (CASINI et al., 1991; MIZOBUCHI et al., 1998), anoxia (FAUSTO; MEAD, 1989), infecção e agentes metabólicos (FRIEDMAN, 2000). A fibrose é caracterizada por um aumento da ECM depositada nos espaços de Disse e pelo desbalanço entre síntese e degeneração da ECM (ALCOLADO et al., 1997; LIU et al., 2000; VAILLANT et al., 2001). O excesso de proteínas colágenas depositadas nos espaços de Disse interrompem o fluxo de nutrientes existentes entre a circulação sanguínea e os hepatócitos (FRIEDMAN, 1993).

A resposta fibrogênica é um processo dinâmico que inclui necrose de hepatócitos seguida por ativação de macrófagos (células de Kupffer), proliferação e ativação de HSCs e liberação de mediadores fibrogênicos (DEKEL et al., 2003; KANNO et al., 2003).

Esse estado eventualmente evolui para uma cirrose que está associada com morbidade e mortalidade significativa (GNAINSKY et al., 2004). Entretanto, a fibrose hepática é potencialmente reversível através de processos envolvendo degradação efetiva de ECM, se retirada sua causa (ZHENG et al., 2005).

Os membros da ECM responsáveis pela fibrose são principalmente os colágenos fibrilares tipo I e III. Os maiores sintetizadores de colágenos são as HSCs, estimuladas por uma variedade de citocinas e fatores de crescimento fibrinogênicos (ZHENG et al., 2005).

A fibrogênese hepática não é causada somente por um aumento na síntese de tecido conjuntivo, mas é basicamente o resultado entre aumento da síntese de matriz e diminuição ou alteração da degradação da matriz extracelular. Sendo assim, é o resultado da inibição da degradação da matriz e do acúmulo de fibras colágenas (BENYON et al., 1996).

A proliferação ductal é comumente observada em injúria hepática crônica e fibrose, sugerindo uma relação entre o aumento do número de células epiteliais ductais e fibrose hepática (MULLER et al., 1996). Segundo Muller et al. (1996), a proliferação das células epiteliais ductais, junto com inflamação crônica, agrava o processo de reações mesenquimais e de deposição de colágeno por mecanismos ainda não definidos.

A relação entre hepatócitos e HSC nos espaços de Disse contribui para a inibição da expressão de agentes degradantes de matriz. Por exemplo, a collagenase MMP 13 é liberada em sua forma inativa pelas HSCs quiescentes situadas nos espaços de Disse. A ativação dessas MMPs é dada por fatores produzidos por hepatócitos. Entretanto, devido ao excesso de deposição nos espaços de Disse, essa íntima associação entre esses dois tipos de células é perdida no fígado fibrótico. Esse fator contribui para diminuição de produção e ativação de MMPs (SCHAEFER et al., 2003).

É demonstrado que durante injúria hepática crônica, que resulta em fibrose hepática, MMP 2 e TIMP I e II (agentes fibrinogênicos) tem suas expressões aumentadas, enquanto os níveis de collagenases não são significativamente alterados (BENYON et al., 1996; HEBERST et al., 1997; TAKAHARA et al., 1995). Já em um modelo reversível de fibrose, as expressões de collagenases intersticiais (MMP 1 e 13) são mantidas inalteradas, enquanto, TIMP I e II diminuem (IRADELE et al., 1998; ZHENG et al., 2005).

3.4.2 Cirrose

A cirrose é uma doença de grande importância em medicina humana ou veterinária. Ela representa um problema de saúde no mundo inteiro e é uma das grandes causas de mortalidade. Cirrose hepática é comum em abuso de álcool, e hepatite viral C e B (OLASO; FRIEDMAN, 1998), não apresentando cura definitiva. A cirrose pode acontecer quando o processo de fibrose é combinado com regeneração e reparo ineficiente (FRIEDMAN, 1997). Ou seja, a cirrose ocorre quando há uma exagerada produção e deposição de fibras colágenas no espaço intersticial do fígado, morte de hepatócitos e desorganização dos lóbulos hepáticos, tornando o fígado pouco eficiente. (ARIAS et al., 1995).

Cirrose é uma doença crônica em que difusa destruição e regeneração das células hepáticas parenquimais tem ocorrido, e um difuso acréscimo de tecido conjuntivo provoca desorganização da arquitetura lobular e vascular (CONN; ATTERBURY, 1987). Indiferentemente dos fatores etiológicos envolvidos, muitos dos mais importantes estágios do desenvolvimento dessa doença inclui insultos hepáticos seguidos de ondas de regeneração, perda de função hepática, disfunção arquitetônica e aparecimento da fibrose (ROJKIND, 1982). Essas mudanças resultam em aumento hepático da resistência circulatória sanguínea portal, desenvolvimento de hipertensão portal, ativação de sistemas endógenos vasoativos, retenção renal de sódio e desenvolvimento de ascite (GROZSMANN; ATTERBURY, 1982).

Necrose hepática e falência hepática são duas condições clínicas importantes do fígado. Necrose é um processo complexo, caracterizado pela perda múltipla da regulação hepática que culmina com a perda da membrana celular, causando vazamento dos constituintes celulares. Falência hepática, de outro modo, é uma desordem rara, porém letal, caracterizada por uma severa disfunção hepática, icterícia, encefalopatia hepática e coagulopatia (TREY; DAVIDSON, 1970).

Os estudos a fim de prevenir e/ou reverter quadros de cirrose têm grande interesse científico, já que é uma patologia bastante comum e ainda não se tem conhecimento de nenhum método eficiente de reversão da cirrose. Os estudos sobre novos medicamentos para a reversão da mesma, feitos em animais são muitos, e

para estudar possíveis drogas que tenham potencial para fazê-lo, é necessário ter animais já afetados pela cirrose (tema abortado adiante nessa revisão).

Em cirrose, os índices de proliferação regenerativa de hepatócitos são maiores do que em fígados normais. Em adição, os indivíduos cirróticos com maiores índices de divisão celular em hepatócitos são os com maiores índices de sobrevivência (DELHAYE et al., 1999).

A cirrose hepática pode ser considerada o estágio final de várias doenças. A cirrose em seres humanos é um dos processos degenerativos mais preocupantes, pela sua elevada incidência global e por seu sombrio prognóstico. Afeta centenas de milhões de pacientes no mundo inteiro, sendo que nos EUA é a causa mais comum de morte entre as moléstias hepatobiliares e digestivas de origem não-neoplásica. Naquele país, é responsável por cerca de 30.000 mortes por ano, às quais se deve acrescentar 10.000 mortes por câncer hepático, sendo que a maioria se origina em fígados cirróticos (BEFELER; DI BICEGLIE, 2002; FRIEDMAN, 2003). No Japão 70% dos pacientes com carcinoma hepatocelular apresentam cirrose e estágios de disfunção hepática (HATAKEYAMA et al., 2002). A cirrose é considerada uma desordem irreversível (OE et al., 2003), a não ser pelo transplante de fígado (FRIEDMAN, 2004).

Atualmente infecções, principalmente pelo vírus da hepatite C, estão se tornando o maior agente etiológico da cirrose, posto antigamente ocupado pelo consumo excessivo de álcool (GARCIA et al., 2002).

Em geral, intervenções terapêuticas em cirrose, têm focado a melhora de algumas manifestações desta doença, especialmente hipertensão portal e ascite (EPSTEIN, 1988).

3.5 PROVAS DE FUNÇÃO HEPÁTICA

O termo “provas de função hepática” é aplicado a uma variedade de provas sorológicas para averiguar o estado geral do fígado e sistema biliar. As provas de

função hepática podem dividir-se entre as que são valores reais de função hepática: albumina, creatinina, proteína total e protrombina; e aquelas que são simplesmente marcadoras de doença hepática ou do sistema biliar, como as diferentes enzimas hepáticas.

Existem duas categorias gerais de enzimas hepáticas. O primeiro grupo inclui as enzimas transaminases: alanino aminotransferase (ALT) e a aspartato aminotransferase (AST), antes conhecidas como SGTP e SGOT (por suas siglas em inglês). A atividade de AST e ALT está relacionada com a integridade dos hepatócitos, permitindo que estas células realizem com eficiência a função de desintoxicação pela conjugação com os aminoácidos. Nas enfermidades hepáticas as concentrações destas enzimas encontram-se aumentadas no sangue, por isso a sua mensuração serve como prova da função hepática. Supõe-se que a ALT seja um indicador mais específico da inflamação hepática, enquanto que a AST pode aparecer elevada em doenças de outros órgãos, como o coração ou o músculo (KAPLOWITZ; EBERLE; YAMADA, 1982).

O segundo grupo inclui certas enzimas hepáticas, como a fosfatase alcalina (FA) e a gamaglutamiltranspeptidase (GGT), as quais indicam obstrução do sistema biliar, quer seja no fígado ou nos canais maiores da bile que se encontram fora deste órgão. A FA pode encontrar-se também em outros órgãos, como osso, placenta e intestino. Por esta razão, a GGT utiliza-se como uma prova suplementar para assegurar que o incremento na FA provém verdadeiramente do sistema biliar do fígado (KAPLOWITZ; EBERLE; YAMADA, 1982).

Os exames de albumina e proteína total passaram a ser utilizados após estudos realizados por Miller et al. (1951), pela marcação das proteínas com radioisótopo, na qual concluiu que o fígado sintetiza praticamente todo o fibrinogênio plasmático, a albumina, e mais de 80% das globulinas. Nas enfermidades hepáticas, observa-se uma redução da albumina sérica e da proteína total, devido ao aumento da permeabilidade capilar e pela expansão do espaço extracelular e pela conseguinte maior proporção de albumina no compartimento extravascular (GERACI; MEDWAY et al., 1973).

A bilirrubina é o principal pigmento da bile nos humanos, que ao aumentar provoca a coloração amarela da pele e dos olhos, chamada icterícia. A bilirrubina é um produto da quebra da hemoglobulina. Ela encontra-se no sangue sob a forma livre, não conjugada e sob a forma conjugada ao ácido glicurônico. A bilirrubina se encontra aumentada, às custas da bilirrubina conjugada, e pode ser notada antes da coloração amarelada da pele e de mucosas (icterícia). Alguns transtornos, como a doença hepática ou a destruição dos glóbulos vermelhos, ocasionam um incremento da bilirrubina no sangue. Níveis maiores de 3 mg/dL podem-se manifestar como icterícia. A bilirrubina pode aparecer incrementada em muitos tipos de doença hepática ou de trato biliar, e também por razões não específicas. Sendo assim, a bilirrubina sanguínea é considerada geralmente como um valor real da função hepática, porque reflete a habilidade do fígado de recolher, processar e separar a bilirrubina da bile (BLANCKAERT; SCHIMID, 1982).

Triglicerídeos são produzidos no fígado utilizando glicerol e outros ácidos graxos. São transportados no sangue por VLDL e LDL. Os triglicerídeos em conjunto com colesterol são úteis na avaliação do risco cardíaco. Níveis elevados são encontrados na síndrome nefrótica, na ingestão elevada de álcool, induzido por drogas (estrogênios, contraceptivos orais, prednisona, etc), hipotireoidismo, diabetes e gravidez. Os níveis baixos estão relacionados a má absorção, má nutrição e hipertireoidismo (KAPLOWITZ; EBERLE; YAMADA, 1982).

A creatinina também é usada em provas de função hepática, sendo considerada melhor parâmetro que a uréia sérica. Isso se deve, a menor síntese de uréia pelo fígado na injúria hepática aguda e complicações associadas, que eleva sua concentração plasmática. Sendo assim, os níveis de uréia podem estar elevados em decorrência de complicações secundárias (KAPLOWITZ; EBERLE; YAMADA, 1982).

3.6 CITOCINAS ENVOLVIDAS NA ATIVAÇÃO DE CÉLULAS ESTRELADAS: FATOR DE CRESCIMENTO TRANSFORMANTE $\beta 1$ (TGF $\beta 1$) E FATOR DE NECROSE TUMORAL $\alpha 1$ (TNF $\alpha 1$)

A ativação das HSC é realizada por TGF β 1 e TNF α 1. Sendo assim, TGF β 1 e TNF α 1 estão profundamente envolvidos nas reações de fibrose e reparação tecidual hepática (KNITTEL et al., 1999).

3.6.1 Fator de Crescimento Transformador β 1 (TGF β 1)

O TGF β 1 é uma citocina liberada em situações de injúria hepática crônica, a qual é secretada em sua forma inativa e pode ser ativada por plasmina (ZHANG et al., 1999). Plasmina libera o TGF β 1 da ECM para que ela seja ativada (YAMAGUCHI et al., 1990).

O TGF β 1 controla o crescimento hepático em fígados normais e em condições patológicas. O mesmo é um potente inibidor da proliferação dos hepatócitos *in vivo* e *in vitro*. Foi reportado como um dos fatores fisiológicos que fazem a regeneração hepática limitada (BRAUN et al., 1988). É contraditório que os níveis de RNAm e proteínas de TGF β 1 sejam baixos em fígados normais de roedores e humanos (BRAUN et al., 1988; NAGY et al., 1991) e altos na regeneração hepática (BRAUN et al., 1988), desenvolvimento (CARR et al., 1989), resposta inflamatória para injúria tecidual (ANNONI et al., 1992), fibrose hepática (CZAJA et al., 1989) e carcinoma hepatocelular (BEDOSSA et al., 1995). Sendo assim, a exata função do TGF β 1 em fígados normais e com patologias em crescimento continua desconhecida (DELHAYE et al., 1999).

A diminuição da degradação da ECM durante uma injúria crônica hepática deve ser atribuída à ação do TGF β 1 através da ativação de HSC (MARTI et al., 1993). A ativação das HSCs pelo TGF β 1 leva a uma maior expressão de enzimas fibrogênicas como as TIMPs (ZHANG et al., 1999), PAI I (KNITTEL et al., 1996) e de procolágenos α 1 (CASINI et al., 1993). Em adição, aumenta expressão de PAI I em hepatócitos (BUSSO et al., 1994) e em células endoteliais *in vitro* (RIEDER et al., 1993). É também atribuído ao TGF β 1, a síntese e ativação de MMP 2 (NAKAMURA et al., 2000), citocinas inflamatórias (MARTELLI-JÚNIOR et al., 2003) e a

estimulação de HSCs a entrarem na fase S do ciclo celular (TSUKAMOTO, 1999). Por conseguinte, considerado um indutor da síntese de colágeno e do processo de fibrogênese (MARGOLIN et al., 1997).

Além da redução da degradação da matriz, o TGF β 1 estimula a síntese de todos componentes da matriz, sintetizadas pelas HSCs. Sendo assim, promove uma explicação para a acumulação co-localizada com essas células durante a injúria hepática crônica (KNITTEL et al., 1996).

Enquanto TGF β 1 induz expressão principalmente de TIMPs e PAIs, TNF α 1 geralmente estimula MMPs e TIMPs.

3.6.2 Fator de Necrose Tumoral α 1 (TNF α 1)

Esta citocina, produzida principalmente por monócitos e macrófagos ativos (KANNO et al., 2003), também está envolvida na ativação das HSCs (MARTI et al., 1993). Porém, TNF α 1 aumenta a expressão de MMPs (SCHAEFER et al., 2003) e de TIMPs na fase inicial da injúria hepática (KNITTEL et al., 1999). Ela estimula fortemente a expressão de collagenase (MMP 13), stromelisin (POULOS et al., 1997), MMP 10, TIMP II (KNITTEL et al., 1999) e TIMP I em HSC humana (IREDALE et al., 1998).

3.6.3 TGF β 1 e TNF α 1 no processo fibrótico agudo e crônico

Na fibrose, as HSCs nos primeiros estágios de ativação são muito mais susceptíveis ao efeito estimulatório do TNF α 1 do que do TGF β 1 (KNITTEL et al., 1999). Diante disso, é aceito que TNF α 1 juntamente com as HSCs devem estar envolvidas na degradação da matriz, inicialmente após injúria hepática. Essa degradação da matriz deve ser essencial para as primeiras reações de reparação

tecidual, específica para tecido inflamatório. Em contraste, o TGF β 1 deve ser ativado em estágios avançados da injúria tecidual (KNITTEL et al., 1999).

Durante injúria hepática aguda, caracterizada por completa restituição, o TNF α 1 e TGF β 1 são expressos em tempos distintos. Primeiro as HSCs sofrem indução do TNF α 1, período caracterizado pela degradação da ECM, e em seguida pelo TGF β 1 (CZAJA et al., 1989). O TGF β 1 deve diminuir uma indução inicial de MMPs através das HSCs realizada pelo TNF α 1. Sendo assim, o TGF β 1 termina com a degradação da matriz e inflamação (KNITTEL et al., 1999).

No entanto, o TGF β 1 não se limita apenas a diminuir uma indução inicial de MMPs, mas atua na indução, através das HSCs, de enzimas fibrogênicas como TIMPs e PAIs. Esta atuação é caracterizada pela formação de tecido de granulação e constituição de cicatrização (FRIEDMAN, 1993; KNITTEL, 1999).

3.7 GENES ENVOLVIDOS NA MODULAÇÃO DA MATRIZ EXTRACELULAR

A modulação da matriz extracelular é realizada pela interação de diversos genes, dentre eles:

3.7.1 Metaloproteinases (MMPs) e Inibidores Teciduais de Metaloproteinases (TIMPs)

As MMPs (MMP1-14) são enzimas de ação proteolítica, envolvidas na degradação da ECM, enquanto os TIMPs (TIMP I-IV) são os inibidores específicos das MMPs. As MMPs e os TIMPs atuam em conjunto no “turnover” da ECM que ocorre durante vários processos patofisiológicos, incluindo reparo tissular, reparo de feridas, fibrose e invasão tumoral (LEE et al., 2003).

No fígado as MMPs são produzidas principalmente por HSC inativa (ROJKIND, 1982). Entretanto, TIMPs são detectáveis em todos os tipos celulares hepáticos, apresentando níveis mais elevados em células não parenquimais de origem fibroblásticas (HSCs ativas e miofibroblastos). Embora o TIMP II seja também expresso em células de Kupffer, e possua alguma expressão em hepatócitos (KNITTEL et al., 1999; ROJKIND, 1982).

As MMPs são secretadas no espaço extracelular como proenzimas, na qual tem ativadores específicos, normalmente mecanismos de clivagem associado a superfícies celulares. Essas enzimas ativadas podem ser inibidas pelas TIMPs (LI et al., 2004) (TIMP I, II, III e IV) (BODE et al., 1999). As células que produzem um excesso de colágeno I, como as HSCs ativas dentro dos septos fibrosos em fígados fibróticos ou cirróticos, devem expressar menos MMPs que as HSCs quiescentes. Devido a essa combinação de mecanismos, a degradação da ECM é estritamente regulada, o que previne prejuízo tissular inadvertido (BODE et al., 1999).

Na inibição das MMPs, as TIMPs ligam-se a posição catalítica das MMPs ativas, assim como nas terminações carboxílicas das proenzimas, inibindo desse modo sua atividade, e prevenindo sua ativação (BASBAUM; WERB, 1996; CAWSTON, 1995; RIES; PETRIDES, 1995).

As MMPs podem ser divididas em quatro grupos. As collagenases (MMP 1, 8 e 13), degradadoras de colágenos fibrilares, ou seja, colágenos tipo 1, 2 e 3. As gelatinases (MMP 2 e 9), as quais clivam colágenos desnaturados, ou seja, colágeno tipo IV (membrana basal), V e II (elastina). As stromelisinases (MMP 3, 10 e 11), que degradam proteoglicanas, glicoproteínas e tem alguma atividade no colágeno tipo IV e na elastina (KNITTEL et al., 1999). E finalmente, as outras MMPs, como as MMPs de membrana (metaloproteinases de membrana) ou MT-MMP, MMP ácida (MMP 6) e MMP VII (KNITTEL et al., 1999; MIZUTANI et al., 2001).

As MT-MMPs, são representantes de uma nova classe de MMPs, composta por 4 integrantes (MT1-MMP à MT4-MMP). As MT-MMPs contém um domínio transmembranal e realiza proteólise na superfície da célula através de um complexo ternário contendo MT-MMP, progelatinase A e TIMP II (BASBAUM; WERB, 1996).

A diminuição da degradação da ECM durante uma injúria crônica é devido a ação inibitória dos TIMPs sobre as MMPs, que são liberados pelas HSCs, sob indução do TGF β 1 (KNITTEL et al., 1999).

3.7.1.1 MMP 2 e 9 (*Gelatinase A e B*)

A MMP 2 pertence ao grupo das gelatinases, é expressa em HSCs, miofibroblastos, e em baixos níveis nas células de Kupffer (KNITTEL et al., 1999). É importante na regulação da membrana basal, pois a mesma degrada seus componentes incluindo colágeno IV, laminina e fibronectina. A expressão de MMP 2 em cirrose hepática aumenta vertiginosamente, isso contribui para a amplificação do processo fibrótico, pois o aumento da expressão de MMP 2 propicia degradação de matriz perisinusoidal normal, com ativação e proliferação de HSC e síntese de colágeno I (ALCOLADO et al., 1997; ZHENG et al., 2005).

Estudos têm indicado que a elevação dos níveis de gelatinase A acompanham a diminuição da degradação da ECM em fibrose e cirrose (TAKAHARA et al., 1995; ZHENG et al., 2005).

A MMP 9, também conhecida por gelatinase B, encontra-se expressa em miofibroblastos, células de Kupffer, HSCs e hepatócitos (KNITTEL et al., 1999).

3.7.1.2 MMP 1, 8 e 13 (*Colagenases*)

Apenas as MMPs 1, 8 e 13 conseguem degradar colágeno 1, sendo assim, atuam na resolução da fibrose hepática (SCHAEFER et al., 2003), formando o grupo das MMPs colagenases (KNITTEL et al., 1999). A MMP 13 é a colagenase intersticial específica dos ratos, enquanto que MMP 1 é a dos humanos (FREIJE et al., 1994; LEE et al., 2003).

A MMP 1 é capaz de clivar todas três cadeias do colágeno tipo I no mesmo locus entre glicina e isoleucina na cadeia $\alpha 1$ e entre glicina e leucina na cadeia $\alpha 2$ (HIGHBERGER et al., 1979), sendo os fragmentos geralmente separados a 37°C (STARK; KUHN, 1968).

MMP 13 é secretada por fibroblastos e HSCs. No entanto, apesar das HSCs poderem produzir e secretar a proenzima, elas não são capazes de converter-la em MMP 13 ativa. Para essa ativação é necessária a contribuição de outras células para a produção de atividades proteolíticas necessárias para a ativação das MMPs. O processo é complexo e envolve diferentes tipos celulares, várias atividades proteolíticas e seus inibidores. Os hepatócitos produzem os fatores necessários para a ativação da pro-MMP 13 (SCHAEFER et al., 2003).

Na fibrose, a expressão de MMP 13 acompanha o declínio de procolágeno $\alpha 1$, confirmando a degradação do mesmo pela MMP 13 (SCHAEFER et al., 2003). Em adição, estudos demonstram que mRNAs do procolágeno $\alpha 1$ e MMP 13 são reciprocamente modulados e por conseguinte, fatores de transcrição requeridos para ativação de colágeno 1 devem regular negativamente as MMPs e vice-versa (ROJKIND, 1999; SCHAEFER et al., 2003). Em caso de cirrose, na qual o colágeno alcança seus níveis máximos de deposição, a expressão de MMP 13 é diminuída substancialmente (LIU et al., 1996).

3.7.2 Uroquinase ativador de plasminogênio (uPA), Receptor de uroquinase ativador de plasminogênio (uPAR), Ativador de plasminogênio tecidual (tPA) e Inibidor de ativador de plasminogênio (PAI)

Dois tipos de ativadores de plasminogênio (PA) podem ser distinguidos, tissue-type plasminogen activator (tPA) e urokinase plasminogen activator (uPA), os quais diferem na reatividade imunológica e pelos genes que os codificam (VERHEIJEN et al., 1986). Adicionalmente, uPAR atua na regulação da remodelação da matriz e aumenta a eficiência da geração de plasmin, ligando uPA a sua

proenzima, pró-uPA, de tal modo que a ativação pode ocorrer diretamente na superfície celular (BEHRENDT et al., 1995; ELLIS et al., 1992).

Os PAs possuem inibidores específicos. Existem, ao menos dois tipos deles, o plasminogen activator inhibitor I e II (PAI I e II). Ambos podem formar complexos estáveis, proteolicamente inativos com uPA e tPA (QUAX et al., 1990).

Os PAs são proteases bem conhecidas que catalizam a conversão de plasminogênio em plasmina (MANGNALL et al., 2004). Plasmina tem um amplo espectro de atividade e está envolvido em muitos processos na qual a proteólise extracelular ocorre, além de atuar de forma importante na fibrólise. Em adição, também participa em inúmeros processos biológicos envolvendo a proteólise de ECM, como organogênese, remodelação tecidual (MANGNALL et al., 2004), inflamação, invasão tumoral, metástase (ANDREASEN et al., 1997; DANO et al., 1985; VASSALLI et al., 1991) e migração celular (DANO et al., 1985). Hamada et al. (1997) também atribuem a plasmina as funções de ativação de fatores de crescimento. Além das funções acima mencionadas, Akao et al. (2002) descrevem o aumento da plasmina como um importante mecanismo na proliferação de hepatócitos.

As funções da plasmina no “turnover” da ECM, são mediadas pela sua própria atividade, ou seja, na forma direta pela degradação proteolítica de ECM (incluindo fibronectina, laminina e proteoglicanas), ou indiretamente pela ativação de metaloproteinases (MMPs) (ILMURO et al., 2003; MURPHY et al., 1992; WERB et al. 1980).

Em adição, o uPA em culturas de hepatócitos *in vitro*, demonstrou converter cadeias inativas de HGF em duas formas de cadeias ativas (MARS et al., 1996). A importância do uPA na reparação do fígado pode ser demonstrada pela incapacidade de animais uPA deficientes em formar nódulos regenerativos em resposta a injúrias hepáticas agudas (CURRIER et al., 2003). Entretanto, o sistema ativador de plasmina é envolvido na ativação da citocina fibrogênica, o TGF β 1, que tem função importante na fibrose hepática (FRIEDMAN, 1993; ZHANG et al., 1999).

A atividade do sistema ativador de plasmina, é controlado pelos seus inibidores específicos, os PAIs. O uPA e PAI são importantes reguladores do balanço entre as atividades proteolíticas e antiproteolíticas que determinam o “turnover” da ECM, iniciando a cascata proteolítica, importante na remodelação tecidual associada com regeneração hepática ou fibrose (LEYLAND et al., 1996; ZHANG et al., 1999). Aumento de tPA e uPA deve atuar na degradação de ECM em fígados fibróticos. O aumento de PAI I associado com uPA, uPAR e tPA causa inibição a degradação da ECM em fígados cirróticos (ZHANG et al., 1999).

Estudos demonstram que a expressão de PA e PAI é baixa ou indetectável em fígados de ratos normais (QUAX et al., 1990; THORNTON et al., 1994;). Entretanto, na regeneração hepática após hepatectomia, a expressão de plasmina e PAI I aumenta. Na cirrose hepática em ratos, a expressão de tPA, uPA e PAI é descrita estar aumentada (SEKI, 1996). Esses achados sugerem que uPA é importante na remodelação da ECM em fígados fibróticos e cirróticos (ZHANG et al., 1999).

Células endoteliais e HSCs, têm sido identificadas como as maiores liberadoras da PAI I (KUIPER et al., 1989; ZHANG et al., 1999) , apesar dos hepatócitos apresentarem alguma expressão quando submetidos a alguma toxina (QUAX et al., 1990). HSC também produzem uPA e uPAR em culturas primárias (LEYLAND et al., 1996). Entretanto, os tipos celulares responsáveis pela ativação de uPA e uPAR durante fibrose hepática ainda é desconhecido (ZHANG et al., 1999).

3.7.3 Colágeno α 1

A deposição do colágeno tipo I é a principal característica do processo fibrótico (FRIEDMAN, 2000). O colágeno 1 consiste de três cadeias polipeptídicas, cada uma com uma massa molecular de aproximadamente 95 kilodaltons, que se associam em uma estrutura de tripla hélice (ILMURO et al., 2003).

Esse colágeno fibrilar é regulado positivamente pelo TGF β 1, que atua sobre as HSCs ativas (CASINI, 1993). A ativação de colágeno 1 pelas HSCs podem ser bloqueadas por antioxidantes (LEE et al., 1995). A degradação do colágeno I é realizada pelas collagenases, ou seja, as metaloproteinases 1, 8 e 13 (MMPs 1, 8 e 13) (SCHAEFER et al., 2003).

Estudos demonstram que RNAm procolágeno α 1 e MMP 13 são reciprocamente modulados, e por conseguinte, fatores de transcrição requeridos para ativação de colágeno 1 devem regular negativamente MMPs e vice-versa (ROJKIND, 1999; SCHAEFER et al., 2003).

3.8 MODELOS DE CIRROSE INDUZIDOS EXPERIMENTALMENTE

Algumas substâncias são conhecidas pelo seu efeito de injúria hepática, seja ela direta (quando a substância causa a injúria) ou indireta (quando produtos resultantes da degradação da substância causam a lesão hepática), são usadas na preparação de modelos animais. Os modelos experimentais são importantes para que novas drogas tenham seu potencial de reverter quadros de fibrose ou cirrose testado. Três dessas substâncias, a dimetilnitrosamina (DMN), tioacetamida (TAA) e tetracloreto de carbono (CCl₄), são as mais utilizadas para causar quadros de cirrose e fibrose em animais de experimento.

3.8.1 Tetracloreto de carbono (CCl₄)

A cirrose experimentalmente induzida por CCl₄ causa aumento significativo da atividade das transaminases (ALT, AST) e fosfatase alcalina (FA). Observa-se também diminuição de proteína total, albumina e hematócrito (DIAZ-GIL et al., 1999). No tecido hepático, macroscopicamente, verifica-se a presença de nódulos de regeneração com distribuição difusa e microscopicamente, infiltrado inflamatório

(KANNO et al., 2003), esteatose, necrose, fibrose, proliferação de ductos biliares e regeneração nodular (TREY; DAVIDSON, 1970).

A hepatocidade do CCl₄ depende do seu metabolismo pelo citocromo P450 dos hepatócitos. A injúria tecidual produz radicais livres, levando à peroxidação lipídica e lesão de membrana (SHI et al., 1998; SUN et al., 2001). As células de Kupffer são ativadas por radicais livres e produzem mediadores pro-inflamatórios, resultando no estopim da cascata inflamatória (THOMPSON et al., 1998).

A indução da cirrose com CCl₄, se dá por injeções intraperitoneais, normalmente três vezes por semana, na concentração de 0.15 ml/100 g de peso vivo, durante períodos variáveis. Li et al. (2003) após administração de CCl₄ por 8 semanas em ratos conseguiram apenas fibrose. Simile et al. (2001) e Diaz-Gil et al. (1999) usaram CCl₄ por 14 e 11 semanas respectivamente, e conseguiram induzir cirrose.

3.8.2 Tioacetamida (TAA)

Também conhecida como acetotioamida, etanetioamida e sulfoamina, é um composto hepatotóxico e carcinogênico para animais, e provavelmente em humanos, porém não existem estudos suficientes que comprovem isto. O composto encontra-se em forma de cristais incolores com odor característico, solubiliza-se em água 25°C e em etanol, sendo inflamável. Quando aquecida, a tioacetamida se decompõe e produz óxidos de nitrogênio e enxôfre. Pode ser absorvida por inalação de aerossóis ou ingestão. É utilizada principalmente na substituição de sulfidro de hidrogênio. Também pode ser usada como solvente orgânico em couros, indústrias têxteis e de papéis, como acelerador do processo de vulcanização de certos tipos de borrachas, como estabilizador de combustíveis e para prevenir deterioração da laranja (FITZHUG; NELSON, 1948).

Os modelos de indução à lesão hepática com TAA produzem alterações semelhante às que ocorrem nos quadros de cirrose humana, e portanto é

considerado um modelo válido. Essa semelhança, baseada na histologia e hemodinâmica, é maior do que a apresentada em induções com tetracloreto de carbono (HATAKEYAMA et al., 2002). Existem vários protocolos para a indução de lesão hepática em ratos com TAA, os mais usados são os de administração via intraperitoneal de 200mg de TAA (dissolvida em solução fisiológica) para cada quilograma de peso vivo do animal, 3 vezes por semana e em período mínimo de 4 semanas, porém efeito satisfatório é alcançado quando feito por um período superior a 7 semanas. Existem modelos de administração via oral, adicionada à água de beber. Entretanto, autores afirmam que este método é menos eficiente (CORBIN; MINUK, 2003).

Indução de lesão hepática com TAA, tornou-se um modelo bem usado para estudo de fibrose e cirrose em ratos (CHU et al., 2006; MULLER et al., 1988; ZIMMERMANN et al., 1987, 1992), sendo sua lesão caracterizada por necrose celular, fibrose, reorganização micronodular do parênquima, proliferação ductular, aumento de transaminases (TREY; DAVIDSON, 1970), peroxidação das membranas lipídicas (SUN et al., 2000), aumento de fosfatase alcalina (MULLER et al., 1996) e cirrose macronodular (HATAKEYAMA et al., 2002). As vantagens da indução de cirrose por TAA, são principalmente pela praticidade da indução, pela segurança e pela baixa mortalidade, assemelhando com a que acomete humanos e animais (AKAHOSHI et al., 2002; PAWA; ALI, 2004), porém, o tempo para a indução é maior (SEONG et al., 2003).

Seong et al. (2003), Corbin e Minuk (2003) e Muller et al. (1996) administraram TAA adicionada a água de beber por 30, 24 e 12 semanas respectivamente. Porém, apenas os dois primeiros autores conseguiram induzir cirrose. A administração mais usual, como já dito é a intraperitoneal. Dekel et al. (2003), Gnairsky et al. (2004) e Imuro et al. (2003) utilizaram essa administração por 7, 4 e 7 semanas respectivamente. Dekel et al. (2003) afirmam ter conseguido cirrose, os demais apenas fibrose. Hatakeyama et al. (2002) administraram TAA por 8, 10 e 12 semanas, conseguindo cirrose macronodular nas últimas duas administrações.

3.8.3 Dimetilnitrosamina (DMN)

Também conhecida como N-metil-N-nitrosometilamina e N-Nitrosodimetilamina. É um composto hepatotóxico, mutagênico e carcinogênico, com aspecto líquido oleoso de cor amarela, pode ser absorvido por ingestão ou inalação. Forma óxidos de nitrogênio na presença de calor e é bastante reativo com ácidos e bases, podendo formar gases tóxicos. Exposição em curto período causa irritações oculares, na pele, no trato respiratório e pode atingir o fígado; em períodos prolongados provoca cirrose e provavelmente causa o aparecimento de tumores (KHANNA; PURU, 1966).

Usado em modelos de lesão hepática, causa grande taxa de mortalidade quando fornecido em altas doses. Doses menores, por um período maior de tempo não causam cirrose de modo eficaz. DMN causa ascite nos animais, assim como a elevada quantidade de bilirrubina, fosfatase alcalina, γ -glutamilttransferase, alanina aminotransferase, e redução dos níveis de proteína total, albumina e globulina plasmática.

Embora a dimetilnitrosamina seja classicamente usada para a indução de cirrose em ratos, sua alta mortalidade, necrose e inflamação grave com sinais evidentes, induzem a um quadro que não reflete a maioria dos casos de cirrose em humanos e em clínicas veterinárias (SCHUPPAN et al., 1998; TWEDT, 1985; WATSON, 2004).

3.9 TRATAMENTO DE FIBROSE E CIRROSE

Muitos dos tratamentos para cirrose e fibrose, têm sido orientados apenas para a supressão ou inativação de agentes prejudiciais (GARCIA et al., 2002). Entretanto, as tentativas de tratamento efetivo tem como alvo comum: reduzir a síntese de matriz extracelular e aumentar sua degradação (WILLIAMS et al., 2001).

Inibição da ativação e proliferação das HSCs, ou alternativamente, estimulação da apoptose das HSCs ativas, são algumas das tentativas de tratamento antifibrogênico, pois propiciaria diminuição da ECM (DEKEL et al., 2003).

Vários modelos de terapias já foram testadas, entre eles:

3.9.1 Hepatectomia parcial

Uma das tentativas para um possível tratamento da cirrose hepática foi a hepatectomia parcial. O uso da hepatectomia parcial para regeneração de fígados cirróticos surgiu da constatação de que fígados cirróticos têm um potencial regenerativo que pode ser usado por esta técnica (ANDIRAN et al., 2000; BENGMARK et al., 1966; DELHAYE et al., 1999; ISLAMI et al., 1958; MALIK et al., 2003; RABINOVICI; WIENER, 1961; SAAD, 1972, 1975).

É sabido que um fígado após hepatectomia parcial de 70-90% pode alcançar seu volume original entre 10-14 dias em ratos, e com 21 dias em humanos (BUCHER, 2000).

Parra et al. (1995a) verificaram em ratos fibróticos hepatectomizados, que a regeneração parenquimatosa, leva a uma massa parenquimal com menos colágeno e com um modelo histológico funcional mais perto do normal. Contudo, verificou-se que fígados cirróticos tendem a regenerar-se cirroticamente. Ademais, a hepatectomia em um paciente que já está com insuficiência hepática introduz um risco adicional de complicações pós-operatórias e morte (ANDIRAN et al., 2000; CORPECHOT et al., 2002; NOGUCHI et al., 1990; WILASRUMEE et al., 2004). Os valores de proliferação celular após hepatectomia parcial em ratos normais e cirróticos são respectivamente de $46,2 \pm 8,7$ e $27,8 \pm 7,5$ para BrdU, e $83,7 \pm 6,5$ e $51,3 \pm 6,8$ para PCNA. Apesar desses dados mostrarem a capacidade hepática de se adaptar a uma lesão, entretanto o tecido regenerado por um fígado cirrótico é também cirrótico.

Em humanos a hepatectomia parcial leva a um aumento de uPA (degradador direto e indireto de ECM), possibilitando o início da regeneração hepática (MANGNALL et al., 2004).

3.9.2 Medicamentosa

Muitos medicamentos têm sido testados para tentar a cura, ou pelo menos em parte, do processo fibrótico e cirrótico. Abaixo estão citados alguns desses medicamentos, que de alguma forma obtiveram êxito:

Pirfenidone foi capaz de inibir proliferação de fibroblastos, inibindo a resposta de numerosos fatores de crescimento (DI SARIO et al., 2004), como o TGF β 1, um indutor de síntese de colágeno (MARGOLIN et al., 1997).

Sho-saiko-to, um medicamento herbal popular japonês, usado no tratamento de doenças hepáticas, principalmente hepatite crônica viral, tem demonstrado prevenir fibrose. Esse composto inibe a ativação de HSCs em diferentes modelos de animais fibróticos (SAKAIDA et al., 2004), além de ter efeito citoprotetor em injúrias hepáticas (SHIMIZU et al., 2003).

Relaxina, um fator de crescimento semelhante a insulina, conhecido hormônio reprodutivo, é detectável durante a prenhez, atuando na remodelação dos ligamentos interpúbicos e da cérvix na preparação do parto. Em modelos de fibrose ela tem demonstrado reduzir expressão de colágeno 1 e TIMP I em fibroblastos da derme e pulmão. Além de ter um grande potencial antifibrótico, pela inibição direta da expressão de colágeno I e indiretamente através da redução de TIMP I pelas HSCs, em fibrose hepática (WILLIAMS et al., 2001).

Tugsten foi descrito por proteger o fígado de lesões induzidas por tioacetamida, clorofórmio e tetracloreto de carbono. Sua ação se deve a inibição da progressão de radicais livres. Tugsten levou a um significativo decréscimo de ALT, AST e ALP e diminuição na mortalidade dos animais (PAWA; ALI, 2004).

Pirfenidone (5 methyl-1-phenyl-2-(1H)-pyridone), reduz os níveis de ALT, AST e FA e possibilita um re-arranjo parenquimal. Diminui expressão gênica de colágeno 1, 3, 4, TGF β 1, TIMP I e PAI I e diminui 40% da fibrose hepática em cirrose causada por CCl₄ (GARCIA et al., 2002). Essa droga também foi utilizada com sucesso em experimentos de adesão peritoneal (AL-TOOK et al., 1998), fibrose renal (SHIMIZU et al., 1998), fibromioma uterino (LEE et al., 1995) e de quelóides (SHETLAR et al., 1998).

α -Tocoferol, um antioxidante, aumenta a capacidade de regeneração hepática em ratos cirróticos, segundo positividade para anti-BrdU e anti-PCNA (ANDIRAN et al., 2000). Presume-se que como um antioxidante, α -tocoferol, previne a oxidação de constituintes celulares essenciais, e/ou previne a formação produtos oxidativos tóxicos, formados de ácidos graxos insaturados.

Losartan em modelo fibrótico reduziu o TGF β 1 e o colágeno IV, mas não teve efeito significativo na histologia (TERUI et al., 2002).

Gliotoxin, um metabólico de fungo, induz apoptose de HSC e hepatócitos, concomitantemente inibe ativação de NF- κ B, proteína envolvida na transcrição de vários genes envolvidos na inflamação e estresse (KARIN; BEM-NERIAH, 2000). Em adição, diminui modestamente o processo inflamatório no fígado (DEKEL et al., 2003).

Halofuginone, um inibidor de colágeno tipo I, diminui expressão de colágeno 1 em fibroblastos da pele de aves e de humanos (HALEVY et al., 1996) e previne aumento da síntese de colágeno em pulmões fibrosos (NAGLER et al., 1996). Quando utilizado em ratos cirróticos, previne ativação de HSC e aumento de colágeno 1 (GEORGE et al., 1999; GNAINSKY et al., 2004). Deste modo, aumenta capacidade regenerativa em fígados cirróticos após hepatectomia parcial (SPIRA et al., 2002).

A administração de 5'-metiltioadenosina preveniu peroxidação lipídica e melhorou o quadro de fibrose de ratos fibróticos induzidos por CCl₄. Os autores

obtiveram diminuição de expressão de RNAm de TGF β 1 e colágeno I (SÍMILE et al., 2001).

Triiodotironina (T₃) administrada após hepatectomia parcial de 70%, mostrou aumentar a capacidade regenerativa hepática. Se aplicado em fígado normal, o T₃ também propicia aumento da atividade celular (MALIK et al., 2003).

Han-Dan-Gan-Lee (HDGL), é uma preparação herbal chinesa, composta de 5 ervas medicinais, que quando administrada reverte, pelo menos em parte, a fibrose hepática (LI et al., 2003).

3.9.3 Terapia Gênica

A aplicação potencial de protocolos de terapia gênica em cirrose hepática irá depender do sucesso no tratamento do gene correto, envolvido na fibrogênese. Talvez o alvo devesse ser genes promotores de proliferação celular hepática que poderiam restabelecer rapidamente a massa hepática funcional.

Já foi utilizado, de caráter experimental, um vetor adeno viral conduzindo um cDNA modificado de uPA (Ad- Δ huPA) via veia ilíaca para tratamento de cirrose. O uPA é conhecido por ser um potente ativador de collagenases hepáticas latentes. O que poderia promover a degradação da ECM depositada nos espaços de Disse. Os autores (SALGADO et al., 2000) conseguiram um aumento da expressão de collagenases, parcial reversão da fibrose com concomitante melhora das funções hepáticas.

O fator de crescimento do hepatócito (HGF) foi usado em ratos cirróticos por ter atividades mitogênica, morfogênica, motogênica e anti-apoptótica. O uso de HGF diminuiu fibrose hepática e induziu regeneração hepática (OE et al., 2003).

Fator de crescimento hepático (LGF) administrado durante três semanas em fígados cirróticos diminuiu a fibrose, necrose e infiltração inflamatória, melhorando as funções hepáticas em ratos (DIAZ-GIL et al., 1999).

Tratamento com MMP I humano em ratos cirróticos, através de adenovírus recombinante, diminuiu o nível de ALT, aumentou proliferação hepatocitária e atenuou a fibrose. Entretanto, a exposição por tempo prolongado pode ter um efeito carcinogênico (ILMURO et al., 2003).

3.9.4 Fatores hepatotróficos (FH)

Outra possível maneira de interferir na regeneração hepática fundamenta-se no fato de que os processos proliferativos do fígado podem ser modulados por fatores alimentares. É sabido que o tamanho do fígado é influenciado pelo estado nutricional. Experimentos de desnutrição protéico-energético mostraram que o fígado de ratos desnutridos regenera-se mais lentamente após a hepatectomia parcial (DOYLE et al., 1968). Seu peso em animais intactos desnutridos reduz-se 27%, por hipoplasia e atrofia, isto é, redução do número e do tamanho dos hepatócitos (PARRA et al., 1995a).

Observações em fígados transplantados apoiam a hipótese de que o contrário pode ser possível, isto é, que fatores nutricionais podem estimular a reparação tecidual hepática e a proliferação dos hepatócitos. Seguiu-se, assim, uma série de publicações visando a modulação nutricional da regeneração hepática e da proliferação dos hepatócitos por fatores hepatotróficos presentes nos alimentos. Holecek (1999) publicou um artigo onde revisa a literatura e as estratégias desta abordagem.

Os experimentos têm revelado que o efeito de um fator hepatotrófico nutricional sobre o processo regenerativo pode depender do fato de ele ser administrado isoladamente ou em conjunto com outros. Vários autores sugerem que nenhuma substância, isoladamente, seria suficiente para regular todo o processo

regenerativo, recomendando a associação de várias delas. (HOLECEK, 1999; MICHALOPOULOS; DEFRANCES, 1997). A glicose é um exemplo. Sozinha ela pode inibir a regeneração de fígados hepatectomizados, mas administrada com aminoácidos estimula a síntese de DNA (BIRKHAHN et al., 1994).

Uma constatação oriunda dos transplantes de fígado chamou a atenção de pesquisadores envolvidos com a regeneração hepática. Fígados de doadores de pequeno tamanho, adquiriam massa adicional em receptores de maior tamanho, restabelecendo a proporção entre o peso do paciente e o do fígado, a qual normalmente se situa entre 2,5% a 3% (FRANCAVILLA et al., 1990; KAM et al., 1987; VAN THIEL et al., 1987). Partindo do pressuposto, também cogitado naqueles trabalhos, de que um dos mecanismos que regulam o tamanho do fígado em relação ao tamanho do indivíduo é o aumento da demanda por fatores hepatotróficos por via portal.

Parra et al. (1992) testaram uma solução de fatores hepatotróficos (FH), baseada em uma solução hospitalar de nutrição parenteral, com aminoácidos, vitaminas e sais minerais. Administraram-na por via intraperitoneal (portal), com o objetivo de simular uma condição de desequilíbrio entre o tamanho do animal (maior quantidade de fatores hepatotróficos) e o tamanho do fígado. Os autores conseguiram promover um estímulo regenerativo que aumentou em 34,48% a massa hepática.

Estudos revelam que, com a adição de hormônios (insulina, glucagon e triiodotironina) pode obter aumento de 67% da massa hepática em fígados intactos em dez dias de tratamento, causado principalmente por proliferação celular (PARRA et al., 1995b). Foi observado durante estes experimentos redução da porção fibrótica da ECM, o que levou este grupo a cogitar uma possível ação fibrolítica dos FH, semelhante ao observado na hepatectomia parcial. Parra et al. (1996) constataram que a redução da proporção de volume do colágeno em ambos os casos era muito próxima (44,5% na hepatectomia e 37,46% depois da estimulação exógena). Com o objetivo de verificar se a regeneração hepática poderia ser estimulada com a solução intraperitoneal de FH, Cogliati et al. (2004) a utilizaram em fígados de ratos que haviam sido hepatectomizados. Seus resultados demonstraram que houve

redução do colágeno intersticial e um aumento em 17% do índice de proliferação dos hepatócitos após sete dias de tratamento, sem mortalidade associada, demonstrando que o fígado em regeneração ainda tem uma reserva proliferativa.

Estimular a regeneração hepática e a proliferação dos hepatócitos com redução do colágeno é um dos objetivos principais das terapias experimentais para o tratamento da fibrose e da cirrose (PINZANI, 2005). Tendo em vista que a solução de FH proposta por Parra et al. (1994) tinha estas propriedades, Pereira (2003) a utilizou em ratos com fibrose induzida pela dimetilnitrosamina. Seus resultados mostraram acentuada redução do colágeno periportal e intersticial, com aumento do peso do fígado e melhora nos indicadores bioquímicos de função hepática após dez dias de tratamento, sem mortalidade neste período. O quadro histopatológico de fibrose se reduziu tanto nos animais não tratados como nos tratados, mas a melhora foi mais acentuada nos animais tratados.

O mecanismo local pelo qual a solução de FH promove a proliferação dos hepatócitos e a redução das fibras ainda não foi descrito, embora a ação no fígado de algumas substâncias seja conhecida. Esta solução é composta por aminoácidos, glicose, insulina, glucagon e triiodotironina. A insulina e o glucagon são hormônios que agem no trofismo e metabolismo dos hepatócitos. A insulina é importante para a proliferação das células hepáticas (JOHNSTON et al., 1977). Também potencializa o efeito de outros fatores de crescimento (JESUS et al., 2000). De acordo com Yamaguchi et al. (1997), uma solução enriquecida com glucagon e insulina promove o aumento do DNA hepático em ratos submetidos à hepatectomia parcial. O glucagon estimula a síntese de proteínas hepáticas e atua sinergicamente com a insulina na regulação da regeneração hepática. A triiodotironina aumenta a capacidade proliferativa, em fígados intactos e em culturas de hepatócitos, sobretudo quando se adiciona glucagon e aminoácidos. Também estimulam a síntese de DNA *in vivo* (OREN et al., 1998). O efeito destes hormônios é potencializado pela combinação com aminoácidos, vitaminas, glicose e sais minerais.

Com a administração intraperitoneal, os produtos são absorvidos pela parede dos órgãos e pelo mesentério, transportados pelos tributários da veia porta e

chegam ao fígado pelo sangue portal, oferecendo a energia e o material necessários à reconstrução parenquimal (PARRA et al., 1995a).

Assim, a solução de FH deve agir primariamente estimulando a replicação e diferenciação celular das células-tronco da linhagem hepática (hepatócitos e células estreladas), conforme observado por Parra et al. (1994). Os hepatócitos em proliferação produzem VEGF (vascular endothelial growth factor), o qual estimula a angiogênese e a permeabilidade vascular (SHIMIZU et al., 2001).

O VEGF (fator de crescimento vascular endotelial) também induz a produção da collagenase e promove a migração de macrófagos (CLAUSS et al., 1990; UNEMORI et al., 1992). O estímulo regenerativo no fígado causa o aumento imediato da atividade de u-PA, um ativador do HGF (MARS et al., 1995, 1996; STOLZ et al., 1999). Uma vez que a u-PA ativa a via que inicia a lise dos constituintes da matriz extracelular (BLASI, 1993), o início da regeneração promove a proteólise da matriz, a qual contém, nela imersos, fatores de crescimento e metaloproteinases que são liberadas durante a proteólise (MANGNALL et al., 2003; SCHUPPAN, 2001), dessa maneira o processo se auto-sustenta.

3.10 PROGRANULINA

Progranulina ou PCDGH (fator de crescimento derivado da célula PC) é um novo fator de crescimento envolvido na estimulação da proliferação celular (LU e SERRANO, 2000; HE et al., 2002), no ancoramento e crescimento independente de células (BATEMAN e BENNETT; 1998; HE e BATEMAN, 1999; CHEUNG et al., 2004; PAN et al., 2004; TANGKEANGSIRISIN et al., 2004) e no desenvolvimento (DIAZ-CUETO et al., 2000, DANIEL et al., 2003). Esse novo fator de crescimento é uma glicoproteína precursora da granulina (HE; BATEMAN, 1999). As granulinas, também chamadas epitelinas, são peptídeos de 6-kD com efeito modulatório de crescimento em vários tipos celulares, principalmente de origem epitelial (BHANDARI et al., 1992; DANIEL et al., 2000). Entretanto elas foram inicialmente encontradas em células mesenquimais, mais precisamente em células inflamatórias

ativadas (BATEMAN et al., 1990; BATEMAN e BENNETT, 1998; BATEMAN et al., 1999; HE et al., 2003). Evidência que levou a sugestão de que os produtos do gene progranulina estavam envolvidos na reparação tecidual (ZANOCO-MARANI et al., 1999). HE et al. (2003) propondo que a progranulina seria um mediador da resposta inflamatória aplicou progranulina em lesões experimentais na pele de camundongos. As lesões apresentaram maior acumulação de neutrófilos, macrófagos e fibroblastos e formação de vasos sanguíneos, sendo então comprovado sua função mediadora de reparação tecidual.

O precursor da granulina já foi encontrado em vários tecidos, principalmente em tecidos com alta atividade mitótica, como pele (DANIEL et al., 2000; HE et al., 2003), células das criptas intestinais e sistema reprodutivo (DANIEL et al., 2000). Apesar de algumas células epiteliais, tais como as do epidídimo e do uretér que são menos ativas mitoticamente que a pele ou trato gastrointestinal, contém altos níveis de expressão de progranulina (DANIEL et al., 2000).

A progranulina também possui alta expressão em células do sistema imunitário, queratinócitos, estômago, baço (predominantemente em células linfóides), placenta, ovário, músculo liso do miotério, glândula renal, epitélio escamoso do esôfago, linhas celulares bronquíolares humanas (DANIEL et al., 2000), linhas celulares fibroblásticas (Bhandari et al, 1992) e acrogranulina em porquinho da índia (BABA et al., 1993), porém os maiores índices foram os encontrados em tecido linfóide (DANIEL et al., 2000).

A distribuição da progranulina (RNA) em tecidos do sistema imunitário não corresponde com a esperada função de proliferação celular, implicando em uma função não mitogênica, porém desconhecida. Entretanto, sua presença em células mielóides e linfocitárias indicam uma possível função no próprio sistema imunitário (DANIEL et al., 2000).

No pulmão, células mesenquimais, rim, estômago, epitélio glandular do útero, epitélio glandular da mama, neurônios corticais (BHANDARI et al., 1993; DANIEL et al., 2000), incluindo células de Purkinje e células piramidais do hipocampo, há moderada expressão de progranulina (DANIEL et al., 2000). Já na próstata (PAN et

al., 2004) e células de Ley dig (DANIEL et al., 2000) a progranulina é raramente expressa. Em contrapartida, não há expressão de progranulina na musculatura esquelética, lisa e cardíaca (BHANDARI et al., 1993; DANIEL et al., 2000), tecido conjuntivo, células adiposas (BHANDARI et al., 1992), elementos vasculares e fígado sob condições normais (DANIEL et al., 2000).

Esses resultados em conjunto apontam a progranulina como um gene multifuncional, com importantes funções na homeostase epitelial, no sistema reprodutivo tanto masculino como feminino, imunológico e neurológico (DANIEL et al., 2000).

Uma função já conhecida da progranulina é a de ser um potente mitógeno para vários tipos celulares, entre eles os fibroblastos (XU et al., 1998; TANGKEANGSIRISIN et al., 2004), outras linhas de células mesenquimais (DANIEL et al., 2000) e de células epidérmicas (HE et al., 2003). Tanto que os índices de proliferação epitelial são proporcionais aos níveis de expressão de progranulina (HE e BATEMAN, 1999). Experimentalmente, a supressão da progranulina inibe parcialmente, porém não completamente a proliferação celular (LU e SERRANO, 2000; SERRANO, 2003).

Pesquisas recentes tem focado principalmente as funções tumorigênicas da progranulina, para sua utilização como marcador de tumor e como possível alvo terapêutico para tal. He et al (2002) super expressou a progranulina através de transfecção, relatando que a mesma promove formação de tumor, assim como a redução de sua expressão está associado com inibição do potencial tumorigênico (ZHANG e SERRANO, 1998; LU e SERRANO, 2000). Deste modo, seu bloqueio tem potencial como alvo para terapias contra câncer (HE et al., 2002).

A super expressão de progranulina é encontrada em muitas células cancerígenas, incluindo câncer de mama (LU e SERRANO, 1999; TANGKEANGSIRISIN et al., 2004), câncer de ovário (JONES et al., 2003), carcinoma renal (DONALD et al., 2001), mieloma múltiplo (WANG et al., 2003), próstata (PAN et al., 2004), teratoma (ZHANG e SERRANO, 1998) e carcinoma hepatocelular (CHEUNG et al., 2003).

Existe correlação entre a expressão de progranulina e o aumento de células cancerígenas invasivas, sugerindo que o aumento da expressão de progranulina é um evento inicial do carcinoma prostático, podendo assim ser usado como um novo alvo molecular para o tratamento e prevenção de câncer de próstata (PAN et al., 2004). Em câncer de mama, a progranulina também tem função mitogênica, em adição, inibi apoptose de células cancerígenas e promove angiogênese tumoral *in vivo* (TANGKEANGSIRISIN et al., 2004).

Os níveis de progranulina em carcinoma hepatocelular também foram estudados devido a sua grande expressão mostrada pelo método de microassay. Ambos os níveis, de proteína e de RNA, em carcinoma hepatocelular foram maiores que em fígados normais, contribuindo para proliferação celular, desenvolvimento e crescimento tumoral, invasão e metastasi (CHEUNG et al., 2004). Outros autores também demonstraram associação entre a expressão de progranulina com a metastasi (PAN et al., 2004). Entretanto, o mecanismo de aumento de expressão, assim como as funções biológicas da progranulina não é conhecido (CHEUNG et al., 2004). Esses autores descrevem a progranulina como um importante fator na hepatocarcinogênese, e como tendo potencial para marcador tumoral e alvo terapêutico.

Cheung et al. (2004) descreve baixa expressão de progranulina em fígado sob condições normais, contrariando o trabalho de Daniel et al. (2000) que não encontra células hepáticas expressando progranulina. Outro trabalho (XU et al., 2006) que tinha como propósito desenvolvimento de linhas celulares de células hepáticas estreladas (HSCs) para pesquisas com terapias antifibrogênicas, encontrou em suas linhas celulares LX-1 e LX-2 expressão de progranulina através do método de microassay. Essa expressão chamou a atenção dos mesmos, elucidando-a como possível alvo terapêutico. Essas linhas celulares tem fenótipo ativado, à semelhança das HSCs encontradas em cirrose.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4 MATERIAS E MÉTODOS

A metodologia experimental, assim como as técnicas desenvolvidas neste trabalho seguem descritas abaixo.

4.1 ANIMAIS

O presente projeto utilizou 60 ratos albinos Wistar (*Rattus norvegicus*) fêmeas, pesando aproximadamente 200g cada. Os animais foram identificados e mantidos em grupos de cinco em gaiolas plásticas forradas com serragem, os quais foram separados em 3 grupos: **Grupo FH (tioacetamida e fatores hepatotróficos)**, destinado ao tratamento com fatores hepatotróficos; **Grupo C (Controle)**, sem nenhum tratamento e **Grupo SF (controle com tioacetamida)**, destinado ao tratamento com solução fisiológica. Os animais utilizados no experimento foram provenientes do biotério do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP.

4.2 MANEJO DOS ANIMAIS NO PERÍODO EXPERIMENTAL

Foram colocadas diariamente em cada gaiola 50g de ração e água *ad libitum*. A cama foi trocada a cada 5 dias e os animais mantidos sob fotoperíodo natural (PARRA et al., 1995a).

4.3 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram divididos em 3 grupos (grupo FH, C, FS):

Grupo FT. Neste grupo, constituído por 25 animais, a cirrose foi induzida pela administração de 200 mg/Kg de peso corpóreo de tioacetamida (TAA) em solução aquosa a 4%, aplicada intraperitonealmente 3 vezes por semana durante 14 semanas, procedimento também adotado por Oe et al. (2003). A partir da sétima semana, a dose foi aumentada em 20%. Após 10 dias do final do tratamento todos os animais foram submetidos à biópsia hepática para coleta de um fragmento do fígado. No grupo FH, foi utilizada solução de fatores hepatotróficos (PARRA et al. 1995b) (Quadro 1), injetada por via intraperitoneal em duas injeções diárias, na dosagem de 40 ml/kg/dia durante 10 dias, começando o tratamento 10 dias após a biópsia. Além dos fatores hepatotróficos acima mencionados, cada animal recebeu 2,26 µg/ 200g de peso vivo de uma solução alcoólica de L-triiodotironina (T3).

Quadro 1 – Composição da solução de fatores hepatotróficos

Fatores hepatotróficos exógenos		<u>Solução de aminoácidos</u>	
• Glicose	104g	• L-fenilalanina	540mg
• Solução de aminoácidos	200mL	• L-isoleucina	370mg
• Piridoxina	2mg	• L-leucina	980mg
• Pantonato de cálcio	2mg	• L-acetato de lisina	590mg
• Tiamina	30mg	• L-metionina	530mg
• Fosfato de riboflavina	4mg	• L-treonina	490mg
• Cloridrato de potássio	1,43g	• L-triptofano	180mg
• Bicarbonato de sódio	1,50g	• L-valina	530mg
• Nicotinamida	50mg	• L-arginina (base)	1060mg
• Fosfato de monopotássio	750mg	• L-histidina (base)	460mg
• Sulfato de magnésio	500mg	• L-alanina	1030mg
• Vitamina C	500mg	• L-asparagina	380mg
• Insulina	62,5unid	• L-ácido aspartico	270mg
• Glucagon	0,625mg	• L-ácido glutâmico	250mg
• Ácido Fólico	2,5mg	• L-cisteína	30mg
• Vitamina B12	3,125mg	• L-ornitina	260mg
• Sulfato de Zinco	31,25µg	• L-prolina	840mg
• Água destilada (q.s.)	500mL	• L-serina	250mg
		• L-tirosina	160mg
		• L-glicina	800mg
		• Água destilada (q.s.)	100mL

Grupo FS. Este grupo, constituído por 20 animais, recebeu tioacetamida assim como o Grupo FH, porém, ao invés do tratamento com FH, foi administrada intraperitonealmente solução fisiológica (Aster), no mesmo volume e frequência aplicados ao primeiro grupo.

Grupo C. Este grupo, constituído por 15 animais, não foi manipulado, exceto na pesagem semanal. Os mesmos foram destinados à obtenção dos valores padrões dos ratos normais.

Os ratos de todos os grupos foram submetidos à pesagem semanal, até a eutanásia.

4.3.1 Anestesia

Os animais foram inicialmente colocados em uma caixa de indução onde receberam isoflurano em oxigênio a 100%. Uma vez que os animais apresentaram sinais de relaxamento muscular, foram retirados da caixa de contenção e a manutenção da anestesia foi realizada com auxílio de máscara de tamanho apropriado e o anestésico administrado através de circuito de Magill. A profundidade da anestesia foi avaliada através da verificação das frequências cardíaca e respiratória, assim como pelo grau de relaxamento muscular.

4.3.2 Colheita e Processamento das Amostras Sanguíneas

Amostras de sangue foram obtidas no momento da eutanásia dos grupos FH, FS e C através de punção cardíaca sob anestesia com isoflurano, utilizando-se seringa de 5ml e agulha 25 x 7mm. O sangue foi coletado em tubos vacutainer BD VACUTAINER® de 4ml siliconizado com gel separador ativador de coágulo. As amostras foram mantidas à temperatura ambiente e após o término da coleta foram centrifugadas por 15 minutos a 250 RPM para obtenção do soro. Este último foi aliquotado e armazenado, a -40°C, até a análise bioquímica.

4.3.3 Eutanásia dos Animais

Após a administração da solução de FH e da SF, os ratos foram novamente pesados e sacrificados. O volume do fígado foi calculado da seguinte maneira: os fígados foram suspensos por um fio e mergulhados em um bequer com água destilada sobre uma balança analítica. O peso adicional foi equivalente ao peso em água deslocada, portanto, ao volume em centímetros cúbicos. As carcaças também foram pesadas após a retirada das vísceras (pulmões, coração e trato digestivo completo).

4.3.4 Processamento do Fígado para Histologia

As amostras coletadas sempre foram dissecadas de maneira a nunca ultrapassar o diâmetro de 5 mm para microscopia de luz.

4.3.5 Fixação e Inclusão para Microscopia de Luz

A fixação foi feita em líquido fixador metacarn por 12 horas para histopatologia, imunoistoquímica e quantificação de colágeno. Foi também realizada fixação em McDowell para morfologia, histopatologia. A inclusão do material foi feita em paraplast para colorações padrões e imunoistoquímica (matacarn) e em resina para morfologia (McDowell). Amostras hepáticas foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer -80°C para extração de RNA e eventual utilização em imunoistoquímica e outras análises futuras.

4.4 COLORAÇÕES PARA MICROSCOPIA DE LUZ

Para a verificação dos aspectos morfológicos no processo de regeneração celular do fígado, foram utilizadas as colorações de hematoxilina-eosina (HE) e periodic acid Schiff (PAS) (BANCROFT; STEVENS, 1996). Também foi utilizada a coloração de picrossírius para evidenciar o colágeno (JUNQUEIRA, 1979).

4.5 IMUNOISTOQUÍMICA PARA BROMODEOXIURIDINA (BrdU)

Foi empregada a técnica de imunoistoquímica para a detecção de BrdU, um marcador de atividade celular, determinando o índice de células na fase “S” do ciclo celular.

Uma hora antes da eutanásia foi administrado BrdU (Sigma) intraperitonealmente nos animais dos grupos (C, FS e FH) na concentração de 100 mg/Kg de peso vivo, procedimento também adotado por Ohtsuka et al. (1998) e Hatakeyama et al. (2002).

Após a eutanásia, fragmentos do fígado dos ratos foram fixados em metacarn durante 12 horas e emblocados em paraplast. Os blocos foram cortados em micrótomo a 5 µm. As lâminas utilizadas foram previamente tratadas em solução de 5% de 3-aminopropiltietoxi-silano em acetona (1 minuto), dois banhos em acetona (20 segundos) e 2 banhos rápidos em água destilada.

Os cortes teciduais foram desparafinados em xilol, re-hidratadas com concentrações decrescentes de etanol e lavados em água corrente. Para o bloqueio da peroxidase endógena foi utilizada solução de peróxido de hidrogênio 5% em tampão fosfato (3 banhos de 10 minutos). A hidrolização do DNA foi realizado em solução (PBS) de ácido clorídrico 0,5N em PBS (1 hora). A prevenção da ocorrência de ligações inespecíficas foi realizada com leite em pó desnatado 5% em solução de PBS durante 30 minutos. O anticorpo primário usado foi o anti-BrdU RPN 202 1:100 (Amersham Biosciences) (durante 1 hora em estufa 37°C). O anticorpo secundário (1 hora) foi proveniente do kit de revelação Dako EnVision (Dako Cytomation), assim como a solução de diaminobenzidina DAB (10 minutos). Entre todos os

procedimentos, foram realizados banhos com tampão fosfato (PBS) (3 banhos de 3 minutos). A hematoxilina de Harris foi usada como fundo (6 segundos). A montagem das lâminas foi feita com lamínula (Knittel Glaser) e resina (Alkimia).

Para calcular a porcentagem de células na fase S do ciclo celular, foi feita a contagem de células positivas a BrdU em 15 ratos dos grupos SF e FH, e de 5 animais do grupo controle. Foram contadas 1000 células por animal no programa para computador KS-400 3.0 da ZEISS. A porcentagem foi encontrada dividindo o número de células contadas pelo número de células positivas.

4.6 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

Para a descrição das lesões, as lâminas foram comparadas aos pares e avaliadas da seguinte forma: para cada animal de ambos os grupos, ou seja, grupos FH e SF houve uma lâmina da biópsia inicial e uma após a eutanásia dos animais, cujo objetivo foi avaliar a evolução das lesões diagnosticadas.

4.7 QUANTIFICAÇÃO DO COLÁGENO PARENQUIMAL

Foram selecionados ao acaso materiais histológicos de 10 animais de cada grupo antes e depois dos tratamentos. Em cada lâmina foi quantificada a proporção volumétrica das fibras colágenas em relação ao parênquima. Foram medidos 15 campos por animal de tamanho uniforme. A imagem de cada campo foi digitalizada e tratada de forma a contrastar as fibras colágenas da coloração de fundo por limiar de cor. Foram usadas as lâminas coradas apenas por picrossírius. Após a separação, a proporção volumétrica ocupada pelas fibras colágenas foi medida.

O valor obtido nos 15 campos medidos de cada animal foi somado, obtendo-se o valor da *área de colágeno no fígado por animal* (ACFA). A porcentagem da área

de colágeno no fígado por animal em relação ao restante do tecido hepático foi calculada pela seguinte fórmula:

$$\frac{ACFA \times 100}{ACC}$$

na qual ACC é a área do campo por animal.

A porcentagem média da área de colágeno no fígado (PMAFC) por animal ou densidade volumétrica média do colágeno por animal (DVMC) foi calculada pela seguinte fórmula:

$$DVMC = \frac{\text{Média}_{ACFA} \times 100}{ACC}$$

Foi utilizado microscópio óptico Axioscópico Zeiss® com uma câmara acoplada. As imagens foram analisadas em um microcomputador com programa de morfometria específico KS-400 (Zeiss). Também foram realizadas fotomicrografias em microscópio Olympus BX 60, para documentação.

4.8 QUANTIFICAÇÃO DO NÚMERO DE NÓDULOS REGENERATIVOS

Utilizamos 10 animais de cada grupo experimental (Grupo FH e Grupo SF), escolhidos aleatoriamente. Em cada lâmina foi quantificado o número de nódulos regenerativos por área correspondente em mm², utilizando a objetiva de 4x. Sendo assim pudemos comparar a relação nódulo regenerativo por área e verificar se houve mudanças significativas desta lesão nos fígados cirróticos tratados com fatores hepatotróficos e não tratados.

4.9 CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE ALBUMINA, PROTEÍNA TOTAL, ASPARTATO AMINOTRANSFERASE (AST), ALANINA AMINOTRANSFERASE (ALT), BILIRRUBINA, BILIRRUBINA TOTAL, CREATININA, TRIGLICERÍDIOS, FOSFATASE ALCALINA (FA) E GAMAGLUTAMILTRANSPEPTIDASE (GGT)

As amostras congeladas de soro provenientes da punção cardíaca, anterior a eutanásia foram processadas no analisador bioquímico automático Liasys, marca MAS do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

As concentrações séricas de GGT, AST, ALT, triglicerídeos, bilirrubina, bilirrubina total e fosfatase alcalina foram obtidas com kits da Biosystems. As concentrações séricas de creatinina pelo método de picrato alcalino, as de proteína total pelo método de bioreto e o de albumina pelo método de verde de bromo cresol.

4.10 REAÇÃO DE POLIMERASE EM CADEIA EM TEMPO REAL (RT-PCR)

As etapas da RT-PCR são descritas a seguir.

4.10.1 Extração de RNA total pelo método Trizol

O fígado dos ratos foram cortados, congelados em nitrogênio líquido e transferidos para tubos eppendorf de 1,5 ml Rnase free. Os tubos foram expostos à temperatura de -20°C e posteriormente armazenados a -80°C até análise. Cerca de 40 mg de tecidos foram pesados e acrescidos de 500 μl de TRIzol e com o auxílio de um bastão plástico estéril foram macerados até solubilização total. O homogenato foi armazenado a temperatura ambiente durante 5 minutos. Após este período, 100 μl de clorofórmio foram adicionados (200 μl para cada ml de TRIzol), os tubos fechados foram agitados vigorosamente por aproximadamente 15 segundos e incubados novamente a temperatura ambiente por 2-3 minutos. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos, 10.000 rpm a 4°C .

Após a centrifugação o sobrenadante foi transferido para os tubos contendo 500 μl de isopropanol, homogeneizados suavemente e incubados a temperatura ambiente por 15 minutos. As amostras foram novamente centrifugadas por 10

minutos, 10.000 rpm a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pelete (RNA-Total) solubilizado com 1 ml de álcool 75%. Uma nova centrifugação foi realizada por 5 minutos, 7.000 rpm a 4 °C, o excesso de álcool retirado e o pellet (RNA Total) solubilizado em 200 µl de água tratada com DEPC. Uma alíquota foi removida para verificar a integridade do RNA em gel de agarose e para quantificação, e o restante da solução foi armazenado imediatamente em freezer –80°C até sua utilização. A análise qualitativa foi realizada em gel de agarose 1% diluída em TBE 1X. Para tanto, 10 µl do RNA total foi acrescido de 1,5 µl do corante Loading Dye 10X e 3,5 µl água DEPC e a eletroforese foi realizada durante 60 minutos a 80W.

4.10.2 Quantificação RNA Total

Para a quantificação do RNA total a amostra foi diluída 1:4, ou seja, 40 µl de H₂O DEPC adicionada de 10 µl do RNA total e homogeneizada suavemente. A quantificação foi realizada em Biofotômetro a 260nm. O equipamento foi zerado com água DEPC. A qualidade do RNA total extraído (bandas 18S e 28S) foi visualizada em gel de agarose a 1%.

4.10.3 Tratamento do RNA total com DNase I

Para eliminar quaisquer resquícios de DNA remanescente foi utilizado o tratamento com DNase I. Os tubos foram identificados e deixados em banho de gelo. Foi pipetado um volume suficiente para conter 1,6 ng/µL de RNA total após a RT-PCR. As condições de reação encontram-se abaixo:

1 µl DNase I reaction buffer 10x

1 µl da enzima DNase I (1 U/µl)

H₂O DEPC para o volume final de 10 µl

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

4.10.4 Transcrição Reversa

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

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

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

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

alvo foi detectada em tempo real pela emissão de fluorescência, que ocorre quando há formação de dupla fita na região codificada pelo par de primers. A quantificação relativa da amplificação foi feita pela fluorescência captada pela unidade óptica do aparelho.

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

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

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

anelamento, o fluoróforo se intercala na dupla fita, liberando a fluorescência que é, portanto, proporcional ao número de cópias.

4.10.6 Primers e Sondas

Os primers e sondas específicos foram adquiridos junto a AppliedBiosystems® pela identificação Assay ID, segundo quadro 2.

PRIMERS	ASSAY ID
Colágeno I	Rn00801649 q1
MMP II	Rn01538167 m1
Plau	Rn 00695755 m1
TIMP I	Rn00587558 m1
TGFβ1	Rn00572010 m1

Quadro 2 - Primers a serem utilizados no trabalho

O house-keeping utilizado foi o β-actina (reverse AGATTACTGCCCTGGCTCCTA, probe CCACCAATCCACACAGAGTACTT e forward ACCATGAAGATCAAGATCAT) por estar presente no citoesqueleto das células hepáticas, independentemente dos tratamentos.

4.11 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

O fígado de ratos controles (2 animais) e cirróticos (2 animais) foram processados para MEV, visando a observação 3D em nível celular da superfície hepática, parênquima e das fibras fibrosas. Com isso, possibilitando visualizar as modificações da matriz extracelular durante o processo cirrótico.

Os fragmentados dos fígados foram processados de duas maneiras:

1. Fragmentos fixados em Karnovisk modificado 2,5%, para visualização da superfície; parênquima, através de crio-fratura (nitrogênio líquido) e para estoque. A fixação durou 2 dias, seguido pelo tratamento em ósmio durante 2 horas e desidratação (álcool 70, 80, 90, 95, 100 I, 100 II, 100 III e 100 IV, 100 V). Entre os procedimentos os materiais foram lavados com água destilada (3 vezes de 10 minutos). O processo seguiu com a passagem pelo Ponto Crítico, montagem em stubs e metalização em ouro.
2. Materiais destinados à corrosão com hidróxido de sódio (NaOH), para retirada das células e evidencialização de fibras conjuntivas. Os fragmentos ficaram 2 dias no NaOH em concentrações de 5% e 10%. Só então foi fixado em Karnovisk modificado 2,5% por 30 minutos, passado pelo ósmio durante 2 horas e desidratados (álcool 70, 80, 90, 95, 100 I, 100 II, 100 III e 100 IV, 100 V). Entre as passagens, os materiais foram lavados em água destilada em 3 banhos de 10 minutos. O processo seguiu com a passagem pelo Ponto Crítico, montagem em stubs e metalização em ouro.

O microscópio eletrônico de varredura utilizado foi o localizado no Laboratório de Microscopia Eletrônica do ICB-USP.

4.12 IMUNOISTOQUÍMICA PARA PROGRANULINA

O processamento e corte do material, assim como, desparafinação e re-hidratação foi o mesmo utilizado para a imunoistoquímica de BrdU. O desmascaramento do antígeno foi feito com solução de citrato de sódio pré-aquecida

em microondas (20 minutos). Para o bloqueio da peroxidase endógena foi utilizado o bloqueador de peroxidase endógena da Dako (K0673) durante 30 minutos. Em seguida, as lâminas foram incubadas com tampão bloqueador durante 3 horas (3% soro fetal bovino, 0,1% Tween-20).

O anticorpo primário (coelho, anti-progranulina humana), produzido no Laboratório de Endocrinologia do Victoria Hospital, Universidade McGill, foi utilizado na concentração 1:350 em diluente para anticorpo (Dako, S0809) over night à 4°C. O anticorpo secundário (15 minutos), assim como a Streptavidina-HRP (30 minutos) e o substrato cromógeno DAB (3,3 diaminobenzidina) (10 minutos) são provenientes do kit de revelação Dako EnVision (Dako Cytomation, K0673). A desidratação segue o mesmo protocolo que a imistoquímica para BrdU.

4.13 HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU* PARA PROGRANULINA

As secções de fígados dos animais dos grupos Controle (15 animais), Fatores Hepatotróficos (25 animais) e Solução Fisiológica (20 animais) fixados em metacarn e incluídos em paraplast foram cortados em micrótomo a 6µm, desparafinadas em Citrosolv por 10 minutos (2x 5 minutos), então desidratados em álcool 100%, seguidos por progressiva hidratação em álcool 95, 70 e 50%. As secções foram pós-fixadas em paraformaldeído 4% (Fisher), pH 7,4 por 10 minutos e lavadas em SSC 0,5x por 5 minutos.

A permeabilização dos tecidos foi feita por incubação das secções em 3,5 µg/ml proteinase k em 100 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, pH 8,0, a 37°C por 15 minutos. As lâminas foram fixadas novamente em paraformaldeído 4% por 10 minutos e lavadas em PBS por 6 minutos e em SSC 0,5x por 10 minutos.

As lâminas foram pré-hibridizadas em solução de hibridização (SSC 5x, solução Denhardt 5x, formamida 50% (Fisher) e 250 µg/ml tRNA (Roche)) à 42°C. Duas horas depois as secções foram secas com papel tecido RNA free e hibridizadas com as probes (anti sense – BamH1; sense - EcoR1), na concentração de 1:100 em solução de hibridização por 18 horas à 42°C. As probes foram desnaturadas antes da hibridização por 3 minutos à 65°C.

Após over night as lâminas são deixadas em banho Maria à 50°C em soluções de SSC (2X, 0,2X, 0,1X e 1X) 20 minutos cada. A detecção imunológica é feita com Dig-AP conjugate (1:1000, Roche) over night (4°C), após 2 horas em solução bloqueadora.

A reação de coloração foi feita com solução de NBT (4-nitroblue tetrazolium chloride, Roche), BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate, Roche) e buffer (100 mM Tris e 100mM NaCl, pH 9,5) até ser detectado a reação (aproximadamente 3 horas). Para parar a reação, lava-se as lâminas com água destilada.

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

Os resultados obtidos durante os experimentos estão explícitos abaixo, subdivididos por assunto.

5.1 MACROSCÓPIOS

Os animais submetidos ao tratamento com tioacetamida durante 14 semanas desenvolveram cirrose severa. A taxa de mortalidade durante a indução da cirrose foi de 4%, sendo observado queda de pelo (5 animais) e hipertrofia de baço (2 animais) em alguns ratos. O fígado dos ratos cirróticos apresentava aparência menos lobada (compacta) quando comparado com fígados normais. Os mesmos apresentavam nódulos regenerativos, sendo maior a presença, na face visceral do que na face diafragmática do fígado. Houve diferenças quanto a nodulação provocada pela cirrose, no entanto, a grande maioria dos animais apresentaram uma cirrose macronodular.

5.2 PESO DOS ANIMAIS

A média de peso dos animais destinados a indução de cirrose por tioacetamida (grupos FH e SF) no começo do experimento foi de $200,2 \pm 6,09\text{g}$, enquanto que a média dos animais destinados a controle foi de $209,4 \pm 5,2\text{g}$. Os animais destinados à indução de cirrose por tioacetamida sofreram queda no peso até a quarta semana, prazo na qual começaram a ganhar peso. O ganho de peso é observado até a sétima semana, período na qual a dose de tioacetamida foi acrescida em 20%. A partir daí, o peso dos ratos voltou a cair até uma nova retomada no ganho de peso a partir da nona semana.

Os animais do grupo controle obtiveram ganho de peso até o fim do experimento.

O peso final dos animais cirróticos foi de $208,4 \pm 10,4\text{g}$ e o dos animais controles de $239,7 \pm 3,2\text{g}$ (Figura 1).

Figura 1 – Acompanhamento do peso dos animais durante a indução da cirrose comparada com o peso dos animais controle

5.3 PESO DO FÍGADO, VOLUME DO FÍGADO E RELAÇÃO FÍGADO/CARCAÇA

Os animais tratados com FH apresentaram aumento do peso e do volume hepático, assim como, aumento na relação fígado/carcaça em comparação com os animais do grupo não tratado (SF) (Figura 2 e Tabela 1).

O peso do fígado dos animais tratados com FH foi 11,3% maior do que os não tratados e 33,8% maior que dos animais controles. Todos os grupos apresentaram peso de fígados diferente estatisticamente ($P < 0,05$).

O peso da carcaça dos animais do grupo FH foi estatisticamente igual ao dos animais do grupo SF ($P > 0,05$), entretanto o grupo controle teve peso de carcaça 11,1% maior do que os demais.

O volume do fígado dos animais do grupo FH foi 11,3% maior que o do SF e 34,3% maior que do grupo controle. Sendo os valores diferentes estatisticamente ($P < 0,05$).

A densidade do fígado foi igual para todos os grupos, com valor de 1,1 g/cm³. No que diz respeito à relação fígado/carcaça, a relação do grupo FH foi 11,8% maior do que a relação do grupo SF e 8,3% maior que a do grupo controle. Neste caso os valores do grupo controle e do grupo tratado com FH foram iguais ($P > 0,05$).

Tabela 1 - Comparação entre as médias de vários parâmetros de massa e volume, no grupo de animais tratados com solução fisiológica (Grupo SF) e tratados com fatores hepatotróficos (Grupo FH) – São Paulo - 2006

	Nº ANIMAIS	Parâmetros medidos				
		PC (g)	PFi (g)	VFi (cm ³)	DFi (g/cm ³)	PFi/PC
Grupo SF	20	169,3 _a (6,5)	8,9 _a (1,1)	8,2 _a (1,0)	1,08 _b (0,01)	5,3 _a (0,6)
Grupo FH	24	168,8 _a (9,9)	9,9 _b (1,1)	9,2 _b (1)	1,08 _a (0,01)	5,9 _{b,c} (0,6)
Grupo C	15	186 _b (8,7)	7,4 _c (0,9)	6,8 _c (0,8)	1,08 _a (0,02)	5,4 _{a,c} (0,6)
Diferença (%) (FH-SF)	-	0%	+11,3%	+11,3	NS	+11,8%
Diferença (%) (FH-C)	-	-9,8%	+33,8%	+34,3%	NS	NS

As médias da mesma coluna seguidas por letras diferentes são significantes estatisticamente, para o valor de $\alpha = 0,05$ com teste de Tukey. O desvio padrão está indicado entre parênteses.

PFi - peso do fígado, VFi - volume do fígado, DFi - densidade do fígado, PC - peso da carcaça, PFi/PC - peso do fígado em relação ao peso da carcaça, NS - diferença estatística não significativa.

Figura 2 - **2a** - Gráfico da relação entre peso do fígado e peso da carcaça dos animais dos grupos controle, HF e FS. Letras diferentes são significantes estatisticamente, para o valor de $\alpha = 0,05$ com teste de Tukey. **2b** - Gráfico comparando o volume do fígado dos ratos dos grupos controle, FH e SF. Letras diferentes são significantes estatisticamente, para o valor de $\alpha = 0,05$ com teste de Tukey. **2c** -

5.4 FUNÇÕES HEPÁTICAS

Os animais tratados com fatores hepatotróficos tiveram decréscimo nos índices bioquímicos de função hepática para alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase e gamaglutamiltranspeptidase. Os níveis de GGT em animais tratados foram 43,1% menor do que nos não tratados, sendo o grupo FH igual ao controle ($P>0,05$). Os níveis de ALT nos animais tratados foram 17,6% menor do que nos não tratados, sendo os valores do grupo FH iguais aos do grupo controle ($P>0,05$). Em relação a AST, os níveis dos tratados foram 12,2% menor do que nos não tratados. Para AST os animais tratados com FH também tiveram níveis estatisticamente iguais aos animais controle ($P>0,05$).

Os níveis de triglicerídeos foram estatisticamente iguais para os três grupos, porém os animais tratados apresentaram níveis 8,85% menores que os não tratados. A diminuição dos níveis após tratamento com FH não foi suficiente para uma diferença estatística devido ao grande desvio padrão do grupo SF ($\pm 39,2$).

O valor encontrado para FA foi mais de 100% maior nos animais dos grupos FH e SF do que no controle, sendo os mesmos iguais estatisticamente ($P>0,05$).

Para creatinina, os níveis são iguais em todos os grupos ($P>0,05$). Os níveis de bilirrubina total, bilirrubina e albumina foram iguais entre os grupos SF e FH ($P>0,05$). Entretanto foram maiores que no grupo controle para bilirrubina total e bilirrubina e menor para albumina.

Em contrapartida, os níveis séricos de proteína total foram diferentes para todos os grupos, sendo o menor nível nos animais tratados com FH ($P<0,05$). Os animais tratados tiveram níveis 5,5% menor do que os não tratados com FH.

Todos os dados estão representados na figura 3 e na tabela 2.

Figure 3a – Gráficos dos níveis sorológicos de indicadores de função hepática para GGT, alanina aminotransferase, fosfatase alcalina, aspartato aminotransferase e triglicerídeos. Letras diferentes são significantes estatisticamente, para o valor de $\alpha = 0,05$ com teste de Tukey.

Figure 3b – Gráficos dos níveis sorológicos de indicadores de função hepática para albumina, bilirrubina, proteína total, creatinina e bilirrubina total. Letras diferentes são significantes estatisticamente, para o valor de $\alpha = 0,05$ com teste de Tukey.

Tabela 2 - Valores (média e desvio-padrão) da concentração no soro sangüíneo de indicadores de função hepática em animais sadios não tratados (grupo Controle), animais cirróticos tratados com solução salina (grupo SF) e tratados com fatores hepatotróficos (grupo FH) São Paulo – 2006

	Grupo C (n=15)	Grupo SF (n=20)	Grupo FH (n=24)
Triglicerídeos (mg/dl)	72,5a (16,7)	81,01a (39,2)	74,2a (18,5)
Albumina (g/dl)	3,3a (0,2)	3,1b (0,1)	3,1b (0,1)
ALT (U/L)	44,7a (14,9)	62,5b (15,6)	51,5a (12,1)
Fosfatase Alcalina (U/L)	88,5a (35)	203,7b (47)	217,1b (53,05)
GGT (U/L)	0,17a (0,25)	6,7b (5,7)	2,9c (2,8)
AST (U/L)	111,3a (27,2)	142,5b,c (26,4)	132a,c (36,7)
Bilirrubina Total (mg/dl)	0,16a (0,03)	0,27b (0,12)	0,27b (0,14)
Bilirrubina (mg/dl)	0,02a (0,01)	0,17b (0,080)	0,16b (0,08)
Creatinina (mg/dl)	1,07a (0,12)	1,06a (0,09)	1,01a (0,05)

As médias da mesma coluna seguidas por letras diferentes são significantes estatisticamente, para o valor de $\alpha = 0,05$ com o teste de Tukey. O desvio padrão está indicado entre parênteses. ALT=alanina aminotransferase; GGT=gama-glutamil transferase; AST=aspartato aminotransferase.

5.5 MICROSCÓPICOS

5.5.1 Histologia Normal

Os animais do grupo controle apresentavam fígado com anatomia e morfologia característica. Os lóbulos continham veias centrolobulares centrais, na qual confluíam os sinusóides hepáticos e os cordões de hepatócitos. Nas triádes hepáticas ficava fácil a visualização os ductos biliares, artérias hepáticas e veias hepáticas (Figura 4).

Figura 4 – Fotomicrografia de fígado controle demonstrando histologia de um fígado normal. **A:** Veia centrolobular (**trevo**), na qual desembocam os sinusóides e para onde confluem os cordões de hepatócitos. **B:** Triádes hepática, composta pela veia porta (**estrela**), artéria hepática (**seta**) e ducto biliar (**ponta de seta**). Coloração hematoxilina-eosina. Barra: 100 μ m

5.6 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

Os resultados da avaliação histopatológica foram divididos em duas partes, referentes aos grupos SF e FH, para melhor entendimento e visualização.

5.6.1 Grupo SF

Nos fígados dos ratos induzidos com tioacetamida (SF), seja no momento da biópsia ou após o tratamento com solução fisiológica, observou-se perda da arquitetura parenquimal. Houve presença de cicatrizes fibrosas espessas que formam pontes entre os espaços porta. Essas pontes positivas para fibras reticulares (Figura 6a), mais conhecidas por septos fibrosos delineiam de pequenos a grandes nódulos regenerativos de hepatócitos, os quais não possuíam, em sua maioria veias centrolobulares. Vários animais apresentaram hiperplasia de ductos biliares, fato conhecido como proliferação dos ductos biliares. Essa proliferação dos ductos biliares pode ser encontrada em 62,5% das lâminas histológicas analisadas, pertencentes ao grupo SF e em 38,9% dos animais do grupo FH (Figuras 5c e 6b).

Quando coradas com PAS, os cortes oriundos de animais cirróticos (SF), apresentaram-se fortemente marcados a esta coloração, sendo essa positividade prolongada por todo o parênquima (Figura 8d). Diferentemente, fígados normais apresentaram menos positividade ao PAS, com maior intensidade na zona acinar III, ou seja, nas regiões periféricas às veias centrolobulares (Figura 8a e b).

Foi também observado hepatomegalocitose, e deposição de hemosiderina nos septos fibrosos (Figura 7b), principalmente nas regiões das tríades hepáticas. Outra característica dos fígados cirróticos foi a presença de hepatócitos com lesão nuclear (Figura 7a). Nos mesmos, o núcleo apresentava um vacúolo, sem positividade à HE. Embora o número dessas lesões nucleares não seja expressiva, demonstra degeneração de material nuclear.

Essas observações, juntamente com a ocorrência de vacuolização citoplasmática de hepatócitos, diagnosticam cirrose hepática severa.

5.6.2 Grupo FH

Nos fígados dos ratos tratados com fatores hepatotróficos (FH), os nódulos regenerativos eram maiores (Figura 5b), e estavam delineados por septos fibrosos menos espessos, apresentando menor proporção parenquimal de colágeno. A presença de nódulos regenerativos maiores, se deve, ao fato dos septos fibrosos sofrerem uma regressão após o tratamento com FH. Fica evidente a regressão e afinamento dos septos fibrosos, com desaparecimento de nódulos regenerativos menores e estabelecimento de maiores. Em muitos casos houve reaparecimento de veias centrolobulares e reestruturação da arquitetura parenquimal parcial. Porém, a arquitetura histológica ainda é diferente do convencional (Figura 5a).

Foi também observado hepatócitos com lesão nuclear, citoplasma vacuolizado e deposição de hemosiderina nos septos fibrosos em fígados de animais cirróticos tratados com FH, porém em menor número quando comparados ao grupo SF.

A positividade à PAS também estava aumentada e uniforme, não apresentando as características dos animais controles, porém a positividade foi menor quando comparada a dos animais do grupo SF (figura 8a e c).

Figura 5 - Fotomicrografia do parênquima hepático. **A:** Controle, parênquima hepático sadio. **B:** FH, estrutura parênquimal hepática alterada, com septos fibrosos delgados (**ponta de seta**), evidenciando a regressão dos mesmos. **C:** SF, estrutura parenquimal alterada, com presença de nódulos regenerativos (**estrela**) e septos fibrosos espessos (**seta**). Coloração picrossírius. Barra: 200µm

Figura 6 – **A:** Fígado cirrótico dos animais do grupo SF, coloração de fibras reticulinas. **B:** Fígado cirrótico dos animais do grupo SF, coloração de tricomio de Masson. **Seta** indica fibras reticulares e **ponta de seta**, proliferação de ductos biliares. Barras: A: 100 μ m e B: 200 μ m

Figura 7 – **A:** Fígado cirrótico com hepatócitos apresentando lesão nuclear. Coloração HE. **B:** Fígado cirrótico apresentando deposição de hemosiderina nos septos fibrosos. **Ponta de seta** indica hepatócitos com lesão nuclear e **seta** hemosiderina. Coloração PAS-H. Barra: 40 μ m

Figura 8 – Fotomicrografia de parênquima hepático, corado com PAS. **A e B:** controle, o fígado normal é pouco positivo à PAS, quando comparado com fígado cirrótico (**C e D**). Observa-se maior positividade nas áreas centrolobulares (**trevo**) do que nas tríades hepáticas (**estrela**). **C:** FH, o fígado tratado com FH apresenta positividade à PAS maior do que o fígado de animais controles, porém, menor do que fígados sem tratamento (**D**). **Seta** indica citoplasma com grande positividade para PAS. Barras: A: 200 μ m; B, C e D: 100 μ m

5.7 MENSURAÇÃO DO COLÁGENO

A média da porcentagem da área ocupada pelo colágeno no lóbulo hepático de 20 animais do grupo SF em um campo microscópico sob aumento de 40x foi de $11,8 \pm 2,4\%$, passando para $12,4\% \pm 3,5\%$ depois do tratamento com solução fisiológica (figura 9), o que representou um aumento de 8,7% da área do colágeno lobular dos animais tratado com solução fisiológica em relação à biopsia (Tabela 3). A diferença das médias antes e depois do tratamento não é significativa para $\alpha=0,05$.

Já a média da porcentagem da área ocupada pelo colágeno no lóbulo hepático de 24 animais do grupo FH em um campo microscópico sob aumento de 40x foi de $11,1\% \pm 2,2\%$, passando para $7,8\% \pm 1,9\%$ depois do tratamento com fatores hepatotróficos (figura 10, 11 e 12). Esses valores representam uma redução de 29,6% da área do colágeno lobular dos animais tratados com fatores hepatotróficos (Tabela 3). Fica evidenciado o efeito dos fatores hepatotróficos sob um fígado cirrótico no que se diz respeito a diminuição de colágeno, visto que todos os animais tiveram redução de colágeno (figura 10) A diferença das médias antes e depois do tratamento é significativa, com valor de $P=0,001$.

O cálculo da redução do colágeno no Grupo FH, que foi de 29,6%, foi feito a partir da equação $\left[1 - \left(\frac{\bar{X}_{\text{PMAFC}} F'}{\bar{X}_{\text{PMAFC}} F}\right)\right] * 100$, onde $\bar{X}_{\text{PMAFC}} F'$ é a média da porcentagem

média da área de colágeno

no fígado antes do tratamento, e $\bar{X}_{\text{PMAFC}} F$ é a média da porcentagem média da área de colágeno no fígado após o tratamento com fatores hepatotróficos. Entretanto, se usarmos a diferença de colágeno entre o grupo FH e o SF, após os tratamentos, a redução de colágeno pelo grupo FH é de 37,1%.

Figura 9 – Gráfico da média da quantificação de colágeno parenquimal (lóbulo hepático), por animal do grupo SF, antes e depois de tratados com solução fisiológica

Figura 10 – Gráfico da média da quantificação de colágeno parenquimal (lóbulo hepático), por animal do grupo FH, antes e depois de tratados com fatores hepatotróficos

Figura 11 – Gráfico de comparação das médias da porcentagem média da área de colágeno no fígado e desvio-padrão do Grupo FH (N=24) antes do tratamento ($11,13 \pm 2,21$) e depois do tratamento com fatores hepatotróficos ($7,83 \pm 1,93$), com diferença significativa ($p=0,001$) para o Teste t pareado

Tabela 3 – Comparação da média das áreas ocupadas pelo colágeno entre o espaço porta e a veia centrolobular (lóbulo hepático), em porcentagem, no grupo de animais tratados com solução fisiológica (Grupo SF) e tratados com fatores hepatotróficos exógenos (Grupo FH), antes e após o tratamento – São Paulo - 2006

Grupos	Biópsia (antes tratamento) (%)	Após tratamento (%)	Diferença (antes-depois) (%)	Test T pareado
SF N=20	11,4 (2,4)	12,4 (3,5)	+ 8,7%	P=0,149
FH N=24	11,1 (2,2)	7,8 (1,9)	- 29,62	P=0,001

Figura 12 – **A:** microfotografia de fígado de animal no momento da biópsia, antes do tratamento com fatores hepatotróficos. **B:** microfotografia de fígado do mesmo animal após o tratamento com fatores hepatotróficos, na qual fica evidente a redução da proporção de colágeno. Coloração picrosírius

5.8 QUANTIFICAÇÃO DO NÚMERO DE NÓDULOS REGENERATIVOS

A média do número de nódulos regenerativos por mm² em 10 animais do Grupo SF foi de $3,6 \pm 1,5$ antes do tratamento com solução fisiológica, passando para $5,5 \pm 1,9$ após o tratamento com solução fisiológica (figura 13 e 16a), o que representou um aumento de 51,9% (Tabela 4). Essa diferença é significativa, com $p=0,003$.

Já no grupo FH, a média do número de nódulos regenerativos por mm² antes do tratamento foi de $3,8 \pm 1,4$ passando para $2,3 \pm 1,2$ após o tratamento com fatores hepatotróficos (figura 14, 15, 16b), o que representou uma redução significativa de 22,1%, com $p=0,027$ (Tabela 4).

Figura 13 – Gráfico da relação de nódulos regenerativos por mm² (NR/mm²) por animal do grupo SF, antes e depois do tratamento com solução fisiológica

Figura 14 – Gráfico da relação de nódulos regenerativos por mm² (NR/mm²) por animal do grupo FH, antes e depois do tratamento com fatores hepatotróficos

Figura 15 – Gráfico de comparação das médias do número de nódulos regenerativos por mm² e desvio-padrão do Grupo FH (N=10) antes do tratamento ($3,84 \pm 1,39$) e depois do tratamento com fatores hepatotróficos ($2,99 \pm 1,19$), com redução significativa de 22,14% ($p=0,001$) para o Teste T pareado

Tabela 4 – Comparação da média do número de nódulos regenerativos por mm² no grupo de animais tratados com solução fisiológica (Grupo SF) e tratados com fatores hepatotróficos exógenos (Grupo FH), antes a após o tratamento – São Paulo - 2006

Grupos	Biópsia	Após tratamento	Diferença (Após T-biópsia) (%)	Test T pareado
SF N=10	3,6 (1,5)	5,5 (1,9)	+ 51,8%	P=0,003
FH N=10	3,8 (1,4)	2,9 (1,2)	- 22,14	P=0,027

Figura 16 – **A:** microfotografia de fígado de animal do Grupo SF mostrando grande quantidade de colágeno e nódulos regenerativos. **B:** microfotografia do fígado de animal após o tratamento com fatores hepatotróficos, na qual fica evidente a diminuição dos septos fibrosos e da quantidade de nódulos regenerativos. Coloração picrossírius

5.9 IMUNOISTOQUÍMICA PARA BRDU

Os animais tratados com fatores hepatotróficos apresentaram menor proporção de células positivas para BrdU, ou seja, menor taxa de proliferação hepatocitária (figura 18), entretanto não houve diferença estatística entre os grupos SF ($1,8 \pm 1,2$) e FH ($0,9 \pm 0,4\%$) ($p > 0,05$) (figura 18 e 19) (tabela 5).

Através dessa imunoistoquímica também foi possível observar grande atividade proliferativa de células não parenquimais nos septos fibrosos (figura 17a) e nas áreas de proliferação de ductos biliares (figura 17b).

Figura 17 – **A:** Septo fibroso de fígado cirrótico com células positivas para BrdU. **B:** Proliferação de ductos biliares em fígado cirrótico, apresentando células positivas para BrdU. **Seta** indica células em proliferação celular. **Ponta de seta** demonstra ducto biliar em formação. Imunoistoquímica para anti-BrdU e hematoxilina. Barra: 100 μ m

Figura 18 – **A**, **C** e **E** são fotomicrografias de intestino que serviram como controle positivo para a marcação de BrdU em fígados dos grupos controle, FH e SF (**B**, **D** e **F**). **A** e **B**: Grupo controle, nota-se a ausência de marcação por BrdU. **C** e **D**: Grupo FH, o grupo tratado com FH apresenta menos marcação que o grupo SF, o mesmo é representado pelas figuras **E** e **F**. **Seta** representa célula em proliferação celular. Barra: 100 μm

Figura 19 – Gráfico referente ao índice de proliferação celular de hepatócitos nos grupos controle, FH e SF. Os grupos FH e SF são estatisticamente iguais ($p > 0,05$)

Tabela 5 – Índice de proliferação hepatocitária nos grupos controle, FH e SF para BrdU – São Paulo – 2006

	controle	SF	FH
Index de proliferação hepatocitária	0,13a (0,11)	1,80b (1,18)	0,91b (0,45)

Os valores representam a média, com o desvio-padrão entre parênteses. Grupo controle, animais sadios; grupo SF, animais cirróticos tratados com solução salina; grupo FH, tratados com fatores hepatotróficos. As médias da mesma coluna seguidas por letras diferentes são significantes estatisticamente, para o valor de $\alpha = 0,05$ com o teste de Tukey.

5.10 PCR REAL TIME

5.10.1 Extração de RNA

A extração de RNA foi realizada através do protocolo de Trizol[®], e em seguida levado ao espectrofotômetro para então avaliar a concentração e a razão do RNA. A razão pode variar de 1,5 a 2,0 com qualidade boa para uma realização do RT-PCR, e também para o PCR em tempo real. As amostras apresentaram uma razão favorável para o experimento.

5.10.2 Resultado de titulação de PCR das amostras para Plau, Col α 1, MMP II, MMP XIII, TGF β e TIMP 1 normalizado com β -actina

As amostras foram diluídas na concentração de 5x (69,6, 13,92, 2,78, 0,5568 e 0,1114ng) para a titulação dos primers. Foi conseguido amplificação satisfatória para os primers TIMP I e Plau.

Os demais primers (colágeno α 1, TGF β 1, MMPII e MMP XIII), foram submetidos a titulação, normalizada com β -actina, com diluição da concentração das amostras de 3x (116, 38.67, 12.89, 4.3 e 1.43ng).

5.10.3 Resultados da padronização e verificação da eficiência dos primers desenhados

Formula da eficiência

$$E = 10(-1/-slope) - 1 \times 100$$

Diluição das amostras em 5x:

Observou-se um slope de -3,09 e eficiência de 110,57% para o primer TIMP1 e slope de -3,35 e eficiência de 98,86% para o Plau, comparando com o β -actina, que teve slope de -3,42 e eficiência de 95,81%.

Diluição das amostras em 3x:

O primer MMP 2 teve slope de -3,30 e eficiência de 100,81%, o colágeno α 1 teve slope de -3,27 e eficiência de 102,21 e o TGF β 1 teve slope de -3,22 e eficiência de 104,31%, quando comparados ao β -actina, que apresentou slope de -3,12 e eficiência de 109,01. O primer MMP 13, não obteve amplificação para nenhuma das diluições, sendo sua eficiência 0.

Diante dos resultados, estima-se que os primers foram desenhados nos éxons corretos para transcrição, com considerável qualidade de expressão e com mesma eficiência. Ao possuírem a mesma eficiência, o cálculo do $2^{-\Delta\Delta C_t}$, pôde ser utilizado.

5.10.4 Resultados da amplificação do PCR em tempo real para MMP 2, TGF β 1, Plau, colágeno α I, TIMP I nas amostras de fígado

O resultado da amplificação dos primers pelo método do PCR tempo real para as amostras dos grupos controle, FH e SF foram dadas em Ct (em duplicata). Foi realizado a média dos Cts para cada amostra, e em seguida feita a subtração dessa média com a do house keeping (β -actina) para a mesma amostra (dCt). O valor achado foi subtraído do dCt de um controle (amostra do grupo controle), sendo o resultado denominado ddCt. A expressão relativa é achada pela fórmula: 2^{-ddCt} .

Esse valor indica a expressão relativa das amostras dos fígados dos grupos FH e FS para um determinado primer, normalizadas com fígado controle. Para isso o grupo controle foi considerado 100% ou 1. Na figura 20 os resultados de expressão relativa dos animais dos grupos controle, FH e SF foram expostos.

Para o gene colágeno $\alpha 1$ obtivemos resultados que comprovam a diminuição do colágeno hepático após o tratamento com FH. Enquanto animais cirróticos apresentavam expressão relativa de $5,46 \pm 2,67$, os animais tratados com FH apresentaram $2,57 \pm 1,86$. A expressão gênica do grupo FH é igual estatisticamente a do grupo controle (Newman-Keuls, $p > 0,05$) (Figura 20 e Tabela 6).

A expressão gênica do TGF $\beta 1$, agente pró-fibrogênico, também apresentou grande decréscimo. A mesma em animais cirróticos do grupo SF é de $2,53 \pm 1,23$, enquanto que a do grupo FH é de $1,07 \pm 0,87$. Assim como para o colágeno, a expressão gênica do grupo controle foi igual para o grupo FH (Newman-Keuls, $p > 0,05$) (Figura 20 e Tabela 7).

A MMP 2 obteve expressão gênica diminuída no grupo tratado com fatores hepatotróficos. A expressão gênica do grupo SF foi de $7,09 \pm 2,22$, enquanto que a do grupo FH foi de $4,14 \pm 1,87$. A diferença na expressão relativa dos três grupos foi significativa (Newman-Keuls, $p > 0,05$) (Figura 20 e Tabela 8).

O TIMP I, que inibe ação das MMPs collagenases, também obteve decréscimo de sua expressão gênica. No grupo SF, sua expressão gênica foi de $2,65 \pm 1,32$, passando para $1,81 \pm 0,85$ no grupo tratado com FH. A expressão gênica do grupo FH é igual estatisticamente a do grupo controle (Newman-Keuls, $p > 0,05$) (Figura 20 e Tabela 9).

A expressão gênica de Plau nos grupos FH ($2,01 \pm 1,1$) e SF ($2,41 \pm 1,33$) foi iguais estatisticamente (Newman-Keuls, $p > 0,05$) e maiores que o controle. (Figura 20 e Tabela 10).

Figura 38 – Gráficos das expressões relativas dos genes envolvidos na modulação da matriz extracelular hepática: colágeno 1, TGFb1, TIMP I, MMP 2 e uPA. Letras diferentes são significantes estatisticamente, para o valor de $\alpha = 0,05$ com teste de Newman-Keuls.

Tabela 6 - Expressão relativa do RNAm do colágeno 1 normalizado a da β -actina em fígado de ratos. Os valores representam a média, com o desvio-padrão entre parênteses. Grupo controle, animais saudáveis; grupo SF, animais cirróticos tratados com solução salina; grupo FH, tratados com fatores hepatotróficos – São Paulo - 2006

Grupos	Expressão relativa
Grupo controle	1a
N=4	-
Grupo FH	2,57a
N=8	(1,86)
Grupo SF	5,46b
N=9	(2,67)

As médias da mesma coluna seguidas por letras diferentes são significantes estatisticamente, para o valor de $\alpha=0,05$ com o teste de Tukey.

Tabela 7 - Expressão relativa do RNAm do TGF β 1 normalizado a da β -actina em fígado de ratos. Os valores representam a média, com o desvio-padrão entre parênteses. Grupo controle, animais saudáveis; grupo SF, animais cirróticos tratados com solução salina; grupo FH, tratados com fatores hepatotróficos – São Paulo - 2006

Grupos	Expressão relativa
Grupo controle	1a
N=4	-
Grupo FH	1,07a
N=8	(0,87)
Grupo SF	2,53b
N=9	(1,23)

As médias da mesma coluna seguidas por letras diferentes são significantes estatisticamente, para o valor de $\alpha=0,05$ com o teste de Tukey.

Tabela 8 - Expressão relativa do RNAm da MMP 2 normalizado a da β -actina em fígado de ratos. Os valores representam a média, com o desvio-padrão entre parênteses. Grupo controle, animais saudáveis; grupo SF, animais cirróticos tratados com solução salina; grupo FH, tratados com fatores hepatotróficos – São Paulo - 2006

Grupos	Expressão relativa
Grupo controle	1a
N=4	-
Grupo FH	4,14b
N=8	(1,87)
Grupo SF	7,09c
N=9	(2,22)

As médias da mesma coluna seguidas por letras diferentes são significantes estatisticamente, para o valor de $\alpha=0,05$ com o teste de Tukey.

Tabela 9 - Expressão relativa do RNAm do TIMP I normalizado a da β -actina em fígado de ratos. Os valores representam a média, com o desvio-padrão entre parênteses. Grupo controle, animais saudáveis; grupo SF, animais cirróticos tratados com solução salina; grupo FH, tratados com fatores hepatotróficos – São Paulo - 2006

Grupos	Expressão relativa
Grupo controle	1a
N=4	-
Grupo FH	1,81a
N=8	(0,85)
Grupo SF	2,65b
N=9	(1,32)

As médias da mesma coluna seguidas por letras diferentes são significantes estatisticamente, para o valor de $\alpha=0,05$ com o teste de Tukey

Tabela 10 - Expressão relativa do RNAm do Plau normalizado a da β -actina em fígado de ratos. Os valores representam a média, com o desvio-padrão entre parênteses. Grupo controle, animais saudáveis; grupo SF, animais cirróticos tratados com solução salina; grupo FH, tratados com fatores hepatotróficos – São Paulo – 2006

Grupos	Expressão relativa
Grupo controle	1a
N=4	-
Grupo FH	2,01b
N=8	(1,1)
Grupo SF	2,41b
N=9	(1,33)

As médias da mesma coluna seguidas por letras diferentes são significantes estatisticamente, para o valor de $\alpha = 0,05$ com o teste de Tukey.

5.11 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Os fígados dos ratos controles apresentaram superfície plana e lisa (Figura 21a), enquanto os oriundos de ratos cirróticos (grupo SF) (Figura 22a, b) apresentam superfícies irregulares com macronódulos e micronódulos, predominando o primeiro.

Nos fígados crio-fraturados do grupo controle é possível observar as fenestrações dos vasos sinusóides hepáticos e veias centrolobulares com sinusóides confluindo para elas (Figura 21b, c). O parênquima tem aspecto esponjoso, enquanto que nos fígados cirróticos o parênquima tem aspecto mais compacto e a confluência dos sinusóides não fica evidente (Figura 22e, f).

Os materiais processados por corrosão, evidenciaram a estrutura das fibras colágenas em fígados normais e em cirróticos. Nos fígados normais, as fibras colágenas se apresentam como arcabouços de fibras finas sem a presença de formações nodulares (Figura 21 d, e, f). Nos fígados cirróticos as fibras se apresentaram espessas, formando nódulos regenerativos (Figura 22c, g, h, i). Essas fibras mais espessas provavelmente são colágeno do tipo I, principal tipo colágeno secretado e acumulado durante a fibrinogênese (Figura 22 j). Em certos nódulos fica difícil observar outro tipo de fibra, senão as espessas.

Em fígados cirróticos há presença de células linfocitárias, que podem ser observadas na superfície dos fígados submetidos a corrosão por NaOH (Figura 22d).

Figura 21 - Microscopia eletrônica de varredura de fígados normais. **A:** superfície de fígado normal. Barra: 300 µm. **B:** sinusóide observado sob criofatura. Barra: 30 µm. **C:** veia centrolobular, mostrando confluência dos sinusóides lobulares após criofatura. Barra: 50 µm. **D, E e F:** fígados submetidos a corrosão por NaOH, mostrando fibras colágenos e proteoglicanas. Barra respectivamente, 20 µm, 50 µm e 50 µm

Figura 22 - Microscopia eletrônica de varredura de fígados cirróticos. **A:** superfície de fígado cirrótico. Barra: 500 μm . **B e C:** superfície de fígados cirróticos submetidos a corrosão por NaOH. Barra A e B: 300 μm . **D:** fígado cirrótico submetido a corrosão por NaOH, mostrando linfócitos. Barra: 10 μm . **E:** veia centrolobular de fígado cirrótico mostrado após criofratura. Observa-se sinusóides menos evidentes, devido a colagenização dos mesmos. Barra: 50 μm . **F:** fígado cirrótico submetido a corrosão por NaOH, mostrando fibras colágenas mais espessas de forma ordenada. Barra: 30 μm . **G e H:** nódulos regenerativos de fígados cirróticos submetidos a corrosão por NaOH, apresentando arcabouço de fibras colágenas espessas. Barra G e H: 50 μm . **I:** organização colágena de fígado cirrótico submetido a corrosão por NaOH. Barra: 20 μm . **J:** fígado cirrótico submetido a corrosão por NaOH, com a presença de fibras colágenas espessas com formação estrelar. Barra: 10 μm

5.12 PROGRANULINA

As lâminas histológicas oriundas dos ratos dos grupos C, SF e FH foram submetidas à imunoistoquímica e hibridização *in situ* para a determinação de progranulina (proteína e RNA).

5.12.1 Imunoistoquímica

Os animais controles não apresentaram positividade a progranulina em células hepáticas (Figura 24a, c) e intestinais (Figura 26a). Entretanto, animais dos grupos SF e FH à apresentavam nas células hepáticas parenquimais e não

parenquimais (Figura 23a e 24b, d), principalmente nas zonas de proliferação de ductos biliares e nos septos fibrosos (Figura 23a).

O intestino dos animais dos grupos SF e FH, apresentaram-se positivos a progranulina nas células epiteliais (Figura 26b). Progranulina não foi encontrada no pâncreas em nenhum dos grupos (não mostra).

Figura 23 – Fotomicrografias de áreas de proliferação de ducto biliar em fígados cirróticos. A: Imunoistoquímica para progranulina. B: Hibridização *in situ* para progranulina. As áreas fortemente marcadas são os ductos biliares em formação, compostos por células epiteliais dos ductos biliares (**setas**). Barra: 100µm

Figura 24 – Fotomicrografias da localização da proteína da progranulina no fígado de ratas utilizando imunoistoquímica. A e C: animais controles. B e D: animais cirróticos. Nas figuras A e B não foi utilizado hematoxilina. Observar nos septos fibrosos (**setas**) pontos fortemente marcados (**ponta de seta**). Barra: 100µm

5.12.2 Hibridização In Situ

Os animais controles não apresentam RNAm para progranulina em nenhum tipo celular hepático ou intestinal (Figura 25 a, b e Figura 26 c). Entretanto, alguns animais controles apresentaram fraca marcação nas criptas intestinais.

Animais dos grupos SF e FH apresentaram expressão gênica para progranulina no fígado (Figura 25 c, d) e no intestino (Figura 26 d). No fígado, as

áreas de proliferação de ductos biliares e áreas ocupadas pelos septos fibrosos são as mais marcadas (Figura 23 b e Figura 25 c, d). O intestino desses animais é caracterizado pela expressão gênica de progranulina em macrófagos situados no tecido conjuntivo dos vilos intestinais (Figura 26d).

Não foi encontrada expressão de progranulina no pâncreas em nenhum dos grupos estudados (não mostra).

Figura 25 – Fotomicrografias da localização do RNAm da progranulina através de hibridização *in situ*. **A:** Animal controle, sense. **B:** Animal controle, anti-sense. **C:** Animal cirrótico, sense. **D:** Animal cirrótico, anti-sense. Seta demonstra área de septos fibrosos. Barra: 100µm

Figura 26 – Fotomicrografias the intestino. **A e C**: animais controles. **B e D**: animais cirróticos. Fotomicrografias **A e B**: imunoistoquímica para progranulina. **C e D**: hibridização *in situ* para progranulina. Observar células epiteliais intestinais marcadas para progranulina na imunoistoquímica (**setas**) e macrófagos situados no tecido conjuntivo dos vilos intestinais (**pontas de setas**) na hibridização *in situ*. Barra. 100µm

6 DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

O estado cirrótico do fígado é um processo autoperpetuante, sendo considerado irreversível. O transplante de fígado é a única terapia de tratamento definitivo em alguns casos de cirrose crônica (FRIEDMAN, 2004). Devido às dificuldades em se realizar transplantes, o meio científico busca outras soluções para essa enfermidade. Muitos possíveis tratamentos têm sido testados para tentar a cura, ou pelo menos em parte, do processo fibrótico e cirrótico. Os fatores hepatotróficos, baseados em solução hospitalar de nutrição parenteral, aplicados em fígados sob normais condições levou à aumento de 34,5% da massa hepática (PARRA et al., 1992). Essa solução, adicionada de hormônios levou a diminuição da força fibrosa do parênquima hepático e aumento da proliferação hepatocitária em hepatectomia parcial (PARRA et al., 1995b). Recentemente, a mesma solução foi testada em fígados fibróticos, com diminuição da fibrose, aumento hepático e melhora nas análises sorológicas (PEREIRA et al., 2003). Os efeitos do tratamento com fatores hepatotróficos em fígados cirróticos foram testados nesse trabalho. Os resultados foram satisfatórios quando comparados com os de outros tratamentos.

A discussão, assim como os outros tópicos desta tese, apresenta-se subdividida por assuntos, para melhor compreensão e visualização.

6.1 O MODELO DA TIOACETAMIDA PARA CIRROSE HEPÁTICA EM RATOS

Os modelos de indução à lesão hepática com TAA produzem alterações semelhante às que ocorrem nos quadros de cirrose humana, e portanto, é considerado um modelo válido, muito utilizado na indução experimental de doenças hepáticas (AKAHOSHI et al., 2002; CORBIN et al., 2003; DEKEL et al., 2003; ILMURO et al., 2003; OE et al., 2003). Essa semelhança, baseada na histologia e

hemodinâmica, é maior do que a apresentada em induções com tetracloreto de carbono (HATAKEYAMA et al., 2002). Ademais, a tioacetamida é eliminada pela urina nas primeiras 24 horas após a aplicação, possibilitando menor mortalidade quando comparada com tetracloreto de carbono ou dimetilnitrosamida, apesar de maior período de indução (AKAHOSHI et al., 2002). Em nosso modelo, após indução de cirrose com tioacetamida durante 14 semanas, conseguimos um grau de cirrose avançada, com lesões bem evidentes, além de grande deposição de colágeno no parênquima hepático conforme foi mostrado com a avaliação histopatológica. Foi observado mortalidade de 4% durante os procedimentos de indução da cirrose, o que poderia ser explicado pela grande deficiência das funções hepáticas em decorrência da cirrose. Porém, essa mortalidade é menor do que a relatada em outros trabalhos, na qual a indução da cirrose foi feita usando-se dimetilnitrosamina como modelo (PEREIRA, 2004), o que mostra que a tioacetamida é uma eficiente maneira de induzir cirrose para fins experimentais.

Os resultados da avaliação macroscópica, especialmente os do peso dos animais e do seu estado geral, revelaram um defeito no modelo de indução da cirrose por tioacetamida não descrito na literatura (AKAHOSHI et al., 2002, PAWA; ALI, 2004; SATO et al., 2000): os animais aparentemente se adaptam ao efeito do fármaco, uma vez que após um período de perda de peso acentuado inicial, com queda de pêlos e icterícia (ascite aparentemente não foi encontrada entre os animais do experimento), os animais começam a ganhar peso novamente. Assim, após um experimento piloto, no qual verificamos este comportamento, modificamos o modelo, aumentando a dose de tioacetamida em 20% após a 7ª. semana para conseguir um quadro cirrótico estável, o que foi conseguido ao final do período experimental. Nossas observações revelaram também que o modelo de indução de cirrose em ratos por tioacetamida ainda não está bem estabelecido e que as doses e os prazos preconizados na literatura devem ser confirmados por um teste prévio na linhagem de animais na qual será realizado o modelo experimental.

6.2 MEDIDAS DE MASSA E MACROSCOPIA

O índice hepatocorporal (proporção de peso do fígado em relação à carcaça) aumentou nos animais do grupo que recebeu os fatores hepatotróficos quando comparado com os animais que receberam apenas solução salina. O aumento da massa hepática, associado à diminuição da proporção de colágeno (e conseqüente aumento do parênquima) significa que houve um aumento de 11,8% do tecido funcional (hepatócito e sistema circulatório) em conseqüência do tratamento. No fígado cirrótico, o efeito da solução de FH foi ligeiramente inferior ao obtido por Pereira (2003) em ratos com fibrose hepática (aumento de 16% do índice hepatocorporal) e ao relatado por Parra et al. (1995b) em ratos saudáveis (aumento de 45%). Estes dados podem sugerir que há uma correlação entre o grau de lesão que acomete o fígado e sua capacidade de reagir a um estímulo hepatotrófico exógeno. A observação de que fígados cirróticos que sofreram hepatectomia parcial sofriam regeneração do tipo cirrótica (MIYAZAKI et al., 1999) vem apoiar esta hipótese.

6.3 ANÁLISES SOROLÓGICAS

Os resultados dos exames sorológicos indicam claramente a recuperação dos níveis de alguns indicadores de lesão hepática importantes, como a ALT, GGT e AST, níveis estes que permaneceram aumentados nos animais com cirrose não tratados.

As aminotransferases hepáticas catalisam a transferência da amina α de um aminoácido para um α cetoácido. Estas aminas quando liberadas reagem com o cetoglutarato formando o glutamato, que sofre desaminação oxidativa sendo transformado em íons amônio. As transaminases estão localizadas em locais específicos, sendo a AST e a GGT encontrada na fração solúvel da célula hepática e

a ALT na fração solúvel e nas mitocôndrias. Suas atividades estão relacionadas com a integridade dos hepatócitos, permitindo que estas células realizem com eficiência a função de detoxificação pela conjugação com os aminoácidos (BACILA, 1980). As aminotransferases são, portanto, indicadoras de lesão hepática e ajudam no reconhecimento de doenças hepatocelulares como as hepatites, a fibrose e a cirrose, quando seus níveis sanguíneos estão elevados (PRATT; KAPLAN, 1999). Outro indicador importante de lesão hepática é a fosfatase alcalina. Elevação do valor sanguíneo de fosfatase alcalina, como ocorrido neste experimento, indica lesão do sistema biliar, principalmente se associados ao aumento do valor da GGT (PRATT et al., 2000). A GGT, que é encontrada nos hepatócitos e células biliares epiteliais, é um indicador sensível da presença de doença hepatobiliar. Neste experimento, os altos níveis de fosfatase alcalina e GGT indicam que a tioacetamida pode ter lesionado o sistema hepatobiliar, uma conclusão apoiada pela histopatologia, a qual também mostrou proliferação de ductos biliares. O fato dos níveis de FA não baixarem após tratamento, assim como os de GGT, talvez indique uma lesão extra-hepática. Pois tanto GGT como FA são utilizados para indicarem obstrução no sistema biliar, quer seja no fígado ou nos canais maiores da bÍlis que se encontram fora deste órgão. Entretanto, FA pode encontrar-se também noutros órgãos, como osso, placenta e intestino. Por esta razão, a GGT é utilizada como uma prova suplementar para assegurar que o incremento na FA provém verdadeiramente do sistema biliar do fígado.

O retorno dos níveis sorológicos da ALT e da AST aos valores dos animais controles, assim como a redução em 43% do nível da GGT em relação ao valor dos controles SF, indica que a solução de fatores hepatotróficos estimulou a recuperação funcional do fígado, com benefícios para o sistema biliar. Esses resultados combinam com os do exame histopatológico dos animais do grupo FH, na qual foi observada acentuada diminuição das zonas de proliferação de ductos biliares. Esses resultados também nos levam a crer que o aumento hepático ocorrido é fruto de aumento de tecido funcional. É importante mencionar, que a diminuição dos níveis sorológicos de ALT e AST estão correlacionados com o decréscimo da necrose hepatocelular, conseqüentemente, melhora das funções hepáticas e diminuindo o ciclo de morte celular e regeneração fibrosa, característicos do processo cirrótico.

Apesar de nem todos os índices sorológicos terem melhorados, os resultados obtidos com a administração de fatores hepatotróficos em animais cirróticos são muito satisfatório, levando em conta outros experimentos. Outras alternativas de tratamento para cirrose e fibrose também obtiveram êxito na melhora de alguns indicadores hepáticos. Gliotoxina também levou uma melhora das funções hepáticas em fígados induzidos experimentalmente à fibrose (DEKEL et al., 2003). Fator de crescimento hepático (LGF) no tratamento de cirrose, proporcionou a diminuição do nível sorológico de AST e ALT. LGF também propiciou aumento no nível de proteína total e albumina (DIAZ-GIL et al., 1999). A administração de pirfenidone em fígados fibróticos, induzidos por CCl₄, melhorou os níveis sorológicos de ALT, AST e FA (GARCIA et al. 2002). O tratamento de cirrose com um vetor adeno viral conduzindo um cDNA modificado para uPA também melhorou as funções hepáticas (SALGADO et al., 2000). Dentre eles podemos destacar as vitaminas C e E, utilizadas no tratamento de fibrose, com expressiva redução de colágeno, proporcionando melhoras sorológicas nos níveis de AST, ALT, FA, GGT, bilirrubina total e conjugada (SOYLU et al., 2006). Apesar de se tratar de um quadro clínico menos severo, quando comparado ao proporcionado pela tioacetamida em nosso modelo de indução à cirrose.

6.4 QUANTIFICAÇÃO DO COLÁGENO

Analisando o resultado do teste estatístico de comparação das médias da Porcentagem Média da Área de Colágeno no Fígado (PMAFC) do grupo FH antes e depois do tratamento, cujo valor de $p=0,001$, podemos concluir que a redução encontrada de 29,6% das fibras colágenas em relação à biopsia foi significativa. Já no grupo SF (controle) ocorreu um indicativo de aumento de colágeno de 8,7% , na qual $p=0,149$, o que vem de encontro com o fato da cirrose ser crônica e

autoperpetuante. A Figura 11 mostra a redução do colágeno em um mesmo animal antes e depois do tratamento com fatores hepatotróficos.

A análise do número de nódulos regenerativos por área também mostrou que houve importante redução desse tipo de lesão em 22,1% nos animais tratados com fatores hepatotróficos ($p=0,027$). Já nos animais do Grupo SF, a cirrose evolui, já que observamos um grande aumento de 51,9% do número de nódulos regenerativos por mm^2 ($p=0,003$). Pode-se observar na Figura 13 a diferença do número de nódulos regenerativos entre animais que foram submetidos ou não ao tratamento com fatores hepatotróficos.

Em experimento usando recombinante humano de fator de crescimento de hepatócito (HGF) em ratos induzidos à cirrose por tioacetamida durante 10 semanas, a redução de colágeno foi de 34% em relação ao grupo cirrótico sem tratamento (SATO et al., 2000). Em nosso experimento a redução de colágeno entre o grupo FH para o SF após os tratamentos (grupo FH = fatores hepatotróficos; grupo SF = solução fisiológica) foi de 37,1%. Ademais, o experimento que se utilizou de HGF recombinante, induziu uma cirrose menos severa que a de nosso experimento, além de deixar os animais em descanso após o final da indução por 3 semanas antes do começo do tratamento, o que poderia levar a um abrandamento do quadro cirrótico.

Outro experimento envolvendo tratamento de fibrose induzida experimentalmente por tioacetamida (7 semanas). Usou-se infecção de adenovírus com MMP-1, na qual ocorreu diminuição de colágeno parenquimal total de 15 para 5%, além de diminuir a área hepática positiva para α -SMA, um marcador para HSCs ativas. Entretanto, o índice de ALT aumentou bastante, indicando lesão hepatocitária (ILMURO et al., 2003). Vitaminas C e E (SOYLU et al., 2006) e retinil palmitato (MIZOBUCHI et al., 1998) também mostraram-se eficazes na diminuição de quadro de fibrose. A administração de vitaminas C, E e C + E, reduziram o colágeno (proteína) em 32,3; 30,1 e 24,02%, respectivamente. (SOYLU et al., 2006). Losartan também diminuiu o desenvolvimento da fibrose, com redução da hipertensão portal,

inibição da ativação e decréscimo de HSCs ativas (RAMALHO et al., 2002). Gliotoxina, assim como losartan, também reduziu a fibrose hepática e diminuiu o número de células estreladas hepáticas por apoptose, entretanto, esse tratamento também levou à apoptose de hepatócitos (DEKEL et al., 2003). Cirrose induzida por CCl₄, tratada com fator de crescimento hepático (LGF) diminuiu fibrose, com redução de colágeno total, necrose e infiltração inflamatória, assim como, diminuição da pressão portal (DIAZ-GIL et al., 1999). Halofuginona (HALEVY et al., 1996) e vetor adeno viral conduzindo cDNA de uPA (SALGADO et al., 2000) também reduziram a fibrose hepática em modelos de cirrose.

Modelos de fibrose também tiveram regressão parcial com a administração de pirfenidona (DI SARIO et al., 2004), relaxina (WILLIAMS et al., 2001), conhecido hormônio reprodutivo, e Han-Dan-Gan-Lee, uma preparação herbal chinesa, composta por 5 ervas medicinais (LI et al., 2003).

Em modelos envolvendo cirrose, podemos destacar o experimento na qual se utilizou a pirfenidona. Nesse trabalho, a pirfenidona reduziu 40% da fibrose causada por um modelo cirrótico por CCl₄ (GARCIA et al., 2002).

O tratamento dos animais cirróticos com fatores hepatotróficos mostrou ser efetivo na interrupção da evolução da cirrose e, principalmente, na reversão do quadro, já que observamos redução da quantidade global de fibras colágenas depositadas no parênquima hepático e diminuição do número de nódulos regenerativos, que são lesões importantes no quadro da doença. Essas reduções podem contribuir para um aumento da funcionalidade do órgão, já que o aporte sanguíneo adequado fica favorecido com a menor quantidade de colágeno e com um menor número de nódulos regenerativos.

Em recente trabalho, induziu-se quadro de fibrose hepática em ratos que foram tratados com os mesmos fatores hepatotróficos e na mesma dose que neste trabalho, e obteve-se uma redução da média de colágeno de 43% (PEREIRA, 2003). A menor redução de colágeno talvez se deva ao maior grau de lesão hepática apresentado em nosso trabalho. Na cirrose, a deposição do colágeno é crônica e permanente, situação que não acontece em animais acometidos com fibrose.

Porém, como também encontramos uma redução significativa na quantidade de colágeno com apenas 10 dias de tratamento, temos um indicativo de que um maior tempo de tratamento com fatores hepatotróficos poderia diminuir ainda mais a deposição do colágeno no parênquima hepático, contribuindo de modo mais eficaz na reversão do quadro de cirrose, medida que merece ser analisada em futuros projetos.

Além da redução quantitativa do colágeno hepático, observamos também uma diferença qualitativa importante da distribuição dessas fibras. Nos animais do grupo SF foram encontradas grandes regiões de colágeno (Figura 5c) e com arquitetura hepática bastante alterada. Já nos animais tratados com FH ocorreu uma reestruturação parcial do parênquima hepático, sendo que grandes áreas de colágeno se apresentaram de forma mais rara e foi possível visualizar uma arquitetura lobular mais próxima da de animais saudáveis, com a identificação de vasos portais e veia centrolobular (Figura 4a), além de uma significativa redução do número de nódulos regenerativos (22,1%) devido a regressão dos septos de colágeno.

Com isso, foi demonstrado que ocorreu diminuição das lesões hepáticas após o tratamento com fatores hepatotróficos, com evidente melhoria da arquitetura hepática. Sendo assim, o fígado passa a ter um aporte sangüíneo mais adequado, o que pode representar uma melhoria no quadro clínico com reversão da doença.

6.5 PROLIFERAÇÃO CELULAR

Após contagem do percentual de hepatócitos positivos à BrdU, em relação aos não positivos, chegamos ao resultado de que o grupo FH e FS obtiveram o mesmo valor para índice de proliferação hepatocitária. Esse resultado não vem de encontro com nossas expectativas, pois esperávamos que os animais do grupo tratado com FH tivessem maior índice de proliferação celular. Entretanto, alguns fatos nos levam a concluir que houve acelerada proliferação hepatocitária durante o tratamento com FH. Pois é sabido que o pico de proliferação hepatocitária após uma injúria hepática é de aproximadamente 24 horas (ANDIRAN et al. 2000; MANGNALL et al., 2004; RABES et al., 1976) e os animais foram sacrificados dez dias após o começo dos tratamentos.

Podemos, então, afirmar também apoiados no aumento do peso hepático e da diminuição da proporção de colágeno, que o pico de proliferação hepatocitário do grupo FH aconteceu nos primeiros dias do tratamento. Essa proliferação, nos primeiros dias de tratamento levaria esses fígados a estarem em um estado proliferativo perto do basal no momento da eutanásia. Essa hipótese é apoiada com os resultados de um experimento utilizando HGF no tratamento de cirrose, na qual observou pico na proliferação hepatocitária 24 horas após o tratamento com o mesmo (imunoistoquímica para BrdU). Porém, após 36 e 48 horas os índices de proliferação celular entre o grupo tratado e o não tratado foram os mesmos (SATO et al., 2000).

Entretanto, em outro trabalho, a tentativa de tratamento de fibrose induzida por tioacetamida durante 7 semanas, com infecção de adenovírus com MMP-1, levou a um aumento na proliferação hepatocitária. Esses autores observaram que os animais com super expressão para MMP-1 apresentaram índice de proliferação de $5 \pm 2,6\%$, enquanto animais fibróticos e infectados apenas com o adenovírus obtiveram $0,2 \pm 0,1\%$ e $0,3 \pm 0,2\%$, respectivamente (ILMURO et al., 2003). Neste

caso, apesar do tratamento ter efeito na proliferação hepatocitária, o nível sérico ALT foi aumentado drasticamente, demonstrando lesão hepatocitária. O tratamento com α -Tocoferol em fígados cirróticos também propiciou aumento no índice proliferativo de hepatócitos, em imunoistoquímica para BrdU, entretanto, esse experimento utilizou a HP de 70% como estímulo proliferativo secundário (ANDIRAN et al., 2000). O hormônio T₃ também aumentou a proliferação hepatocitária em fígados submetidos a HP de 70% com pico proliferativo de 24 horas (MALIK et al., 2003). Mangnall et al. (2003), também observaram pico proliferativo dos hepatócitos 24 horas após HP de 70%, seguidos pela proliferação de células dos ductos biliares, células de Kupffer e HSCs. Mesmo a HP, que proporciona grande proliferação hepática, têm seus índices de proliferação reduzidos 10 dias após a realização da HP, sendo o segundo dia após a HP o pico proliferativo (SPIRA et al, 2002).

Outro argumento para explicar uma possível proliferação maior por parte dos animais do grupo FH, anterior a eutanásia dos animais, é que no grupo SF, boa parte das células positivas para BrdU estão próximas das tríades hepáticas, ou seja, na zona acinar I. A região acinar I é onde acontece primeiramente o estímulo proliferativo por ser a área mais oxigenada e nutrida do ácino (HARKNESS, 1952). Em contrapartida, no grupo que recebeu FH a atividade celular dos hepatócitos aconteceu de forma homogênea pelo parênquima hepático. Podemos então verter a suposição de que a proliferação hepatocitária no grupo SF está em seu primórdio e a do grupo FH já está em fase avançada.

Outra hipótese para o resultado obtido na avaliação da atividade hepatocitária é que devido ao tratamento com fatores hepatotróficos, o ciclo de morte celular e regeneração, característico da cirrose e que a torna auto perpetuante, tenha diminuído. Ou seja, menos células estão entrando em divisão mitótica porque menos células estão morrendo. Porém, não temos dados concretos que comprovem essa hipótese.

6.6 EXPRESSÃO GÊNICA DE GENES ENVOLVIDOS NA REMODELAÇÃO DA MATRIZ EXTRACELULAR

Os fatores hepatotróficos se mostraram eficientes na repressão da expressão de genes pró-fibrogênicos, como o colágeno $\alpha 1$, TGF β 1, TIMP I, MMP 2, genes esses, que atuam direta e indiretamente na deposição de ECM, na ativação de HSCs, na produção de ECM pelas HSCs e na inativação de enzimas pró-fibróticas (FRIEDMAN, 2000; LEE et al., 2003; ZHANG et al., 1999, 2005).

Em experimento utilizando fator de crescimento de hepatócito no tratamento de cirrose induzida experimentalmente por tioacetamida por 10 semanas, os genes colágeno $\alpha 1$ e TGF β 1 também tiveram suas expressões gênicas reduzidas em 46-56% e 57%, respectivamente. A expressão do TIMP I, um inibidor de metaloproteinase, não teve sua expressão alterada (SATO et al., 2000). Em nosso experimento, na qual a cirrose foi induzida por 14 semanas, o colágeno $\alpha 1$, o TGF β 1 e o TIMP I reduziram 53; 57,71 e 31,7%, respectivamente. Em adição, a expressão para esses três genes foi igual a do controle.

Outros experimentos também obtiveram relativo êxito na redução da cirrose e fibrose. Por exemplo, a utilização do Sho-saiko-to, medicamento herbal mais popular do Japão, teve um efeito inibidor de fibrose, atuando na inibição da ativação de HSCs, com redução da expressão gênica de TIMP I e aumento de MMP 13, entretanto a expressão de MMP 2, uma metaloproteinase envolvida na fibrogenese, aumenta (SAKAIDA et al., 2004). Zheng et al. (2005) obtiveram efeito parecido ao utilizar IL-10 (Interleucina 10) no tratamento de fibrose hepática (induzida por CCl₄), com declínio na produção de TIMP I e MMP 2 por parte das HSCs. Relaxina, um fator de crescimento semelhante a insulina, conhecido hormônio reprodutivo, reduziu expressão gênica de colágeno $\alpha 1$ e TIMP 1 em modelo de fibrose hepática (WILLIAMS et al., 2001). Pirfenidone, inibiu a resposta de fatores de crescimento como o TGF β 1 (GARCIA et al., 2002; DI SARIO et al., 2004), um indutor da síntese

de colágeno (MARGOLIN et al., 1997), de colágeno 1, 3 e 4, TIMP I e PAI (GARCIA et al., 2002) em modelo de fibrose hepática. Um vetor adeno viral conduzindo um cDNA modificado de uPA, degradador direto e indireto de colágeno, via veia ilíaca para tratamento de cirrose, aumentou expressão gênica de collagenases (SALGADO et al., 2000). Halofuginone, diminui a expressão gênica de colágeno $\alpha 1$ em fibroblastos da pele (HALEVY et al., 1996), pulmão fibrótico (NAGLER et al., 1996) e em fígados cirróticos (GNAINSKY et al., 2004).

Apesar do efeito anti-fibrótico do tratamento de fígados cirróticos com fatores hepatotróficos, não nos é permitido tirar conclusões sobre seu efeito pró-fibrolítico. Isso porque a expressão do Plau, gene envolvido na fibrólise direta e indiretamente, não foi diferente entre o grupo tratado e não tratado com FH. Embora, seja possível que durante o tratamento com FH (10 dias de tratamento), quando supostamente houve um pico de proliferação celular no grupo FH, nos primeiros dias, a expressão gênica do Plau tenha sido maior. Visto que a plasmina é importante no mecanismo de proliferação hepatocitária (AKAO et al., 2002).

Necrose e processo inflamatório causado por acúmulo de colágeno parenquimal, acarreta em maior liberação e ativação de TGF β 1, que ativa e induz divisão celular de HSCs. As HSCs são as maiores produtoras hepáticas de matriz extracelular, que acaba por induzir mais necrose hepatocitária. Seguindo esse raciocínio, possivelmente os fatores hepatotróficos atuam nas células estreladas hepáticas, no decréscimo da produção de genes pró-fibróticos (redução da expressão de MMP 2, TIMP I e colágeno $\alpha 1$). Isso levaria à diminuição do colágeno parenquimal, com melhoria da integridade hepatocitária (diminuição de ALT e AST), do aporte sanguíneo hepático e do sistema biliar (diminuição de FA e GGT), o que traduziria em menor taxa de mortalidade de hepatócitos e processo inflamatório. Desta forma, o ciclo de morte celular e regeneração fibrótica, característica da cirrose, diminuiria, com concomitante diminuição de TGF β 1. Possibilitando uma melhora funcional e morfológica do fígado, sustentável e auto-perpetuante.

Em experimentos futuros, o tratamento de fígados cirróticos com fatores hepatotróficos por um período maior que 10 dias, assim como a cinética de divisão hepatocitária ao longo do tratamento deve ser estudado.

6.7 PROGRANULINA EM RATOS CIRRÓTICOS

A proteína progranulina, assim com o RNA foi encontrado em células hepáticas e intestinais de ratos cirróticos, sendo a primeira descrição desse novo fator de crescimento em cirrose. Anteriormente, tinha sido apenas confirmado a expressão de progranulina nas linhas celulares LX-1 e LX-2 de HSCs ativas (XU et al., 2006).

Animais controles (sob normais condições), não apresentaram RNA de progranulina no fígado. Resultado que vai de encontro com o trabalho de Daniel et al. (2000), entretanto, outro autor cita baixa expressão de progranulina em fígados sob normais condições. Daniel et al. (2000) também cita expressão de progranulina em criptas intestinais, fato observado somente em alguns animais controles sob técnica da hibridização *in situ*.

Nas áreas hepáticas de proliferação de ductos biliares tanto a marcação para proteína quanto para RNA foram fortes. Essas áreas vem de encontro com a marcação para BrdU realizada, demonstrando o envolvimento desse fator de crescimento na proliferação de ductos biliares em fígados cirróticos. O envolvimento da mesma no crescimento celular já foi descrito anteriormente (LU e SERRANO, 2000; HE et al.; 2002, 2003; TUNGKEANGSIRISIN et al., 2004).

Outra área com forte marcação pela progranulina, tanto para proteína como para RNA, foram as áreas de septos fibrosos. Nessas áreas ocorre grande resposta inflamatória e tentativa de reparação tecidual, devido morte hepatocitária, com acúmulo de fibroblastos, HSCs e consequentemente acúmulo de matriz extracelular. A atuação da progranulina em resposta inflamatória já é descrita, pois ela foi

inicialmente encontrada em células mesenquimais, mais precisamente em células inflamatórias ativadas (BATEMAN; BENNETT, 1998; BATEMAN et al., 1990; HE et al., 2003). A comprovação de que a progranulina mediava a reparação tecidual, foi demonstrada quando camundongos com lesões na pele tratados com progranulina apresentaram maior acumulação de neutrófilos, macrófagos e fibroblastos e formação de vasos sanguíneos (HE et al., 2003). A marcação de progranulina (RNA) em macrófagos intestinais de ratos cirróticos, também demonstra a atuação da progranulina no processo inflamatório.

7 CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

A partir dos resultados apresentados neste trabalho, podemos concluir que houve remodelação da matriz extracelular hepática após tratamento com fatores hepatotróficos, com observação dos seguintes eventos:

1. Melhora morfológica dos fígados cirróticos após tratamento com fatores hepatotróficos;
2. Redução significativa na quantidade de colágeno depositado no parênquima hepático, assim como redução do número de nódulos regenerativos em animais que receberam tratamento com fatores hepatotróficos;
3. Melhora da condição funcional do fígado cirrótico após tratamento com fatores hepatotróficos;
4. Não houve aumento da proliferação hepatocitária ao fim dos 10 dias de tratamento com fatores hepatotróficos, porém os resultados indicaram que a mesma ocorreu durante os primeiros dias de tratamento;
5. Diminuição da expressão gênica de genes pró-fibrogênicos como colágeno $\alpha 1$, TGF $\beta 1$, TIMP 1 e MMP 2 após tratamento de fígados cirróticos com fatores hepatotróficos;
6. Os fatores hepatotróficos não causa aumento de expressão do gene pró-fibrótico Plau, entretanto sua expressão pode ter sido aumentada durante os primeiros dias de tratamento, concomitante com um possível aumento da proliferação hepatocitária. Por hora, é possível determinar que os fatores hepatotróficos possuem um potencial repressor de genes

envolvidos na fibrogênese, porém não necessariamente possui ação fibrolítica;

7. Proteína e RNA de progranulina estão presentes em fígados e intestino de ratos cirróticos e atua na proliferação dos ductos biliares. Desta forma, propomos o estudo da mesma como um marcador e alvo terapêutico para a cirrose e doenças hepáticas.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

AKAHOSHI, T.; HASHIZUME, M.; TANOUE, K.; SHIMABUKURO, T.; GOTOH, N.; TOMIKAWA, M.; SUGIMACHI, K. Role of the spleen in liver fibrosis in rats may be mediated by transforming growth factor β -1. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, Boston, v. 17, p. 59-65, 2002.

AKAO, M.; HASEBE, Y.; OKUMURA, N.; HAGIWARA, H.; SEKI, T.; ARIGA, T. Plasminogen activator-plasmin system potentiates the proliferation of hepatocytes in primary culture. **Thrombosis Research**, Elmsford, v. 107, n. 3-4, p. 169-174, 2002.

AKIYOSHI, H.; TERADA, T. Centrilobular and perisinusoidal fibrosis in experimental congestive liver in the rat. **Journal of Hepatology**, Amsterdam, v. 30, n. 3, p. 433-439, 1999.

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

AL-TOOK, S.; MURRAY, C.; TULANDI, T. Effects of pirfenidone and dermoid cyst fluid on adhesion formation. **Fertility and Sterility**, New York, v. 69, n. 2, p. 341-343, 1998.

ANDIRAN, F.; AYHAN, A.; TANYEL, C.; ABBASOGLU, O.; SAYEK, I. Regenerative Capacities of Normal and Cirrhotic Livers Following 70% Hepatectomy in Rats and the Effect of α -Tocopherol on Cirrhotic Regeneration, **Journal of Surgical Research**, New York, v. 89, p. 184-188, 2000.

ANDREASEN, P. A.; KJOLLER, L.; CHRISTENSEN, L.; DUFFY, M. The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: a review. **International Journal of Cancer**, New York, v. 72, n. 1, p. 1-22, 1997.

ANNONI, G.; WEINER, F. R.; ZERN, M. A. Increased transforming growth factor-beta 1 gene expression in human liver disease. **Journal of Hepatology**, Amsterdam, v. 14, n. 2-3, p. 259-264, 1992.

ARAÚJO LIMA, A. A. L.; SOUSA MELO, C. A.; BRASIL, I. R. C.; RAMALHO, L. N. Z.; BAGNATO, S. Z. V. S.; SILVA JÚNIOR, O. C. Efeitos do Laser sobre a cirrose hepática. **Acta Cirurgica Brasileira**, São Paulo, v. 15, p. 98, 2000.

ARIAS, G.; MATAS, R.; ASINS, G.; HEGARDT, F. G.; SERRA, D. The effect of fasting and insulin treatment on carnitine palmitoyl transferase I and mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase mRNA levels in liver from suckling rats. **Biochemical Society transactions**, London, v. 23, p. 493, 1995.

ARTHUR, M. J.; MANN, D. A.; IREDALE, J. P. Tissue inhibitors of metalloproteinases, hepatic stellate cells and liver fibrosis. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, Melbourne, v. 13, p. S33-S38, 1998.

ARTHUR, M. J. Metalloproteinases and their inhibitors in liver fibrosis. **American Journal of Physiology. Gastrointestinal and liver physiology**, Bethesda, v. 279, n. 2, p. 245-249, 2000.

BABA, T.; HOFF, H. B.; NEMOTO, H.; ORTH, J.; ARAI, Y.; GERTON, G. L. Acrogranin, an acrosomal cysteine-rich glycoprotein, is the precursor of the growth-modulating peptides, granulins and epithelins, and is expressed in somatic as well as male germ cells. **Molecular Reproduction and Development**, v. 34, p. 233-243, 1993.

BACILA, M. **Bioquímica Veterinária**. São Paulo: Varela, 1980. v. 1, p. 245.

BALLARDINI, G.; GROFF, P.; BADIALI DE GIORGI, L.; SCHUPPAN, D.; BIANCHI, F. B. Ito cell heterogeneity: desmin-negative Ito cells in normal rat liver. **Hepatology**, Baltimore, v. 19, n. 2, p. 440-446, 1994.

BANCROFT, J. D.; STEVENS, A. S. **Theory and practice of histological techniques**. 4. ed. Edinburgh: Churchill Livingstone. 1996. 235 p.

BHANDARI, V.; PALFREE, R. G. E.; BATEMAN, A. Isolation and sequence of the granulins precursor cDNA from human bone marrow reveals tandem cysteine-rich granulins domains. **Proceedings National Academy Sciences of USA**, Washington, v. 89, p. 1715-1719, 1992.

BATALLER, R.; BRENNER, D. A. Hepatic stellate cells as a target for the treatment of liver fibrosis. **Seminars in Liver Disease**, New York, v. 21, p. 327-451, 2001.

BATEMAN, A.; BELCOURT, D.; BENNETT, H.; LAZURE, C.; SOLOMON, S. Granulins, a novel class of peptide from leukocytes. **Biochemical Biophysical Research Communications**, San Diego, v. 173, p. 1161-1168, 1990.

BATEMAN, A.; BENNETT, H. Granulins: the structure and function of an emerging family of growth factors. **Journal of Endocrinology**, Tokyo, v. 158, p. 145-151, 1998.

BASBAUM, C. B.; WERB, Z. Focalized proteolysis: spatial and temporal regulation of extracellular matrix degradation at the cell surface. **Current Opinion in Cell Biology**, Philadelphia, v. 8, n. 5, p. 731-738, 1996.

BAUTISTA, A. P.; MESZAROS, K.; BOITA, J.; SPITZER, J. J. Superoxide anion generation in the liver during the early stage of endotoxemia in rats. **Journal of leukocyte biology**, New York, v. 48, p. 123-128, 1990.

BEDOSSA, P.; PELTIER, E.; TERRIS, B.; FRANCO, D.; POYNARD, T. Transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1) and TGF-beta 1 receptors in normal, cirrhotic, and neoplastic human livers. **Hepatology**, Baltimore, v. 21, n. 3, p. 760-766, 1995.

BEFELER, A. S.; DI BICEGLIE, A. M. Hepatocellular carcinoma: diagnosis and treatment. **Gastroenterology**, Baltimore, v. 122, p. 1609-1619, 2002.

BEHRENDT, N.; RONNE, E.; DANO, K. The structure and function of the urokinase receptor, a membrane protein governing plasminogen activation on the cell surface. **Biological Chemistry Hoppe-Seyler**, Berlin, v. 376, n. 5, p. 269-279, 1995.

BENGMARK, S.; EKMAN, B.; OLSSON, R.; REHNSTROM, B. Further studies on the effect of testosterone on liver healing after partial hepatectomy in male rats. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, Oslo, v. 1, n. 2, p. 106-110, 1966.

BENYON, R. C.; IREDALE, J. P.; GODDARD, S.; WINWOOD, P. J.; ARTHUR, M. J. Expression of tissue inhibitor of metalloproteinases 1 and 2 is increased in fibrotic human liver. **Gastroenterology**, Philadelphia, v. 110, n. 3, p. 821-831, 1996.

BERK, P. D.; POTTER, B. J.; STREMMEL, W. The sinusoidal surface on the hepatocyte: a dynamic plasma membrane specialized for high volume molecular transit. In: REUTTER, W.; POPPER, H.; ARIAS, I. M.; HEINRICH, P. C.; KEPPLER, D.; LANDMANN, L. (Ed.). **Modulation of liver cell expression**. Lancaster: MTP Press Ltda, 1987. p. 107-125.

BLANCKAERT, N.; SCHIMID, R. Physiology and pathophysiology of bilirubin metabolism. In: ZAKIM, D.; BOYER, T. D. (Ed.). **Hepatology: a textbook of liver disease**, Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1982. v. 1, p. 246-272.

BLASI F. Urokinase and urokinase receptor: a paracrine/autocrine system regulating cell migration and invasiveness. **Bioessays**, Cambridge, v. 15, p. 105-111, 1993.

BHANDARI, V.; GIAD, A.; BATEMAN, A. The cDNA structure, tissue distribution and cellular localization of the rat granulin precursor; a novel growth factor-like protein. **Endocrinology**, Springfield, v. 133, p. 2682-2689, 1993.

BIRKHAHN, R. H.; AWAD, S.; THOMFORD, N. R. Parenteral monoacetoacetin and liver regeneration interaction after partial hepatectomy in the rat. **Journal of Parenteral Nutrition**, 18, n. 3, p. 219-224, 1994.

BISMUTH, H. Surgical anatomy and anatomical surgery of the liver. In: BLUMGARD, L. H. (Ed.). **Surgery of the liver and biliary tract**. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1988. p. 1-9.

BODE, W.; FERNANDEZ-CATALAN, C.; GRAMS, F.; GOMIS-RUTH, F. X.; NAGASE, H.; TSCHESCHE, H.; MASKOS, K. Insights into MMP-TIMP interactions. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 878, p. 73-91, 1999.

BRAUN, L.; MEAD, J. E.; PANZICA, M.; MIKUMO, R.; BELL, G. I.; FAUSTO, N. Transforming growth factor beta mRNA increases during liver regeneration: a

possible paracrine mechanism of growth regulation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 85, n. 5, p. 1539-1543, 1988.

BUCHER, H. U.; BAUMGARTNER, R.; BUCHER, N.; SEILER, M.; FAUCHERE, J. C. Artificial sweetener reduces nociceptive reaction in term newborn infants. **Early Human Development**, Amsterdam, v. 59, n. 1, p. 51-60, 2000.

BUSO, N.; NICODEME, E.; CHESNE, C.; GUILLOUZO, A.; BELIN, D.; HYAFIL, F. Urokinase and type I plasminogen activator inhibitor production by normal human hepatocytes: modulation by inflammatory agents. **Hepatology**, Baltimore, v. 20, n. 1, p. 186-190, 1994.

CARLONI, V.; ROMANELLI, R. G.; PINZANI, M.; LAFFI, G.; GENTILINI, P. Expression and function of integrin receptors for collagen and laminin in cultured human hepatic stellate cells. **Gastroenterology**, Philadelphia, v. 110, n. 4, p. 1127-1136, 1996.

CARR, B. I.; HUANG, T. H.; ITAKURA, K.; NOEL, M.; MARCEAU, N. TGF beta gene transcription in normal and neoplastic liver growth. **Journal of Cellular Biochemistry**, New York, v. 39, n. 4, p. 477-487, 1989.

CASINI, A.; CUNNINGHAM, M.; ROJKIND, M.; LIEBER, C. S. Acetaldehyde increases procollagen type I and fibronectin gene transcription in cultured rat fat-storing cells through a protein synthesis-dependent mechanism. **Hepatology**, Baltimore, v. 13, n. 4, p. 758-765, 1991.

CASINI, A.; PINZANI, M.; MILANI, S.; GRAPPONE, C.; GALLI, G.; JEZEQUEL, A. M.; SCHUPPAN, D.; ROTELLA, C. M.; SURRENTI, C. Regulation of extracellular matrix synthesis by transforming growth factor beta 1 in human fat-storing cells. **Gastroenterology**, Philadelphia, v. 105, n. 1, p. 245-253, 1993.

CAWSTON, T. E.; CURRY, V.; RAMSEY, S.; CLARK, I. M.; KYLE, V. A.; ADEBAJO, A.; SILVERMAN, B.; DAYMOND, T.; HAZLEMAN, B. L. The levels of collagenase, tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1), collagenase approximately TIMP-1 complexes and glycosaminoglycan (GAG) in sequential samples of synovial fluid aspirated from patients with osteoarthritis. **Clinical Experimental Rheumatological**, Pisa, v.13, p. 431-437, 1995.

CHEVILLE, N. F. Inflammation and Healing - Healing and Chronic Inflammation. In: _____. **Introduction to veterinary pathology**. 2. ed. Ames: Iowa State University Press, 1999. Pt. 2, p. 136-138.

CHEUNG, S. T.; WONG, S. Y.; LEUNG, K. L.; CHEN, X.; SO, S.; FAN, S. T. Granulin-epithelin precursor overexpression promotes growth and invasion of hepatocellular carcinoma. **Clinical Cancer Research**, Denville, v. 10, n. 22, p. 7629-3, 2004.

CLAUSS, M.; GERLACH, M.; GERLACH, H.; BRETT, J.; WANG, F.; FAMILLETI, P. C.; PAN, Y. C.; OLANDER, J. V.; CONNOLLY, D. T.; STERN, D. Vascular permeability factor: a tumor-derived polypeptide that induces endothelial cell and monocyte procoagulant activity, and promotes monocyte migration. **Journal of Experimental Medicine**, Tokyo, v. 172, p. 1535-1545, 1990.

CHU, C-J.; CHANG, C-C.; WANG, T-F.; LEE, F-Y.; CHANG, F-Y.; CHEN, Y-C.; CHAN, C-C.; HUANG, H-C.; WANG, S-S.; LEE, S-D. Detrimental effects of nitric oxide inhibition on hepatic encephalopathy in rats with thioacetamide-induced fulminant hepatic failure: Role of nitric oxide synthase isoforms. **Hepatology**, Baltimore, v. 21, p. 1194-1199, 2006.

CLAUSS, M.; GERLACH, M.; BRETT, J.; WANG, F.; FAMILLETTI, P. C.; PAN, Y. C.; OLANDER, J. V.; CONNOLLY, D. T.; STERN, D. Vascular permeability factor: a tumor-derived polypeptide that induces endothelial cell and monocyte procoagulant activity, and promotes monocyte migration. **Journal of Experimental Medicine**, New York, n. 172, n. 6, p. 1535-1545, 1990.

COGLIATI, B.; PEREIRA, H. M.; PARRA, O. M.; SILVA, J. R. M. C.; HERNANDEZ-BLAZQUEZ, F. J. Morphometry of collagen and reticular fibers on the extracellular matrix after the injection of hepatotrophic factors in hepatectomized rats. In: REUNIÃO ANUAL DA FEDERAÇÃO DE SOCIEDADES DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL - FESBE, 19.; CONGRESSO BRASILEIRO DE BIOFÍSICA, 29.; CONGRESSO BRASILEIRO DE FISILOGIA, 39.; CONGRESSO BRASILEIRO DE INVESTIGAÇÃO CLÍNICA, 20.; CONGRESSO BRASILEIRO DE NEUROCIÊNCIAS E COMPORTAMENTO, 28., 2004, Águas de Lindóia, São Paulo. **Programas e Resumos...** São Paulo: FESBE, 2004. 1 CD-ROM. Disponível em: <<http://www.fesbe.org>, n. 09.014>. Acesso em: 21 ago. 2006.

COLTRERA, M. D.; GOWN, A. M. PCNA/cyclin expression and BrdU uptake define different subpopulations in different cell lines. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry : official journal of the histochemistry society**, Baltimore, v. 39, n. 1, p. 23-30, 1991.

COLUMBANO, A.; LEDDA-COLUMBANO, G. M.; CONI, P. P.; FAA, G.; LIGUORI, C.; SANTA CRUZ, G.; PANI, P. Occurrence of cell death (apoptosis) during the involution of liver hyperplasia. **Laboratory Investigation**, New York, v. 52, n. 6, p. 670-675, 1985.

COLUMBANO, A.; SHINOZUKA, H. Liver regeneration versus direct hyperplasia. **The FASEB Journal**, Bethesda, v. 10, n. 10, p. 1118-1128, 1996.

CONN, H. O.; ATTERBURY, C. E.; Cirrhosis. In: SCHIFF, L.; SCHIFF, E. (Ed.). **Diseases of the liver**. Philadelphia: JB Lippincott, 1987. v. 20, p. 825-864.

CORPECHOT, C.; BARBU, V.; WENDUM, D.; CHIGNARD, N.; HOUSSET, C.; POUPON, R. ROSMORDUC, O. Hepatocyte growth factor and c-met inhibition by hepatic cell hipoxia. A potential mechanism for liver regeneration failure in experimental cirrhosis. **American Journal of Pathology**, Philadelphia, v. 160, p. 613-620, 2002.

CORBIN, I. R.; MINUK, G. Y. Serial Percutaneous Liver Biopsies in Laboratory Rats, **Digestive Diseases and Sciences**, New York, v. 48, n. 10, p. 1939-1943, 2003.

CURRIER, A. R.; SABLA, G.; LOCAPUTO, S.; MELIN-ALDANA, H.; DEGEN, J. L.; BEZERRA, J. A. Plasminogen directs the pleiotropic effects of uPA in liver injury and repair. **American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology**, Bethesda, v. 284, n. 3, p. 508-515, 2003.

CZAJA, M. J.; FLANDERS, K. C.; BIEMPICA, L.; KLEIN, C.; ZERN, M. A.; WEINER, F. R. Expression of tumor necrosis factor-alpha and transforming growth factor-beta 1 in acute liver injury. **Growth Factors**, London, v. 1, n. 3, p. 219-226, 1989.

DANIEL, R.; HE, Z.; CARMICHAEL, K. P.; HALPER, J.; BATEMAN, A. Cellular localization of gene expression for progranulin. **Journal Histochemistry and Cytochemistry**, Baltimore, v. 48, n. 7, p. 999-1009, 2000.

DANIEL, R.; DANIELS, E.; HE, Z.; BATEMAN, A. Progranulin (acrogranin/PC cell-derived growth factor/granulin-epithelin precursor) is expressed in the placenta, epidermis, microvasculature, and brain during murine development. **Developmental Dynamics**, New York, v. 227, p. 593–599, 2003.

DANO, K.; ANDREASEN, P. A.; GRONDAHL-HANSEN, J.; KRISTENSEN, P.; NIELSEN, L. S.; SKRIVER, L. Plasminogen activators, tissue degradation, and cancer. **Advances in Cancer Research**, New York, v. 44, p. 139-266, 1985.

DELHAYE, M.; LOUIS, H.; DEGRAEF, C.; LE MOINE, O.; DEVIERE, J.; GULBIS, B.; JACOBOWITZ, D.; ADLER, M.; GALAND, P. Relationship between hepatocyte proliferative activity and liver functional reserve in human cirrhosis. **Hepatology**, Baltimore, v. 23, n. 5, p.1003-1011, 1996.

DELHAYE, M.; LOUIS, H.; DEGRAEF, C.; LE MOINE, O.; DEVIERE, J.; GULBIS, B.; JACOBOWITZ, D.; ADLER, M.; GALAND, P. Hepatocyte proliferative activity in human liver cirrhosis. **Journal of Hepatology**, Amsterdam, v. 30, n. 3, p. 461-471, 1999.

DESMET, V. J. Morphology and development of the hepatobiliary system. In: BOCK, K. W.; MATERN, S.; GEROK, W.; SCHIMID, R. (Ed.). **Hepatic metabolism and disposition of ando- and xenobiotics**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1991. p. 3-17.

DEKEL, R.; ZVIBEL, I.; BRILL, S.; BRAZOVCKI, E.; HALPERN, Z.; OREN, R. Gliotoxin Ameliorates Development of Fibrosis and Cirrhosis in a Thioacetamide Rat Model, **Digestive Diseases and Sciences**, New York, v. 48, n. 8, p. 1642-1647, 2003.

DIAZ-CUETO, L.; STEIN, P.; JACOBS, A.; SCHULTZ, R. M.; Gerton, G. L. Modulation of mouse preimplantation embryo development by acrogranin (epithelin/granulin precursor). **Developmental Biology**, New York, v. 217, p. 406-418, 2000.

DI SARIO, A.; BENDIA, E.; MACARRI, G.; CANDELARESI, C.; TAFFETANI, S.; MARZIONI, M.; OMENETTI, A.; DE MINICIS, S.; TROZZI, L.; BENEDETTI, A. The anti-fibrotic effect of pirfenidone in rat liver fibrosis is mediated by downregulation of

procollagen alpha1(I), TIMP-1 and MMP-2. **Digestive and Liver Disease**, Roma, v. 36, n. 11, p. 744-751, 2004.

DIAZ-GIL, J. J.; MUNOZ, J.; ALBILLOS, A.; RÚA, C.; MACHIN, C.; GARCIA-CAÑERO, R.; CARECEDA, R. M.; GUIJARRO, M. C.; TRILLA, C.; ESCARTIN, P. Improvement in liver fibrosis, functionality and hemodynamics in CCl₄-cirrhotic rats after injection of the Liver Growth Factor, **Journal of Hepatology**, Amsterdam, v. 30, p. 1065-1072, 1999.

DONALD, C. D.; LADDU, A.; CHANDHAM, P.; LIM, S. D.; COHEN, C.; AMIN, M.; GERTON, G. L.; MARSHALL, F. F.; PETROS, J. A. Expression of progranulin and the epithelin/granulin precursor acrogranin correlates with neoplastic state in renal epithelium. **Anticancer Research**, Athens, v. 21, p. 3739-3742, 2001.

DOYLE, M.; WILSON, R. B.; HARTROFT, W. S. The effect of starvation on liver regeneration in rats after partial hepatectomy. **Experimental and molecular pathology**, New York, v. 9, p. 400-404, 1968.

ELIAS, H.; SHERRICK, J. C. **Morphology of the liver**. New York: Academic Press, 1969. 3-7 p.

ELLIS, V.; PYKE, C.; ERIKSEN, J.; SOLBERG, H.; DANO, K. The urokinase receptor: involvement in cell surface proteolysis and cancer invasion. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 667, p. 13-31, 1992.

EPSTEIN, M. [Hepatorenal syndrome]. **Revista Clínica Española**, Madrid, v. 183, n. 1, p.37-41, 1988.

FANG, J. W.; BIRD, G. L.; NAKAMURA, T.; DAVIS, G. L.; LAU, J. Y. Hepatocyte proliferation as an indicator of outcome in acute alcoholic hepatitis. **Lancet**, London, v. 343, n. 8901, p. 820-823, 1994.

FAUSTO, N.; LAIRD, A. D.; WEBBER, E. M. Liver regeneration. 2. Role of growth factors and cytokines in hepatic regeneration. **The FASEB Journal**, Bethesda, v. 9, n. 15, p. 1527-1536, 1995.

FAUSTO, N.; MEAD, J. E. Mead. Regulation of liver growth: protooncogenes and transforming growth factors. **Laboratory Investigation**, New York, v. 60, n. 1, p. 4-13, 1989.

FRANCAVILLA, A.; PANELLA, C.; POLIMENO, L.; GIANGASPERO, A.; MAZZAFERRO, V.; PAN, C. E.; VAN THIEL, D. H.; STARZL, T. E. Hormonal and enzymatic parameters of hepatic regeneration in patients undergoing major liver resections. **Hepatology**, Baltimore, v. 12, n. 5, p. 1134-1138, 1990.

FREIJE, J. M.; DIEZ-ITZA, I.; BALBIN, M.; SANCHEZ, L. M.; BLASCO, R.; TOLIVIA, J.; LOPEZ-OTIN, C. Molecular cloning and expression of collagenase-3, a novel human matrix metalloproteinase produced by breast carcinomas. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 269, n. 24, p. 16766-16773, 1994.

FELDMANN, G. The cytoskeleton of the hepatocytes. Structure and functions. **Journal of Hepatology**, Amsterdam, v. 8, p. 313-323, 1989.

FRIEDMAN, S. L. Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. The cellular basis of hepatic fibrosis. Mechanisms and treatment strategies. **New England Journal of Medicine**. London, v. 328, n. 25, p. 1828-1835, 1993.

FRIEDMAN, S. L. Molecular mechanisms of hepatic fibrosis and principles of therapy. **Journal of Gastroenterology**, Cluj-Napoca, v. 32, n. 3, p. 424-430, 1997.

FRIEDMAN, S. L. Cytokines and fibrogenesis. **Seminars in Liver Disease**, New York, v. 19, n. 2, p. 129-140, 1999.

FRIEDMAN, S. L. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 275, n. 4, p. 2247-2250, 2000.

FRIEDMAN, S. L. Liver fibrosis from bench to bedside. **Journal of Hepatology**, Amsterdam, v. 38, n. 1, p. 38-53, 2003.

FRIEDMAN, S. L. Mechanisms of disease: Mechanisms of hepatic fibrosis and therapeutic implications. **Nat Clinical Pract Gastroenterology Hepatology**, London, v. 1, p. 98-105, 2004.

GARCIA, L.; HERNANDEZ, I.; SANDOVAL, A.; SALAZAR, A.; GARCIA, J.; VERA, J.; GRIJALVA, G.; MURIEL, P.; MARGOLIN, S.; ARMENDARIZ-BORUNDA, J. Pirfenidone effectively reverses experimental liver fibrosis. **Journal of Hepatology**, Amsterdam, v. 37, n. 6, p. 797-805, 2002.

GARD, A. L.; WHITE, F. P.; DUTTON, G. R. Extra-neural glial fibrillary acidic protein (GFAP) immunoreactivity in perisinusoidal stellate cells of rat liver. **Journal of Neuroimmunology**, Amsterdam, v. 8, n. 4-6, p. 359-375, 1985.

GEORGE, J.; ROULOT, D.; KOTELIANSKY, V. E.; BISSELL, D. M. In vivo inhibition of rat stellate cell activation by soluble transforming growth factor beta type II receptor: a potential new therapy for hepatic fibrosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 96, n. 22, p. 12719-12724, 1999.

GERACI, J. R.; MEDWAY, W. Simulated field blood studies in the bottle-nosed dolphin *Tursiops truncatus*. 2. Effects of stress on some hematologic and plasma chemical parameters. **Journal of Wildlife Diseases**, Ames, v. 9, n. 1, p. 29-33, 1973.

GNAINSKY, Y.; SPIRA, G.; PAIZI, M.; BRUCK, R.; NAGLER, A.; ABU-AMARA, S. N.; GEIGER, B.; GENINA, O.; MONSONEGO-ORNAN, E.; PINES, M. Halofuginone, an inhibitor of collagen synthesis by rat stellate cells, stimulates insulin-like growth factor binding protein-1 synthesis by hepatocytes. **Journal of Hepatology**, Amsterdam, v. 40, n. 2, p. 269-277, 2004.

GRATZNER, H. G. Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: A new reagent for detection of DNA replication. **Science**, Washington, v. 218, n. 4571, p. 474-475, 1982.

GRISHAM, J. W. Cell types in long-term propagable cultures of rat liver. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 349, p. 128-137, 1980.

GRISHAM, J. W. Cell types in rat liver cultures: their identification and isolation. **Molecular and Cellular Biochemistry**, The Hague, v. 53-54, n. 1-2, p. 23-33, 1983.

GROSZMANN, R. J.; ATTERBURY, C. E. The pathophysiology of portal hypertension: a basis for classification. **Seminars in Liver Disease**, New York, v. 2, n. 3, p. 177-186, 1982.

GULLBERG, D.; GEHLSSEN, K. R.; TURNER, D. C.; AHLEN, K.; ZIJENAH, L. S.; BARNES, M. J.; RUBIN, K. Analysis of alpha 1 beta 1, alpha 2 beta 1 and alpha 3 beta 1 integrins in cell--collagen interactions: identification of conformation dependent alpha 1 beta 1 binding sites in collagen type I. **The EMBO Journal**, Eynsham, v. 11, n. 11, p. 3865-3873, 1992.

HAMADA, T.; KATO, Y.; TERASAKI, T.; SUGIYAMA, Y. Cell density-dependent mitogenic effect and -independent cellular handling of epidermal growth factor in primary cultured rat hepatocytes. **Journal of Hepatology**, Amsterdam, v. 26, n. 2, p. 353-360, 1997.

HARKNESS, R. D. The spatial distribution of dividing cells in the liver of the rat after partial hepatectomy. **The Journal of Physiology**, London, v. 116, n. 4, p. 373-379, 1952.

HARUYAMA, T.; AJIOKA, I.; AKAIKE, T.; WATANABE, Y. Regulation and significance of hepatocyte-derived matrix metalloproteinases in liver remodeling. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, San Diego, v. 272, n. 3, p. 681-686, 2000.

HATAKEYAMA, Y.; ONO, T.; SATO, N.; SAKUMA, H.; KOYAMA, Y.; INOUE, N.; TAKENOSHITA, S.; OMATA, S. Usefulness of the tactile sensor for estimating the degree of liver fibrosis and the DNA synthesis activity of remnant liver cells after partial hepatectomy. **Fukushima Journal of Medical Science**, Fukushima, v. 48, n. 2, p. 93-101, 2002.

HAVELY, O.; NAGLER, A.; LEVI-SCHAFFER, F. GENINA, O.; PINES, M. Inhibition of collagen type I synthesis by skin fibroblasts of graft versus host disease and scleroderma patients: effect of halofuginone, **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v. 52, n. 7, p. 1057-1063, 1996.

HE, Z.; BATEMAN, A. Progranulin gene expression regulates epithelial cell growth and promotes tumor growth in vivo. **Cancer Research**, New York, v. 59, n. 13, p. 3222-3229, 1999.

HE, Z.; ISMAIL, A.; KRIAZHEV, L.; SADVAKASSOVA, G.; BATEMAN, A. Progranulin (PC-cell-derived growth factor/acrogranin) regulates invasion and cell survival. **Cancer Research**, Chicago, v. 62, p. 5590–5596, 2002.

HE, Z.; ONG, C. H.; HALPER, J.; BATEMAN, A. Progranulin is a mediator of the wound response. **Nature Medicine**, New York, v. 9, p. 225-229, 2003.

HERBST, H.; WEGE, T.; MILANI, S.; PELLEGRINI, G.; ORZECOWSKI, H. D.; BECHSTEIN, W. O.; NEUHAUS, P.; GRESSNER, A. M.; SCHUPPAN, D. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and -2 RNA expression in rat and human liver fibrosis. **The American Journal of Pathology**, Philadelphia, v. 150, n. 5, p. 1647-1659, 1997.

HIGHBERGER, J. H.; CORBETT, C.; GROSS, J. Isolation and characterization of a peptide containing the site of cleavage of the chick skin collagen alpha 1(I) chain by animal collagenases. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, San Diego, v. 89, n. 1, p. 202-208, 1979.

HOLECEK, M. Nutritional modulation of liver regeneration by carbohydrates, lipids, and amino acids: a review. **Nutrition**, Los Angeles, v. 15, n. 10, p. 784-788, 1999.

HOUGLUM, K.; BRENNER, D. A.; CHOJKIER, M. d-alpha-tocopherol inhibits collagen alpha 1(I) gene expression in cultured human fibroblasts. Modulation of constitutive collagen gene expression by lipid peroxidation. **The Journal of Clinical Investigation**, New Haven, v. 87, n. 6, p. 2230-2235, 1991.

HOUGLUM, K. P.; BRENNER, D. A.; CHOJKIER, M. Ascorbic acid stimulation of collagen biosynthesis independent of hydroxylation. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 54, n. 6, p. 1141S-1143S, 1991.

HOUSSAINT, E. Differentiation of the mouse hepatic primordium. I. An analysis of tissue interactions in hepatocyte differentiation. **Cell Differentiation**, Amsterdam, v. 9, n. 5, p. 269-279, 1980.

IIMURO, Y.; NISHIO, T.; MORIMOTO, T.; NITTA, T.; STEFANOVIC, B.; CHOI, S. K.; BRENNER, D. A.; YAMAOKA, Y. 2003. Delivery of matrix metalloproteinase-1 attenuates established liver fibrosis in the rat. **Gastroenterology**, Philadelphia, v. 124, n. 2, p. 445-458, 2003.

KNOW, A. H.; INADA, Y.; UETSUJI, S.; YAMAMURA, M.; HIOKI, K.; YAMAMOTO, Response of fibronectin to liver regeneration after hepatectomy, **Hepatology**, Baltimore, p. 593-598, 1989.

IREDALE, J. P.; BENYON, R. C.; PICKERING, J.; MCCULLEN, M.; NORTHROP, M.; PAWLEY, S.; HOVELL, C.; ARTHUR, M. J. Mechanisms of spontaneous resolution of rat liver fibrosis. Hepatic stellate cell apoptosis and reduced hepatic expression of metalloproteinase inhibitors. **The Journal of Clinical Investigation**, New Haven, v. 102, n. 3, p. 538-549, 1998.

ISLAMI, A. H.; PACK, G. T.; HUBBARD, J. C. Regenerative hyperplasia of the cirrhotic liver following partial hepatectomy. **Cancer**, New York, v. 11, n. 4, p. 663-686, 1958.

IWAMOTO, H.; SAKAI, H.; KOTOH, K.; NAKAMUTA, M.; NAWATA, H. Soluble Arg-Gly-Asp peptides reduce collagen accumulation in cultured rat hepatic stellate cells. **Digestive Diseases and Sciences**, New York, v. 44, n. 5, p. 1038-1045, 1999.

JESUS, R. P.; WAITZBERG, D. L., CAMPOS, F. G. Regeneração hepática: papel dos fatores de crescimento e nutrientes. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 46, n. 3, p. 242-254, 2000.

JOHNSON, S. E. Afecções do fígado In: **Tratado de Medicina Interna Veterinária**, 4ª ed. São Paulo: Manole, 1997. v. 2, cap. 106, p. 1823-1835.

JONES, M. B.; MICHENER, C. M.; BLANCHETTE, J. O.; KUZNETSOV, V. A.; RAFFELD, M.; SERRERO, G.; EMMERT-BUCK, M. R.; PETRICIOIN, E. F.;

KRIZMAN, D. B.; LIOTTA, L. A.; KOHN, E. C. The granulins-epithelins precursor/PC-cell-derived growth factor is a growth factor for epithelial ovarian cancer. **Clinical Cancer Research**, Denville, v. 9, n. 1, p. 44-51, 2003.

JUNQUEIRA, L. C. U. Picrossirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections, **Histochemical Journal**, Santa Barbara, v. 11, p. 447-455, 1979.

JUNQUEIRA, L. C. U. Histology revisited - Technical improvement promoted by the use of hydrophilic resin embedding. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 47, n. 1/2, p. 92-95, 1995.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. v. 9, p. 273-282.

KAM, I.; LYNCH, S.; SVANAS, G.; TODO, S.; POLIMENO, L.; FRANCAVILLA, A.; PENKROT, R. J.; TAKAYA, S.; ERICZON, B. G.; STARZL, T. E.; VAN THIEL, D. H. Evidence that host size determines liver size: studies in dogs receiving orthotopic liver transplants. **Hepatology**, Baltimore, v. 7, p. 362-366, 1987.

KANNO, K.; TAZUMA, S.; CHAYAMA, K. AT1A- deficient mice show less severe progression of liver fibrosis induced by CCl₄. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 308, p. 177-183, 2003.

KAPLAN, M. M.; SCHMID, C.; PROVENZALE, D.; SHARMA, A.; DICKSTEIN, G.; MCKUSICK, A. A prospective trial of colchicine and methotrexate in the treatment of primary biliary cirrhosis. **Gastroenterology**, Baltimore, v. 117, n. 5, p. 1173-1180, 1999.

KAPLOWITZ, N.; EBERLE, D.; YAMADA, T. **Biochemical tests for liver disease**. In: ZAKIM, D.; BOYER, T. D. (Ed.) **Hepatology**: a textbook of liver disease. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1982. v. 1, p. 583-607.

KARIN, M.; BEN-NERIAH, Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity. **Annual Review of Immunology**, Palo Alto, v. 18, p. 621-663, 2000.

KAYANO, K.; YASUNAGA, M.; KUBOTA, M.; TAKENAKA, K.; MORI, K.; YAMASHITA, A.; KUBO, Y.; SAKAIDA, I.; OKITA, K.; SANUKI, K. Detection of proliferating hepatocytes by immunohistochemical staining for proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in patients with acute hepatic failure. **Liver**, Copenhagen, v. 12, n. 3, p. 132-136, 1992.

KHANNA, S. D.; PURI D. The hepatotoxic effects of dimethylnitrosamine in the rat **Journal of Pathology and Bacteriology**, Chandigarh, v. 1, p. 605-608, 1966.

KIRCHHOFFER, D.; LANGUINO, L. R.; RUOSLAHTI, E.; PIERSCHBACHER, M. D. Alpha 2 beta 1 integrins from different cell types show different binding specificities. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 265, n. 2, p. 615-618, 1990.

KNITTEL, T.; FELLMER, P.; RAMADORI, G. Gene expression and regulation of plasminogen activator inhibitor type I in hepatic stellate cells of rat liver. **Gastroenterology**, Philadelphia, v. 111, n. 3, p. 745-754, 1996.

KNITTEL, T.; JANNECK, T.; MULLER, L.; FELLMER, P.; RAMADORI, G. Transforming growth factor beta 1-regulated gene expression of Ito cells. **Hepatology**, Baltimore, v. 24, n. 2, p. 352-360, 1996

KNITTEL, T.; MEHDE, M.; KOBOLD, D.; SAILE, B.; DINTER, C.; RAMADORI, G. Expression patterns of matrix metalloproteinases and their inhibitors in parenchymal and non-parenchymal cells of rat liver: regulation by TNF-alpha and TGF-beta1. **Journal of Hepatology**, Amsterdam, v. 30, n. 1, p. 48-60, 1999.

KUIPER, J.; KAMPS, J. A.; VAN BERKEL, T. J. Identification of the inhibitor of the plasminogen activator as the major protein secreted by endothelial rat liver cells. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 245, n. 1-2, p. 229-334, 1989.

LEE, C. G.; HOMER, R. J.; ZHU, Z.; LANONE, S.; WANG, X.; KOTELIANSKY, V.; SHIPLEY, J. M.; GOTWALS, P.; NOBLE, P.; CHEN, Q.; SENIOR, R. M.; ELIAS, J. Interleukin-13 induces tissue fibrosis by selectively stimulating and activating transforming growth factor beta(1). **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 194, n. 6, p. 809-821, 2001.

LEE, H. S.; MIAU, L. H.; CHEN, C. H.; CHIOU, L. L.; HUANG, G. T.; YANG, P. M.; SHEU, J. C. Differential role of p38 in IL-1alpha induction of MMP-9 and MMP-13 in an established liver myofibroblast cell line. **Journal of Biomedical Science**, Basel, v. 10, n. 6, Pt 2, p. 757-765, 2003.

LEE, K. S.; BUCK, M.; HOUGLUM, K.; CHOJKIER, M. Activation of hepatic stellate cells by TGF alpha and collagen type I is mediated by oxidative stress through c-myb expression. **The Journal of Clinical Investigation**, New Haven, v. 96, n. 5, p. 2461-2468, 1995.

LEYLAND, H.; GENTRY, J.; ARTHUR, M. J.; BENYON, R. The plasminogen-activating system in hepatic stellate cells. **Hepatology**, Baltimore, v. 24, n. 5, p. 1172-1178, 1996.

LI, H.; HOU, S.; WANG, W.; YANG, L.; LI, Y.; TAN, J. In vitro effects of metal ions on lipid peroxidation induced by alcohol in mice liver homogenate. **Journal of environmental biology**, Muzaffarnagar, v. 24, n. 4, p. 423-428, 2003.

LI, C.; LUO, J.; LI, L.; CHENG, M.; HUANG, N.; LIU, J.; Waalkes, M. P. The collagenolytic effects of the traditional Chinese medicine preparation, Han-Dan-Gan-Le, contribute to reversal of chemical-induced liver fibrosis in rats. **Life Science**, Oxford, v. 72, n. 14, p. 1563-1571, 2003b.

LI, J.; LIAO, E. Y.; DAI, R. C.; WEI, Q. Y.; LUO, X. H. Effects of 17 beta-estradiol on the expression of interstitial collagenases-8 and -13 (MMP-8 and MMP-13) and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) in ovariectomized rat osteoblastic cells. **Journal of Molecular Histology**, Dordrecht, v. 35, n. 8-9, p. 723-731, 2004.

LIU, X. H.; CONNOLLY, J. M.; ROSE, D. P. Eicosanoids as mediators of linoleic acid-stimulated invasion and type IV collagenase production by a metastatic human breast cancer cell line. **Clinical & Experimental Metastasis**, London, v. 14, n. 2, p. 145-152, 1996.

LIU, H. L.; LI, X. H.; WANG, D. Y.; YANG, S. P. Matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 expression in fibrotic rat liver. **World Journal of Gastroenterology**, Beijing, v. 6, n. 6, p. 881-884, 2000.

LU, R.; SERRERO, G. Inhibition of PC cell-derived growth factor (PCDGF, epithelin/granulin precursor) expression by antisense PCDGF cDNA transfection inhibits tumorigenicity of the human breast carcinoma cell line MDA-MB-468.

Proceedings National Academy Sciences of USA, Washington, v. 97, p. 3993–3998, 2000.

LU, R.; SERRERO, G. Mediation of estrogen mitogenic effect in human breast cancer MCF-7 cells by PC-cell-derived growth factor (PCDGF/granulin precursor).

Proceedings National Academy Sciences of USA, Washington, v. 98, p. 142-147, 2001.

MACPHEE, P. J.; SCHIMIDT, E. E.; GROOM, A. C. Evidence for Kupffer cell migration along liver sinusoids, from high-resolution in vivo microscopy. **American Journal of Physiology**, Washington, v. 236, p. G17-G23, 1992.

MALIK, R.; MELLOR, N.; SELDEN, C.; HODGSON, H. Triiodothyronine Enhances the Regenerative Capacity of the Liver Following Partial Hepatectomy, **Liver Biology and Pathology**, v. 37, 79-86, 2003.

MANGNALL, D.; BIRD, N. C.; MAJEED, A. W. The molecular physiology of liver regeneration after partial hepatectomy. **Liver international**, Oxford, v. 23, p. 123-138, 2003.

MANGNALL, D.; SMITH, K.; BIRD, N. C.; MAJEED, A. W. Early increases in plasminogen activator activity following partial hepatectomy in humans. **Comparative Hepatology**, London, v. 3, n. 1, p. 11, 2004.

MARCEAU, N.; DESCHENES, J.; VALET, J. P. Effect of hepatocyte proliferation and neoplastic transformation on alpha-fetoprotein (AFP) and albumin (ALB) production per cell. Influence of cell specialization and cell size. **Oncodevelopmental Biology and Medicine**, Amsterdam, v. 3, n. 1, p. 49-63, 1982.

MARCEAU, N.; GERMAIN, L.; GOYETTE, R.; NOEL, M.; GOURDEAU, H. Cell of origin of distinct cultured rat liver epithelial cells, as typed by cytokeratin and surface component selective expression. **Biochemistry and Cell Biology**, Ottawa, v. 64, n. 8, p. 788-802, 1988.

MARCEAU, N.; BLOUIN, M. J.; GERMAIN, L.; NOEL, M. Role of different epithelial cell types in liver ontogenesis, regeneration and neoplasia. **In Vitro Cellular & Development Biology**, Montréal, v. 25, p. 336-341, 1989.

MARGOLIN, K. A.; NEGRIN, R. S.; WONG, K. K.; CHATTERJEE, S.; WRIGHT, C.; FORMAN, S. J. Cellular immunotherapy and autologous transplantation for hematologic malignancy. **Immunological Reviews**, Copenhagen, v. 157, p. 231-240, 1997.

MARS, W. M.; KIM, T-H.; STOLZ, D. B.; LIU, M-L.; MICHALOPOULOS, G. K. Presence of urokinase in serum-free primary rat hepatocyte cultures and its role in activating hepatocyte growth factor. **Cancer Research**, Chicago, v. 56, p. 2837-2843, 1996.

MARS, W. M.; LIU, M-L.; KITSON, R. P.; GOLDFARB, R. H.; GABAUER, M. K.; MICHALOPOULOS, G. K. Immediate early detection of urokinase receptor after partial hepatectomy and its implications for the initiation of liver regeneration. **Hepatology**, Baltimore, v. 21, p. 1695-1701, 1995.

MARTELLI-JUNIOR, H.; COTRIM, P.; GRANER, E.; SAUK, J. J.; COLETTA, R. D. Effect of transforming growth factor-beta1, interleukin-6, and interferon-gamma on the expression of type I collagen, heat shock protein 47, matrix metalloproteinase (MMP)-1 and MMP-2 by fibroblasts from normal gingiva and hereditary gingival fibromatosis. **The Journal of Periodontology**, Chicago, v. 74, n. 3, p. 296-306, 2003.

MARTI, H. P.; MCNEIL, L.; DAVIES, M.; MARTIN, J.; LOVETT, D. H. Homology cloning of rat 72 kDa type IV collagenase: cytokine and second-messenger inducibility in glomerular mesangial cells. **The Biochemical Journal**, London, v. 291, Pt 2, p. 441-446, 1993.

MARTIN, E.; FELDMANN, G. Histopathologie du foie et des voies biliaires. In: falta autor do livro. **Embryologie-anatomie. Méthodes d'étude macroscopique. Malpositions et malformations**. New York: Masson ed. 1998. p. 1-7.

MATSUDA, Y.; MATSUMOTO, K.; YAMADA, A.; ICHIDA, T.; ASAKURA, H.; KOMORIYA, Y.; NISHIYAMA, E.; NAKAMURA, T. Preventive and therapeutic effects

in rats of hepatocyte growth factor infusion on liver fibrosis/cirrhosis. **Hepatology**, Baltimore, v. 26, n. 1, p.81-89, 1997.

MIYAI, K. Structural organization of liver. In: MEEKS, R. G.; HARRISON, S. D.; BULL, R. J. (Ed.). **Hepatotoxicology**. Boca Raton: CRC Press, 1991. p. 1-65.

MIYAZAKI, S.; TAKASAKI, K.; YAMAMOTO, M.; TSUGITA, M.; OTSUBO, T. Liver regeneration of fibrosis of the liver parenchyma. **Hepatogastroenterology**, Stuttgart, v. 46, n. 29, p. 2919-2924, 1999.

MICHALOPOULOS, G. K.; DEFRANCES, M. C. Liver regeneration. **Science**, Washington, v. 276, n. 5309, p.60-66, 1997.

MILLER, L. L.; BLY, C. G.; BALE, W. F. The dominant role of the liver in plasma protein synthesis; a direct study of the isolated perfused rat liver with the aid of lysine-epsilon-C14. **The Journal of experimental medicine**. New York, v. 94, p. 431-453, 1951.

MIZOBUCHI, Y.; SHIMIZU, I.; HORI, H.; SHONO, M.; ITO, S. Retinyl palmitate reduces hepatic fibrosis in rats induced by dimethylnitrosamine or pig serum, **Journal of Hepatology**, Amsterdam, v. 29, p. 933-943, 1998.

MIZUTANI, T.; PING, L. X.; KWAZOE, S.; HOJO, Y. Induction of hepatic DT-diaphorase in mice by butylated hydroxyanisole analogs: a structure-activity study. **Research communications in molecular pathology and pharmacology**, Westbury, v.110, p. 161-168, 2001.

MORIS, G. F.; MATHEWS, M. B. Regulation of proliferating cell nuclear antigen during the cell cycle. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 264, n. 23, p. 1356-1364, 1989.

MOORE, K. L.; PERSAUD, T. V. N. O Sistema Digestório:_____. **Embriologia Clínica**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda, 2004. p. 290-292.

MULLER, A.; MACHNIK, F.; ZIMMERMANN, T.; CHUBERT, H. Thioacetamide-induced cirrhosis-like liver lesions in rats--usefulness and reliability of this animal model. **Experimental Pathology**, Jena, v. 34, n. 4, p. 229-236, 1988.

MULLER, P.; POMORSKI, T.; PORWOLI, S.; TAUBER, R.; HERRMANN, A. Transverse movement of spin-labeled phospholipids in the plasma membrane of a hepatocytic cell line (HepG2): implications for biliary lipid secretion. **Hepatology**, Baltimore, v. 24, p. 497-503, 1996.

MURPHY, G.; ATKINSON, S.; WARD, R.; GAVRILOVIC, J.; REYNOLDS, J. J. The role of plasminogen activators in the regulation of connective tissue metalloproteinases. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 667, p. 1-12, 1992.

NAGLER, A.; FIRMAN, N.; FEFERMAN, R.; COTEV, S.; PINES, M.; SHOSHAN, S. Reduction in pulmonary fibrosis in vivo by halofuginone. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, New York, v. 154, n. 4 Pt 1, p. 1082-1086, 1996.

NAGY, P.; SCHAFF, Z.; LAPIS, K. Immunohistochemical detection of transforming growth factor-beta 1 in fibrotic liver diseases. **Hepatology**, Baltimore, v. 14, n. 2, p. 269-273, 1991.

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

NAPOLI, J.; BISHOP, G. A.; MCCAUGHAN, G. W. Increased intrahepatic messenger RNA expression of interleukins 2, 6, and 8 in human cirrhosis. **Gastroenterology**, Philadelphia, v. 107, n. 3, p. 789-798, 1994.

NG, I. O.; LAI, E. C.; FAN, S. T.; NG, M.; CHAN, A. S.; SO, M. K. Prognostic significance of proliferating cell nuclear antigen expression in hepatocellular carcinoma. **Cancer**, New York, v. 73, n. 9, p. 2268-2274, 1994.

NIKI, T.; DE BLESER, P. J.; XU, G.; VAN DEN BERG, K.; WISSE, E.; GEERTS, A. Comparison of glial fibrillary acidic protein and desmin staining in normal and CCl₄-induced fibrotic rat livers. **Hepatology**, Baltimore, v. 23, n. 6, p. 1538-1545, 1996.

NOGUCHI, T.; IMAI, T.; MIZUMATO, R. preoperative estimation of surgical risk of hepatectomy in cirrhotic patients. **Hepatogastroenterology**, Stuttgart, v. 37, n. 2, p. 165-171, 1990.

OE, S.; FUKUNAKA, Y.; HIROSE, T.; YAMAOKA, Y.; TABATA, Y. A trial on regeneration therapy of rat liver cirrhosis by controlled release of hepatocyte growth factor. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 88, n. 2, p. 193-200, 2003.

OGATA, I.; SAEZ, C. G.; GREENWEL, P.; PONCE MDE, L.; GEERTS, A.; LEINWAND, L. A.; ROJKIND, M. Rat liver fat-storing cell lines express sarcomeric myosin heavy chain mRNA and protein. **Cell Motility and the Cytoskeleton**, New York, v. 26, n. 2, p. 125-132, 1993.

OLASO, E.; FRIEDMAN, S. L. Molecular regulation of hepatic fibrogenesis. **Journal of Hepatology**, Amsterdam, v. 29, p. 836-847, 1998.

OREN, R.; RESNICK, M. B.; BRILL, S.; DOTAN, I.; ZAIDEL, L.; LIFSHITS-MERCER, B.; HALPERN, Z. Thyroxine accelerates proliferation of injured liver cells. **Journal of Hepatology**, Amsterdam, v. 29, n. 4, p. 634-637, 1998.

PAN, C. X.; KINCH, M. S.; KIENER, P. A.; LANGERMANN, S.; SERRERO, G.; SUN, L.; CORVERA, J.; SWEENEY, C. J.; LI, L.; ZHANG, S.; BALDRIDGE, L. A.; JONES, T. D.; KOCH, M. O.; ULBRIGHT, T. M.; EBLE, J. N.; CHENG, L. PC cell-derived growth factor expression in prostatic intraepithelial neoplasia and prostatic adenocarcinoma. **Clinical Cancer Research**, Denville, v. 10, n. 4, p. 1333-1337, 2004.

PARNELL, P. G.; WUNDERLICH, J.; CARTER, B.; HALPER, J. Transforming growth factor e: amino acid analysis and partial amino acid sequence. **Growth Factors**, New York, v. 7, p. 65-72, 1992.

- PARRA, O. M.; SAAD, W. A.; FERRAZ NETO, J. B. E.; FERRI, S. SOUZA E SILVA, R. A. P. S.; DAL COLLETO, G. M. D.; SAAD JUNIOR, W. Additional growth of an intact liver induced by exogenous hepatotrophic factors. A study in rats. ABCD. **Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva**, São Paulo, v. 7, n. 64, 1992.
- PARRA, O. M.; SAAD, W. A.; SOUSA, E.; SILVA, R. A. P.; HERNANDEZ-BLASQUEZ, F. J.; PEDUTO, L.; FERRAZ-NETO, B. H.; SAAD, J. R. W. A. Stimulation of intact rat liver by exogenous hepatotrophic factors with additional growth of its mass. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v. 9, n. 1, p. 7-11, 1994.
- PARRA, O. M.; SILVA, R. A. P. S.; SILVA, J. R. M. C.; HERNANDEZ-BLAZQUEZ, F. J.; PEDUTO, L.; SAAD, W. A.; SAAD JUNIOR, W. A. Reduction of liver mass due to malnutrition in rats. Correlation with emaciation of animals and size of organs not inserted in the portal system, **Revista Paulista de Medicina**, São Paulo, v. 113, p. 3, p. 903-909, 1995a.
- PARRA, O. M.; SILVA, R. A. P. S.; SILVA, J. R. M.; HERNANDEZ-BLAZQUEZ, F. J.; PEDUTO, L.; SAAD, W. A.; JUNIOR, W. A. S. Enhancement of liver size by stimulation of intact rat liver with exogenous hepatotrophic factors. **São Paulo Medical Journal**, São Paulo, v. 113, n. 4, p. 941-947, 1995b.
- PARRA, O. M.; HERNANDEZ-BLAZQUEZ, F. J.; DA SILVA, J. R.; SOUSA SILVA, R. A.; SAAD, W. A.; SAAD JUNIOR, W. A. Behavior of collagen extracellular liver matrix during regenerative growth after partial hepatectomy or after stimulation by exogenous hepatotrophic factors. Study in rats. **Arquivos de Gastroenterologia**, São Paulo, v. 33, n. 4, p. 212-216, 1996.
- PEREIRA, H. M.; HERNANDEZ-BLAZQUEZ, F. J.; PARRA, O. M.; COGLIATI, B.; COSTA, W. P. Quantificação do tecido colágeno em fígado com fibrose induzida em ratas (*Rattus norvegicus albinus*) tratadas com fatores hepatotróficos exógenos. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da Unipar**, Umuarama, v. 6, p. 196-217, 2003.
- PAWA, S.; ALI, S. Liver necrosis and fulminant hepatic failure in rats: protection by oxyanionic form of tungsten. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1688, n. 3, p. 210-222, 2004.
- PINZANI, M.; GESUALDO, L.; SABBAH, G. M.; ABBOUD, H. E. Effects of platelet-derived growth factor and other polypeptide mitogens on DNA synthesis and growth of cultured rat liver fat-storing cells. **The Journal of Clinical Investigation**, New Haven, v. 84, n. 6, p. 1786-1793, 1989.

PINZANI, M.; MARRA, F. Cytokine receptors and signaling in hepatic stellate cells. **Seminars in Liver Disease**, New York, v. 21, n. 3, p. 397-416, 2001.

PINZANI, M.; ROMBOUTS, K.; COLAGRANDE, S. Fibrosis in chronic liver diseases: diagnosis and management. **Journal of Hepatology**, Oxford, v. 42, p. 22-36, 2005.

POPPER, H. Viral versus chemical hepatocarcinogenesis. **Journal of Hepatology**, Oxford, v. 6, p. 229-238, 1988.

POULOS, J. E.; WEBER, J. D.; BELLEZZO, J. M.; DI BISCEGLIE, A. M.; BRITTON, R. S.; BACON, B. R.; BALDASSARE, J. J. Fibronectin and cytokines increase JNK, ERK, AP-1 activity, and transin gene expression in rat hepatic stellate cells. **The American Journal of Physiology**, Washington, v. 273, n. 4, Pt 1, p. G804-G811, 1997.

PRATT, D. S.; KAPLAN, M. M. Evaluation of abnormal liver-enzyme results in asymptomatic patients. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 342, n. 17, 2000.

PREAUX, A. M.; D'ORTHO M, P.; BRALET, M. P.; LAPERCHE, Y.; MAVIER, P. Apoptosis of human hepatic myofibroblasts promotes activation of matrix metalloproteinase-2. **Hepatology**, Baltimore, v. 36, n. 3, p. 615-622, 2002.

QUAX, P. H.; VAN DEN HOOGEN, C. M.; VERHEIJEN, J. H.; PADRO, T.; ZEHEB, R.; GELEHRTER, T. D.; VAN BERKEL, T. J.; KUIPER, J.; EMEIS, J. J. Endotoxin induction of plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type 1 mRNA in rat tissues in vivo. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 265, n. 26, p. 15560-15563, 1990.

RABES, H. M.; WIRSCHING, R.; TUCZEK, H. V.; ISELER, G. Analysis of cell cycle compartments of hepatocytes after partial hepatectomy. **Cell and Tissue Kinetics**, Oxford, v. 9, n. 6, p. 517-532, 1976.

RABINOVICI, N.; WIENER, E. Collagen and deoxyribonucleic acid concentrations during regeneration in the hepatectomized cirrhotic liver. **Gastroenterology**, Philadelphia, v. 41, p. 251-257, 1961.

RABINOVICI, N.; WIENER, E. Liver regeneration after partial hepatectomy in carbon tetrachloride-induced cirrhosis in the rat. **Gastroenterology**, Philadelphia, v. 40, p. 416-422, 1961.

RAMADORI, G. The stellate cell (Ito-cell, fat-storing cell, lipocyte, perisinusoidal cell) of the liver. New insights into pathophysiology of an intriguing cell. **Virchows Archiv. B, Cell pathology including molecular pathology**, Berlin, v. 61, n. 3, p. 147-158, 1991.

RAMALHO, L. N.; RAMALHO, F. S.; ZUCOLOTO, S.; CASTRO-E-SILVA JUNIOR, O.; CORREA, F. M.; ELIAS JUNIOR, J.; MAGALHAES, J. F. Effect of losartan, an angiotensin II antagonist, on secondary biliary cirrhosis. **Hepatogastroenterology**, Stuttgart, v. 49, p. 1499-1502, 2002.

RAPPAPORT, A. M.; BOROWY, Z. J.; LOUGHEED, W. M.; LOTTO, W. N. Subdivision of hexagonal liver lobules into a structural and functional unit. Role in hepatic physiology and pathology. **Anatomic Record**, London, v. 119, p. 11-34, 1954.

REID, L. M.; FIORINO, A. S.; SIGAL, S. H.; BRILL, S.; HOLST, P. A. Extracellular matrix gradients in the space of Disse: relevance to liver biology. **Hepatology**, Baltimore, v. 15, p. 1198-1203, 1992.

RIEDER, H.; MEYER ZUM BUSCHENFELDE, K. H.; RAMADORI, G. Functional spectrum of sinusoidal endothelial liver cells. Filtration, endocytosis, synthetic capacities and intercellular communication. **Journal of Hepatology**, Oxford, v. 15, p. 237-250, 1992.

RIEDER, H.; ARMBRUST, T.; MEYER ZUM BUSCHENFELDE, K. H.; RAMADORI, G. Contribution of sinusoidal endothelial liver cells to liver fibrosis: expression of transforming growth factor-beta 1 receptors and modulation of plasmin-generating enzymes by transforming growth factor-beta 1. **Hepatology**, Baltimore, v. 18, n. 4, p. 937-944, 1993.

RIES, C.; PETRIDES, P. E. Cytokine regulation of matrix metalloproteinase activity and its regulatory dysfunction in disease. **Biological Chemistry Hoppe-Seyler**, Berlin, v. 376, n. 6, p. 345-355, 1995.

ROCKEY, D. C. Hepatic blood flow regulation by stellate cells in normal and injured liver. **Seminars in Liver Disease**, London, v. 21, p. 337-350, 2001.

ROEB, E.; GRAEVE, L.; HOFFMANN, R.; DECKER, K.; EDWARDS, D. R.; HEINRICH, P. C. Regulation of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 gene expression by cytokines and dexamethasone in rat hepatocyte primary cultures. **Hepatology**, Baltimore, v. 18, n. 6, p. 1437-1442, 1993.

ROJKIND, M.; PONCE-NOYOLA, P. The extracellular matrix of the liver. **Collagen and Related Research**, Stuttgart, v. 2, n. 2, p. 151-175, 1982.

ROJKIND, M. Role of metalloproteinases in liver fibrosis. **Alcoholism, Clinical and Experimental Research**, New York, v. 23, n. 5, p. 934-939, 1999.

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

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

SAKAIDA, I.; HIRONAKA, K.; KIMURA, T.; TERA, S.; YAMASAKI, T.; OKITA, K. Herbal medicine Sho-saiko-to (TJ-9) increases expression matrix metalloproteinases (MMPs) with reduced expression of tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMPs) in rat stellate cell. **Life Sciences**, Oxford, v. 74, n. 18, p. 2251-2263, 2004.

SAKAMOTO, T.; LIU, Z.; MURASE, N.; EZURE, T.; YOKOMURO, S.; POLI, V.; DEMETRIS, A. J. Mitosis and apoptosis in the liver of interleukin-6-deficient mice after partial hepatectomy. **Hepatology**, Baltimore, v. 29, n. 2, p. 403-411, 1999.

SAKSELA, O.; RIFKIN, D. B. Cell-associated plasminogen activation: regulation and physiological functions. **Annual Review of Cell Biology**, Palo Alto, v. 4, p. 93-126, 1988.

SALGADO, S.; GARCIA, J.; VERA, J.; SILLER, F.; BUENO, M.; MIRANDA, A.; SEGURA, A.; GRIJALVA, G.; SEGURA, J.; OROZCO, H.; HERNANDEZ-PANDO, R.; FAFUTIS, M.; AGUILAR, L. K.; AGUILAR-CORDOVA, E.; ARMENDARIZ-BORUNDA, J. Liver cirrhosis is reverted by urokinase-type plasminogen activator gene therapy. **Molecular Therapy**, San Diego, v. 2, n. 6, p. 545-551, 2000.

SATO, M.; MAKUBARI, M.; KAWAMURA, M.; SUGIMOTO, J.; MATSUMOTO, K.; ISHII, T. The decrease in total collagen fibers in the liver by hepatocyte growth factor after formation of cirrhosis induced by thioacetamide. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v. 59, n. 6, p. 681-690, 2000.

SCHAEFER, B.; RIVAS-ESTILLA, A. M.; MERAZ-CRUZ, N.; REYES-ROMERO, M. A.; HERNANDEZ-NAZARA, Z. H.; DOMINGUEZ-ROSALES, J. A.; SCHUPPAN, D.; GREENWEL, P.; ROJKIND, M. Reciprocal modulation of matrix metalloproteinase-13 and type I collagen genes in rat hepatic stellate cells. **The American Journal of Pathology**, Philadelphia, v. 162, n. 6, p. 1771-1780, 2003.

SCHUPPAN, D.; RUEHL, M.; SOMASUNDARAM, R.; HAN, E. G. Matrix as modulator of hepatic fibrinogenesis. **Seminars in Liver Disease**, New York, v. 21, p. 351-372, 2001.

SCHUPPAN, D.; STROBEL, D.; HAN, E. G. Hepatic fibrosis - Therapeutic strategies. **Digestion**, New York, v. 59, p. 385-390, 1998.

SEKI, T.; IMAI, H.; UNO, S.; ARIGA, T.; GELEHRTER, T. D. Production of tissue-type plasminogen activator (t-PA) and type-1 plasminogen activator inhibitor (PAI-1) in mildly cirrhotic rat liver. **Thrombosis and Haemostasis**, Stuttgart, v. 75, n. 5, p. 801-807, 1996.

SELL, S.; LEFFERT, H. L. Washington An evaluation of cellular lineages in the pathogenesis of experimental hepatocellular carcinoma. **Hepatology**, Baltimore, v. 2, n. 1, p. 77-86, 1982.

SEONG, J.; HAN K, H.; PARK, Y. N.; NAM, S. H.; KIM, S. H.; KEUM, W. S.; KIM, K. S. Lethal hepatic injury by combined treatment of radiation plus chemotherapy in rats with thioacetamide-induced liver cirrhosis. **International Journal of Radiation Oncology**, Elmsford, v. 57, n. 1, p. 282-288, 2003.

SERRERO, G. Autocrine growth factor revisited: PC-cell derived growth factor (granulin precursor), a critical player in breast cancer tumorigenesis. **Biochemical Biophysical Research Communications**, San Diego, v. 308, p. 409-413, 2003.

SHETLAR, M. R.; SHETLAR, D. J.; BLOOM, R. F.; SHETLAR, C. L.; MARGOLIN, S. B. Involution of keloid implants in athymic mice treated with pirfenidone or with triamcinolone. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, Saint Louis, v. 132, n. 6, p. 491-496, 1998.

SHI, J.; AISAKI, K.; IKAWA, Y.; WAKE, K. Evidence of hepatocyte apoptosis in rat liver after the administration of carbon tetrachloride. **The American Journal of Pathology**, Philadelphia, v. 153, n. 2, p. 515-525, 1998.

SHIMIZU, A.; KOYAMA, M.; OKUDA, Y.; TAKASE, K.; NAKANO, T.; TAMEDA, Y. Hepatocellular carcinoma in primary biliary cirrhosis: a case report and review of the Japanese literature. **Hepatogastroenterology**, Stuttgart, v. 45, p. 2352-2355, 1998.

SHIMIZU, H.; MIYAZAKI, M.; WAKABAYASHI, Y.; MITSUHASHI, N.; ATSUSHI, K.; ITO, H.; NAKAGAWA, K.; YOSHIDOME, H.; KATAOKA, M.; NAKAJIMA, N. Vascular endothelial growth factor secreted by replicating hepatocytes induces sinusoidal endothelial cell proliferation during regeneration after partial hepatectomy in rats. **Journal of Hepatology**, Amsterdam, v. 34, p. 683-689, 2001.

SHIMIZU, I.; MA, Y.-R.; MIZOBUCHI, Y.; LIU, F.; MIURA, T.; NAKAI, Y.; YASUDA, M.; SHIBA, M.; HORIE, T.; AMAGAYA, S.; KAWADA, N.; HORI, H.; ITO, S. Effects of sho-saiko-to, a Japanese herbal medicine, on hepatic fibrosis in rats. **Hepatology**, Amsterdam, v. 29, n. 1, p. 149-160, 2003.

SHIOJIRI, N. The origin of intrahepatic bile duct cells in the mouse. **Journal of Embryology and Experimental Morphology**, Cambridge, v. 79, p. 25-39, 1984.

SIMILE, M. M.; BANNI, S.; ANGIONI, E.; CARTA, G.; DE MIGLIO, M. R.; MURONI, M. R.; CALVISI, D. F.; CARRU, A.; PASCALE, R. M.; FEO, F. 5'-Methylthioadenosine administration prevents lipid peroxidation and fibrogenesis induced in rat liver by carbon-tetrachloride intoxication. **Journal of Hepatology**, Amsterdam, v. 34, n. 3, p. 386-394, 2001.

SOYLU, A. R.; AYDOGDU, N.; BASARAN, U. M.; ALTANER, S.; TARCIN, O.; GEDIK, N.; UMIT, H.; TEZEL, A.; DOKMECI, G.; BALOGLU, H.; TURE, M.; KUTLU, K.; KAYMAK, K. Antioxidants vitamin E and C attenuate hepatic fibrosis in biliary-obstructed rats. **World Journal of Gastroenterology**, Beijing, v. 12, n. 12, p. 6535-6541, 2006.

SPIRA, G.; MAWASI, N.; PAIZI, M.; ANBINDER, N.; GENINA, O.; ALEXIEV, R.; PINES, M. Halofuginone, a collagen type I inhibitor improves liver regeneration in cirrhotic rats. **Journal of Hepatology**, Amsterdam, v. 37, n. 3, p. 331-339, 2002.

STARK, M.; KUHN, K. Molecular fragments of rat skin collagen obtained on collagenase digestion. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 6, n. 4, p. 542-544, 1968.

STOLZ, D. B.; MARS, W. M.; PETERSEN, B. E.; KIM, T.; MICHALOPOULOS, G. K. Growth factor signal transduction immediately after two-thirds partial hepatectomy in the rat. **Cancer Research**, Chicago, v. 59, p. 3954-3960, 1999.

SUN, A. Y.; INGELMAN-SUNDBERG, M.; NEVE, E.; MATSUMOTO, H.; NISHITANI, Y.; MINOWA, Y.; FUKUI, Y.; BAILEY, S. M.; PATEL, V. B.; CUNNINGHAM, C. C.; ZIMA, T.; FIALOVA, L.; MIKULIKOVA, L.; POPOV, P.; MALBOHAN, I.; JANEBOVA, M.; NESPOR, K.; SUN, G. Y. Etanol and oxidative stress. **Clinical Experimental Research**, Milano, v. 25, p. 237-243, 2001.

SVEGLIATI-BARONI, G.; DI SARIO, A.; CASINI, A.; FERRETTI, G.; D'AMBROSIO, L.; RIDOLFI, F.; BOLOGNINI, L.; SALZANO, R.; ORLANDI, F.; BENEDETTI, A. The

Na⁺/H⁺ exchanger modulates the fibrogenic effect of oxidative stress in rat hepatic stellate cells. **Journal of Hepatology**, Amsterdam, v. 30, n. 5, p. 868-875, 1999.

TAKAHARA, T.; FURUI, K.; FUNAKI, J.; NAKAYAMA, Y.; ITOH, H.; MIYABAYASHI, C.; SATO, H.; SEIKI, M.; OOSHIMA, A.; WATANABE, A. Increased expression of matrix metalloproteinase-II in experimental liver fibrosis in rats. **Hepatology**, Baltimore, v. 21, n. 3, p. 787-795, 1995.

TALARICO, K. S.; FELLER, D. D.; NEVILLE, E. D. Effects of hyperoxia and hypoxia on mitosis in the normal and regenerating rat liver. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, Malden, v. 131, n. 2, p. 430-434, 1969.

TANGKEANGSIRISIN, W.; HAYASHI, J.; SERRERO, G. PC cell-derived growth factor mediates tamoxifen resistance and promotes tumor growth of human breast cancer cells. **Cancer Research**, Chicago, v. 64, n. 5, p. 1737-1743, 2004.

TARAO, K.; OHKAWA, S.; SHIMIZU, A.; HARADA, M.; NAKAMURA, Y.; OKAMOTO, N.; ITO, Y.; TAMAI, S.; IIMORI, K.; SUGIMASA, Y.. DNA synthesis activities of hepatocytes from noncancerous cirrhotic tissue and of hepatocellular carcinoma (HCC) cells from cancerous tissue can predict the survival of hepatectomized patients with HCC. **Cancer**, New York, v. 71, n. 12, p. 3859-3863, 1993.

TERUI, Y.; SAITO, T.; WATANABE, H.; TOGASHI, H.; KAWATA, S.; KAMADA, Y.; SAKUTA, S. Effect of angiotensin receptor antagonist on liver fibrosis in early stages of chronic hepatitis C. **Hepatology**, Baltimore, v. 36, n. 4, Pt 1, p. 1022, 2002.

THOMPSON, K.; MALTBY, J.; FALLOWFIELD, J.; MCAULAY, M.; MILLWARD-SADLER, H.; SHERON, N. Interleukin-10 expression and function in experimental murine liver inflammation and fibrosis. **Hepatology**, Baltimore, v. 28, n. 6, p. 1597-1606, 1998.

THORGEIRSSON, S. S.; GRISHAM, J. W. Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. **Nature Genetics**, New Yourk, v. 31, p. 339-346, 2002.

THORNTON, A. J.; BRUZZDZINSKI, C. J.; RAPER, S. E.; GELEHRTER, T. D. Plasminogen activator inhibitor-1 is an immediate early response gene in regenerating rat liver. **Cancer Research**, Baltimore, v. 54, n. 5, p. 1337-1343, 1994.

TEWDT, D. C. Cirrhosis: a consequence of chronic liver disease. **Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice**, Philadelphia , v. 15, p. 151-175, 1985.

TREY, C.; DAVIDSON, C. S. The management of fulminant hepatic failure. **Progress in liver diseases**, New York, v. 3, p. 282-298, 1970.

TSUKAMOTO, A.; KANEKO, Y.; YOSHIDA, T.; ICHINOSE, M.; KIMURA S. Regulation of angiogenesis in human hepatomas: possible involvement of p53-inducible inhibitor of vascular endothelial cell proliferation. **Cancer Letters**, Amsterdam, v. 141, n. 1-2, p. 79-84, 1999.

TURKER, R. W.; PARDEE, A. B.; FUJUWARA, K. Centriole ciliation is related to quiescence and DNA synthesis in 3T3 cells. **Cell**. Cambridge, v. 17, p. 527-535, 1979.

UPADHYA, A. G.; HARVEY, R. P.; HOWARD, T. K.; LOWELL, J. A.; SHENOY, S.; STRASBERG, S. M. Evidence of a role for matrix metalloproteinases in cold preservation injury of the liver in humans and in the rat. **Hepatology**, Baltimore, v. 26, n. 4, p. 922-928, 1997.

VAILLANT, B.; CHIARAMONTE, M. G.; CHEEVER, A. W.; SOLOWAY, P. D.; WYNN, T. A. Regulation of hepatic fibrosis and extracellular matrix genes by the th response: new insight into the role of tissue inhibitors of matrix metalloproteinases. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 167, n. 12, p. 7017-7026, 2001.

VA DEN OORD, J. J.; VOLTPE, R.; DESMET, V. J. Dendritic cells and the liver. **APMIS**, Copenhagen, v. 23, p. 68-76, 1991.

VA EYKEN, P.; DESMET, V. J. Bile ducts cell. In: LE BOUTON, A. V. (Ed.). **Molecular and cell biology of the liver**. Boca Raton: CRC Press, 1993. p. 475-524.

VAN THIEL, D. H.; GAVALER, J. S.; KAM, I.; FRANCAVILLA, A.; POLIMENO, L.; SCHADER, R. R.; SMITH, J.; DIVEN, W.; PENKROT, R. J.; STARZL, T. E. Rapid

growth of an intact human liver transplanted into a recipient larger than the donor. **Gastroenterology**, Baltimore, v. 93, p. 1414-1419, 1987.

VASSALLI, J. D.; SAPPINO, A. P.; BELIN, D. The plasminogen activator/plasmin system. **The Journal of Clinical Investigation**, New Haven, v. 88, n. 4, p. 1067-1072, 1991.

VERHEIJEN, J. H.; VISSE, R.; WIJNEN, J. T.; CHANG, G. T.; KLUFT, C.; MEERA KHAN, P. Assignment of the human tissue-type plasminogen activator gene (PLAT) to chromosome 8. **Human Genetics**, Berlin, v. 72, n. 2, p. 153-156, 1986.

WANG, W.; HAYASHI, J.; KIM, W. E.; SERRERO, G. PC cell-derived growth factor (granulin precursor) expression and action in human multiple myeloma. **Clinical Cancer Research**, Denville, v. 9, p. 2221-2228, 2003.

WATSON, P. J. Chronic hepatitis in dogs: a review of current understanding of the aetiology, progression and treatment. **The Veterinary Journal**, Chicago, v. 167, p. 238-241, 2004.

WERB, Z.; BANDA, M. J.; JONES, P. A. Degradation of connective tissue matrices by macrophages. I. Proteolysis of elastin, glycoproteins, and collagen by proteinases isolated from macrophages. **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 152, n. 5, p. 1340-1357, 1980.

WILASRUSMEE, C.; SRITHEPTAWEE, S.; KANCHANAPANJAPON, S.; SOPON, P.; VANICHANON, C.; LIMPTHONG, W.; PONGCHAILERKS, P.; LERTSITHICAI, P.; WILASRUSMEE, S.; KITTUR, D. S. Ultrastructural change in cirrhotic and noncirrhotic patients due to hepatectomy, **Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery**, Boston, v. 11, n. 4, p. 266-271, 2004.

WILLIAMS, E. J.; BENYON, R. C.; TRIM, N.; HADWIN, R.; GROVE, B. H.; ARTHUR, M. J.; UNEMORI, E. N.; IREDALE, J. P. Relaxin inhibits effective collagen deposition by cultured hepatic stellate cells and decreases rat liver fibrosis in vivo. **Gut**, London, v. 49, n. 4, p. 577-583, 2001.

WINWOOD, P. J.; SCHUPPAN, D.; IREDALE, J. P.; KAWSER, C. A.; DOCHERTY, A. J.; ARTHUR, M. J. Kupffer cell-derived 95-kd type IV collagenase/gelatinase B:

characterization and expression in cultured cells. **Hepatology**, Baltimore, v. 22, n. 1, p. 304-315, 1995.

YAMAGUCHI, Y.; MANN, D. M.; RUOSLAHTI, E. Negative regulation of transforming growth factor-beta by the proteoglycan decorin. **Nature**, London, v. 346, n. 6281, p. 281-284, 1990.

YAMAGUCHI, T.; MINOR, T.; ISSELHARD, W. Effect of glutamine or glucagon-insulin enriched total parenteral nutrition on liver and gut in 70% hepatectomized rats. **Journal of the American College of Surgeons**, Chicago, v. 185, p. 156-162, 1997.

YOKOI, Y.; NAMIHISA, T.; MATSUZAKI, K.; MIYAZAKI, A.; YAMAGUCHI, Y. Distribution of Ito cells in experimental hepatic fibrosis. **Liver**, Copenhagen, v. 8, n. 1, p. 48-52, 1988.

XU, L.; HUI, A. Y.; ALBANIS, E.; ARTHUR, M. J.; O'BYRNE, S. M.; BLANER, W. S.; MUKHERJEE, P.; FRIEDMAN, S. L.; ENG, F. J. Human hepatic stellate cell lines, LX-1 and LX-2: new tools for analysis of hepatic fibrosis. **Gut**, London, v. 54, n. 1, p. 142-151, 2006.

ZANOCCO-MARANI, T.; BATEMAN, A.; ROMANO, G.; VALENTINIS, B.; HE, Z.; BASERGA, R. Biological activities and signaling pathways of the granulin/epithelin precursor. **Cancer Research**, Chicago, v. 59, p. 5331-5340, 1999.

ZHANG, H.; SERRERO, G. Inhibition of tumorigenicity of the teratoma PC cell line by transfection with antisense cDNA for PC cell-derived growth factor (PCDGF, epithelin/granulin precursor). **Proceedings National Academy Sciences of USA**, Washington, v. 95, p. 14202-14207, 1998.

ZHANG, L. P.; TAKAHARA, T.; YATA, Y.; FURUI, K.; JIN, B.; KAWADA, N.; WATANABE, A. Increased expression of plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor during liver fibrogenesis of rats: role of stellate cells. **Journal of Hepatology**, Amsterdam, v. 31, n. 4, p. 703-711, 1999.

ZHANG, Q. S.; LUK, J. M.; ZHANG, J.; TIAN, G. Y. Targeting glycyrrhetic acid to hepatic stellate cells in treating rat liver fibrosis, **Chinese Journal of Hepatology**, Chongqing Shi, v. 13, n. 9, p. 664-667, 2005.

ZHENG, W. D.; ZHANG, L. J.; SHI, M. N.; CHEN, Z. X.; CHEN, Y. X.; HUANG, Y. H.; WANG, X. Z. Expression of matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in hepatic stellate cells during rat hepatic fibrosis and its intervention by IL-10. **World Journal of Gastroenterology**, Beijing, v. 11, n. 12, p. 1753-1758, 2005.

ZIMMERMANN, T.; MULLER, A.; MACHNIK, G.; FRANKE, H.; SCHUBERT, H.; DARGEL, R. Biochemical and morphological studies on production and regression of experimental liver cirrhosis induced by thioacetamide in Uje: WIST rats. **Zeitschrift für Versuchstierkunde**, Jena, v. 30, n. 5-6, p. 165-180, 1987.

ZIMMERMANN, T.; GARDEMANN, A.; MACHNIK, G.; DARGEL, R.; JUNGERMANN, K. Metabolic and hemodynamic responses of bivascularly perfused rat liver to nerve stimulation, noradrenaline, acetylcholine and glucagon in thioacetamide-induced micronodular cirrhosis. **Hepatology**, Baltimore, v. 15, n. 3, p. 464-470, 1992.