THIAGO PINHEIRO ARRAIS ALOIA

**Alterações celulares, moleculares e funcionais de fígados
de ratas Wistar tratadas com fatores hepatotróficos**

São Paulo
2010

THIAGO PINHEIRO ARRAIS ALOIA

**Alterações celulares, moleculares e funcionais de fígados de ratas Wistar
tratadas com fatores hepatotróficos**

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 a 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

2010

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.2268
FMVZ

Aloia, Thiago Pinheiro Arrais

**Alterações celulares, moleculares e funcionais de fígados de ratas Wistar
tratadas com fatores hepatotróficos** / Thiago Pinheiro Arrais Aloia. -- 2010.
160 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária
e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2010.

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. Fígado. 2. Fatores hepatotróficos. 3. Regeneração hepática. 4. Expressão gênica.
I. Título.

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: ALOIA, Thiago Pinheiro Arrais

Título: Alterações celulares, moleculares e funcionais de fígados de ratas Wistar tratadas com fatores hepatotróficos

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

Assinatura: _____ Julgamento: _____

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

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado: "Alterações celulares, moleculares e funcionais de fígados de ratas Wistar tratadas com fatores hepatotróficos", protocolado sob o nº1110/2007, utilizando 105 (cento e cinco) ratos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Francisco Javier Hernandez Blazquez, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 22/08/07.

We certify that the Research "Cellular, molecular and functional alterations in rat liver treated with hepatotrophic factors", protocol number 1110/2007, utilizing (one hundred five) rats, under the responsibility Prof. Dr. Francisco Javier Hernandez Blazquez, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo was approved in the meeting of day 08/22/2007.

São Paulo, 16 de março de 2010

Profa Dra Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

DEDICATÓRIA

A Deus deixo eternamente minha gratidão por sempre dar-me oportunidades em minha vida!

A minha mãe querida (*in memoriam*) que anda sempre comigo em todos os momentos. Que mesmo nos deixando na Terra, me orienta e protege em todos os meus caminhos demonstrando, "para mim" estar mais presente do que nunca principalmente em meu coração. Foram difíceis os momentos que passei quando você não estava mais entre nós, e, essa tese de doutoramento é inteiramente em sua dedicação. Para mim essa tese não é apenas mais uma etapa da minha vida, significa mais do isso, é um troféu que entrego a você por ter me dado educação, respeito, amor, profissionalismo, segurança e coragem que permitiram a execução deste. Sem sua criação, sem você minha mãe, eu não seria a pessoa que sou. Me orgulho de ter sido escolhido a dedo para ser seu filho. Você é um exemplo que sempre procuro seguir e que passarei aos meus filhos e netos. É difícil de expressar em palavras a gratidão e amor que tenho por você minha mãe.

São eternas as saudades deixadas por ti

Te amo e até breve mamis...

"Os bons momentos da vida são como paradas para o descanso. Os espíritos em sua origem já são eternos em sua passagem pela vida. Você, minha mãe, se tornou eterna nas realizações e no seu exemplo de vida. Sua vida de alegria é a realidade, e é o que aprendemos com a senhora, pois a sabedoria divina não comete enganos e até a sua partida Deus soube o que fez. Agora a senhora é uma nuvem que flutua no céu, é a estrela maior que brilha a noite, mas continua sendo eternamente minha "MÃE".

A DONA SÔNIA; a esposa; a irmã; a tia; a avó; a professora; a amiga;
Enfim ... a "MINHA MÃE" Thiago, Fred, Diogo e Luciano

25/04/1949-16/01/2009 †

AGRADECIMENTOS

A meu pai (Luciano Aloia) e irmãos (Frederico e Diogo) por fazerem parte de minha vida e terem me dado esse privilégio de formarmos uma linda família. Vocês são minha vida, hoje e sempre. Agradeço a vocês pelo apoio financeiro e acima de tudo pelos momentos em que me deram força e me encorajaram para nunca desistir. Hamintas, Lico e Galo, obrigado do Alemão.

Ao meu Mestre Francisco Javier Hernandez-Blazquez. Um exemplo de homem digno, honesto, correto, humano, ético, e acima de tudo amigo. Sua compreensão, ensinamentos, dedicação, solidariedade e honestidade o fazem mais ser humano do que qualquer "currículo lattes" encorpado. Obrigado por me aceitar como seu discípulo e por contribuir em minha formação como pesquisador e como pessoa digna nestes 5 anos de convivência.

Ao meu avô Gerson (*in memorian*) pelo exemplo de homem, respeito e por sempre acreditar e me incentivar em meus estudos. Um homem literalmente guerreiro que sempre revelava por trás de sua armadura sua compaixão.

A minha avó Thereza, avô Nicola (*in memorian*), tias Fátima, Ângela e Cecília, tio Tó e Geni, aos primos Nicolas e Alan e as primas Marília, Bruna e Paula, e a todos os outros tios(as), primos(as) e aos demais parentes de São Paulo que me receberam extraordinariamente de braços abertos.

Aos meu padrinho Bolinha (Paulo Vinícius), por me receber de portas abertas, pelo carinho e pela grande pessoa que representa para mim. Meu primo Fernando, que me deu toda a assistência necessária, amizade e companheirismo sempre que precisei.

A minha avó Sena (*in memorian*) que ainda guardo comigo suas sábias palavras de incentivo e aprendizado. As minhas tias Valéria, Zizi, Terezinha, Cleuza, Neli, Mimi (*in memorian*), tio Chico, Julião (pelos conselhos) Marco e Gersinho, primas Juliana, Luciana, Natália, Julieta e Flávia, primos Leo, Vinícios, Neto e Guilherme.

Ao meu grande amigo Bruno Cogliati, uma pessoa atenciosa, inteligente, amiga e que tem um futuro brilhante pela frente. Sou grato pelos seus ensinamentos laboratoriais e por suas palavras de incentivo em vários momentos na copa da

patologia. Sou muito agradecido por ter você em minha escassa lista de melhores amigos.

A Tereza Cristina por toda ajuda laboratorial e pela grande pequena pessoa que é. Sua atenção, dedicação e eficiência impressionam. Obrigado pela amizade.

Aos meus companheiros de república Carlos Alberto Sarmento, Evander Bueno, Guilherme Buzon, Caio Biazzi, Leandro Fadel, Marcello Machado e Fernando Garbelotti. Vocês são e sempre serão meus irmãos que levo de São Paulo para minha vida. Somente quem chega a uma cidade onde não tem amigos sabe o valor que tem pessoas companheiras, sinceras e chatas como vocês. Os momentos que passamos juntos são e serão inesquecíveis, até porque está tudo arquivado.

Ao técnico de laboratório Diogo Náder Palermo, pela ajuda técnica, amizade e parceria nesses 6 anos de convivência.

Aos meus colegas de laboratório Alex Sander, Maurício, e Elizângela, Paula, Gisele e Fernanda. Obrigado pela amizade, companhia e parceria por todo esse tempo.

A todos os demais colegas de pós-graduação, técnicos, professores, bibliotecários e secretários que participaram de alguma forma na construção e que sou profundamente grato.

Aos professores(as) Júlia Maria Matera, José Roberto Machado da Cunha Silva, Tereza Cristina da Silva e José Manoel dos Santos pela enorme contribuição na confecção e qualidade desse exemplar. Suas sugestões e pontos de vistas são e serão de grande valia para futuras publicações e contribuíram e estão sempre contribuindo para minha formação como profissional, assim como, para formação de dezenas de outros pós-graduandos. Vocês estão dando qualidade para a formação do corpo docente do ensino superior no Brasil e devem e merecem o respeito e a admiração de todos nós pós-graduandos. Obrigado.

A Eloíse e sua família, pela pessoa maravilhosa que apareceu num momento tão difícil e que vem me surpreendendo cada vez mais demonstrando a incrível pessoa que é. Obrigado por tudo!

A Fórmula Medicinal por fornecer o suporte adequado durante meu experimento de doutorado e a Fundação de Amparo de Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) por financiar esse trabalho e minha manutenção mensal.

A todos meus sinceros agradecimentos!

RESUMO

ALOIA, T. P. A. **Alterações celulares, moleculares e funcionais de fígados de ratas Wistar tratadas com fatores hepatotróficos.** [Cellular, molecular and functional alterations in rat liver treated with hepatotrophic factors]. 2010. 160 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Fatores hepatotróficos (FH) possuem a capacidade de promover aumento de massa hepática em ratos e diminuição da fibrose em animais cirróticos. Os FH podem ser importantes nos casos de ressecção e transplantes hepáticos no qual o fígado remanescente necessita de um volume considerável para exercer suas funções após a cirurgia. Objetivou-se neste trabalho avaliar a cinética de uma solução de FH em fígados de animais sadios. Utilizou-se 105 ratos Wistar fêmeas divididos em 7 grupos de 15 animais cada. 6 grupos receberam solução de FH na dose 40 ml/kg/dia, i.p. e 1 grupo controle (CT) recebeu apenas solução salina 0,9%. Os animais foram eutanasiados com 2, 4, 6, 8, 10 e 12 dias (grupos 2, 4, 6, 8, 10 e 12) após o início do tratamento. Avaliou-se os parâmetros biométricos, a proliferação dos hepatócitos pela análise imuno-histoquímica (PCNA), morfometria do colágeno, função hepática e a expressão gênica de colágeno $\alpha 1$, TGF β 1, MMP 2 e PLAU. O aumento de massa hepática foi maior nos grupos 8, 10 e 12. A marcação de hepatócitos PCNA⁺ obteve seu pico no grupo 2. A morfometria do colágeno (mensurado pelo picrossírius) revelou redução nos grupos 6, 10 e 12 (o Grupo 8 não foi avaliado). A imunofluorescência para colágeno tipo III evidenciou redução do colágeno no grupo 12. Os resultados das enzimas de função hepática permaneceram normais. A expressão gênica do colágeno $\alpha 1$ obteve alta expressão diminuindo com o decorrer do tratamento; a ação do gene TGF β 1 indicou inibição da proliferação celular no grupo 12. MMP 2 e PLAU não demonstraram participar de forma efetiva no mecanismo de ação dos FHs. Os resultados demonstraram que a solução de FH promove a hipertrofia hepatocitária, sem alteração da função hepática e diminuindo o colágeno volumétrico do fígado. Os FH representam uma opção relevante ao tratamento de hepatopatias ou quando é necessário aumento de massa hepática antes de hepatectomias e/ou ressecções.

Palavras-chave: Fígado. Fatores hepatotróficos. Regeneração hepática. Expressão gênica.

ABSTRACT

ALOIA, T. P. A. **Cellular, molecular and functional alterations in rat liver treated with hepatotrophic factors.** [Alterações celulares, moleculares e funcionais de fígados de ratas Wistar tratadas com fatores hepatotróficos]. 2010. 160 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Hepatotrophic factors (HF) have the ability to increase the liver mass in rats and decrease fibrosis in cirrhotic rats. HFs can be important in cases of resection and liver transplantation in which the remnant liver needs to restore a considerable mass volume before surgery. Thus, this study evaluates the kinetics of HF solution in the livers of healthy animals. Were used 105 female Wistar rats divided into 7 groups of 15 animals each. 6 groups received HF solution at a dose 40 ml/kg/day, i.p. and 1 control group (CT) only received 0.9% saline solution. The animals were euthanized at 2, 4, 6, 8, 10 and 12 days (groups 2, 4, 6, 8, 10 and 12) after starting treatment. The biometric parameters, proliferation of hepatocytes by immunohistochemical analysis (PCNA), collagen morphometry, liver biochemical function and gene expression of collagen $\alpha 1$, TGF β 1, MMP 2 and PLA2. The increase in liver mass was greater in groups 8, 10 and 12. The index of hepatocytes PCNA+ peak obtained in group 2. Morphometry of collagen (measured by picrosirius red) revealed reduction in groups 6, 10 and 12 (Group 8 was not evaluated). Immunofluorescence for collagen type III showed reduction of collagen in group 12. The results of the enzymes of liver function remained normal. Gene expression of collagen $\alpha 1$ expression was higher decreasing over the course of treatment; the action of TGF β 1 gene showed inhibition of cell proliferation in group 12. MMP 2 and PLA2 not shown to effectively participate in the mechanism of action of HFs. The results showed that the solution of HF promotes hepatocyte hypertrophy with no change in liver function and decreasing the volume of liver collagen. Therefore, HFs represents an important option for treatment of chronic liver diseases or when it is necessary to increase liver mass before hepatectomy and/or resections.

Keywords: Liver. Hepatotrophic factors. Hepatic regeneration. Genic expression.

LISTA DE ABREVIATURAS

A – Artéria

AACR – Aminoácidos de Cadeia Ramificada

aFGF – Acidic Fibroblast Growth Factor Alfa

ALB – Albumina

ALT – Alanina Aminotransferase

AST – Aspartato Aminotransferase

BIL - Bilirrubina

BILT – Bilirrubina Total

C – Colágeno

CAR – Peso da Carcaça

cDNA – Complementary Desoxirribonucleic Acid

CT – Controle

Ct(s) – Cycle Threshold

DAB – Diaminobenzidina

DB – Ducto Biliar

dCt – Delta Cycle Threshold

ddCt – Delta Delta Cycle Threshold

DEPC – Diethylpyrocarbonate

DNA – Desoxirribonucleic Acid

DNase – Desoxirribonuclease

dNTP(s) – Deoxynucleoside Triphosphates

DTT – Dithiothreitol

EDTA - Ethylenedinitrilotetraacetic Acid

EGF – Epidermal Growth Factor

FA – Fosfatase Alcalina

Fase G0 – Fase *Gap 0*

Fase G1 – Fase *Gap 1*

Fase S – Fase *Syntese*

FHs – Fatores Hepatotróficos

FK-506 – Fujimycin

FMVZ – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

FR – Fibras Reticulares

GGT – Gama-Glutamiltranspeptidase

GLO – Globulina

GP – Ganho de Peso

H – Hepatócitos

H-E – Hematoxilina-Eosina

HF(s) – Hepatotrophic Factors

HGF – Hepatocyte Growth Factor

HP – Hepatectomia Parcial

Hr – Hora

HSC(s) - Hepatic Stell Cels

HSS – Hepatic Stimulatory Substance

i.p. – Injeção Intraperitoneal

IgA – Imunoglobulina

IGF – Insulin-Like Growth Factor

IHC – Índice Hepato-Corporal

IHS – Índice Hepatossomático

IL – Interleukin

IVP – Índice Vísceras-Peso Total do Animal

LAMI – Laboratório de Anatomia Microscópica e Imuno-histoquímica

MEC – Matriz Extracelular

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

MF – Massa do Fígado

MGB – Minor Groove Biding

Min – Minuto

MMP – Metalloproteinase

MT-MMP – Membrane Type-Metalloproteinase

N – Número de amostras

NFQ – Nonfluorescent Quencher

PAI(s) – Plasminogen Activator Inhibitors

PCNA – Proliferating Cell Nuclear Antigen

PCNA⁺ – Proliferating Cell Nuclear Antigen Positive

PGE₂ – Prostaglandina E₂

pH – Potencial Hidrogeniônico

PLAU – Plasminogen Activator Urokinase

PPARs – Peroxisome Proliferator-Activated Receptors

PRf – Peso do Rato Final

PRi – Peso do Rato Inicial

PV – Proporção Volumétrica

q.s.p. – Quantidade Suficiente Para

RNA – Ribonucleic Acid

RNA_m – Ribonucleic Acid Messenger

RNase – Ribonuclease

RPM – Rotações Por Minuto

RT-PCR – Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction

Seg – Segundos

T3 – Triiodotironina

Taq – *Thermus aquaticus*

TGF – Transforming Growth Factors

TGF α – Transforming Growth Factor α

TGF β 1 – Transforming Growth Factors β 1

TIMPs – Tissue Inhibitor of Metalloproteinase

T_m – Temperatura

TNF – Tumor Necrosis Factor

TP – Tríade Portal

tPA – Tissue-type Plasminogen Activator

TSA – Tyramide Signal Amplification

uPAR – Urokinase Plasminogen Activator Regulation

USP – Universidade de São Paulo

V – Veia

VC – Veia Centrolobular

VH₂O – Volume de Água

V_i – Volume Inicial

VIS – Peso das Vísceras

LISTA DE SÍMBOLOS

% - Porcentagem

°C – Graus Celsius

> – Maior

± – Desvio Padrão

≤ – Menor ou Igual

µg – Microgramas

µl – Microlitro

µm – Micrômetro

µm² – Micrômetro Quadrado

cm³ – Centímetro Cúbico

cm³/g – Centímetros cúbicos/Grama

CO₂ – Dióxido de Carbono

g – Gramas

g/dL – Gramas/Decilitro

H₂O₂ – Peróxido de Hidrogênio

I – 1

II – 2

III – 3

IV – 4

kda – Kilodaltons

Kg – Kilos

M - Mol

mg/dL – Miligramas/Decilitro

ml – Mililitros

ml/kg – Mililitros/Kilo

mm – Milímetros

mM – Milimol

mm^2 – Milímetro Quadrado

N_2 – Gás Nitrogênio

$\text{ng}/\mu\text{l}$ – Nanogramas/Microlitro

nm – Nanômetro

OsO_4 – Tetróxido de Ósmio

S – Svedberg Units

U – Unidade

U/L – Unidades/Litro

x – Vezes

α – Alfa

β – Beta

γ – Gama

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Figura demonstrando os parâmetros biométricos obtidos após o sacrifício dos ratos.....	90
Figura 2 –	Figura demonstrando os parâmetros biométricos obtidos após o sacrifício dos ratos.....	91
Figura 3 –	Média e desvio padrão da massa hepática e do índice hepatossomático dos grupos experimentais após o período experimental	91
Figura 4 –	Figura ilustrando a dosagem bioquímica sérica de enzimas em todos os grupos experimentais	93
Figura 5 –	Figura ilustrando a dosagem bioquímica sérica de enzimas em todos os grupos experimentais	93
Figura 6 –	Fotomicrografias do tecido hepático das ratas tratadas com FH por 6 dias. As figuras são representativas para todos os grupos experimentais, uma que vez que, não houve alteração histopatológica em todos os grupos tratados quando comparados ao grupo controle	95
Figura 7 –	Fotomicrografias do tecido hepático das ratas do grupo controle. As figuras são representativas para todos os grupos experimentais, uma que vez que, não houve alteração histopatológica em todos os grupos tratados quando comparados ao grupo controle	96
Figura 8 –	Fotomicrografias do tecido hepático das ratas tratadas com FH por 6 dias. As figuras são representativas para todos os grupos experimentais, uma que vez que, não houve alteração histopatológica em todos os grupos tratados quando comparados ao grupo controle	97
Figura 9 –	Fotomicrografias do tecido hepático das ratas do grupo controle. As figuras são representativas para todos os grupos experimentais, uma que vez que, não houve alteração histopatológica em todos os grupos tratados quando comparados ao grupo controle	98
Figura 10 –	Fotomicrografias do tecido hepático das ratas do grupo controle. As figuras são representativas para todos os grupos experimentais, uma que vez que, não houve alteração histopatológica em todos os grupos tratados quando comparados ao grupo controle	99
Figura 11 –	Fotomicrografia do fígado ilustrando a mensuração do volume de colágeno em todos os grupos experimentais com o uso do software KS400	101

Figura 12 –	Comparação da média e desvio padrão da proporção volumétrica de colágeno das áreas em μm^2 em regiões dos sinusóides hepáticos dos grupos CT, 2, 6, 10 e 12.....	102
Figura 13 –	Fotomicrografias referentes aos testes imuno-histoquímicos realizados com a utilização de PCNA como marcador nuclear em todos os grupos experimentais	104
Figura 14 –	Gráfico demonstrando o índice de proliferação celular dos hepatócitos em todos os grupos experimentais	105
Figura 15 –	Mensuração de colágeno tipo III nos grupos CT, 2, 6 e 12 através do software AxioCAM HCr.....	106
Figura 16 –	Figura demonstrando marcação positiva na reação de imunofluorescência para colágeno tipo III nos grupos CT, 2 e 12.....	107
Figura 17 –	Padrão de bandas do RNA (18S e 28S) em gel de agarose 1,5%, demonstrando a alta qualidade obtida na extração de RNA do fígado dos animais selecionados pelo método das colunas.....	110
Figura 18 –	Gráfico da expressão relativa do gene colágeno $\alpha 1$ no tecido hepático nos grupos experimentais CT, 2, 4, 10 e 12	111
Figura 19 –	Gráfico da expressão relativa do gene TFG β 1 no tecido hepático nos grupos experimentais CT, 2, 6, 10 e 12	113
Figura 20 –	Gráfico da expressão relativa do gene MMP 2 no tecido hepático nos grupos experimentais CT, 2, 6, 10 e 12	114
Figura 21 –	Gráfico da expressão relativa do gene PLAU no tecido hepático nos grupos experimentais CT, 2, 6, 10 e 12	116
Figura 22 –	Fotomicrografia de varredura representativa do fígado criofraturado em N_2 ; Grupos CT e 12 identificando fibras colágenas presentes no arcabouço fibroso que envolve os hepatócitos e as demais células do fígado	118

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Tabela demonstrando os parâmetros biométricos obtidos após o sacrifício dos ratos de todos os grupos experimentais (FMVZ/USP – São Paulo – 2009).....	90
Tabela 2 –	Tabela demonstrando os valores médios obtidos dos parâmetros bioquímicos séricos avaliados do soro de todos os grupos experimentais (FMVZ/USP – São Paulo – 2009).....	92
Tabela 3 –	Valores médios da área de colágeno mensurada em 67.014,21 μm^2 de um corte histológico do fígado de 10 animais para cada um dos grupos (FMVZ/USP – São Paulo – 2009).....	102
Tabela 4 –	Valores percentuais indicando a redução da proporção volumétrica de colágeno dos grupos 2, 6, 10 e 12 em relação ao grupo controle (CT) (FMVZ/USP – São Paulo – 2009).....	103
Tabela 5 –	Valores percentuais indicando a marcação imuno-histoquímica positiva para proliferação celular (PCNA) em hepatócitos em todos os grupos experimentais (FMVZ/USP – São Paulo – 2009).....	105
Tabela 6 –	Porcentagens (μm^2) da mensuração de colágeno tipo III pela técnica de imunofluorescência nos grupos CT, 2, 6 e 12 (FMVZ/USP – São Paulo – 2010).....	108
Tabela 7 –	Expressão relativa do RNAm de colágeno $\alpha 1$ normalizado com o RNAm da β -actina em fígado de ratos. Os valores representam a média dos grupos CT, 2, 6, 10 e 12 utilizados no experimento (FMVZ/USP – São Paulo – 2009).....	112
Tabela 8 –	Expressão relativa do RNAm de TGF β 1 normalizado com o RNAm da β -actina em fígado de ratos. Os valores representam a média dos grupos CT, 2, 6, 10 e 12 utilizados no experimento (FMVZ/USP – São Paulo – 2009).....	113
Tabela 9 –	Expressão relativa do RNAm de MMP 2 normalizado com o RNAm da β -actina em fígado de ratos. Os valores representam a média dos grupos CT, 2, 6, 10 e 12 utilizados no experimento (FMVZ/USP – São Paulo – 2009).....	115
Tabela 10 –	Expressão relativa do RNAm de PLAU normalizado com o RNAm da β -actina em fígado de ratos. Os valores representam a média dos grupos CT, 2, 6, 10 e 12 utilizados no experimento (FMVZ/USP – São Paulo – 2009).....	116

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 –	Composição da solução de fatores hepatotróficos (FMVZ/USP – São Paulo – 2009)	73
Quadro 2 –	Quantificação do RNA extraído dos animais e cálculos para a realização da transcrição reversa (FMVZ/USP – São Paulo – 2009)	109

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	23
2	OBJETIVOS.....	29
3	REVISÃO DE LITERATURA.....	32
3.1	O FÍGADO.....	33
3.2	HEPATÓCITOS	33
3.3	SINUSÓIDES HEPÁTICOS.....	34
3.4	CÉLULAS DE KUPFFER.....	35
3.5	CÉLULAS ESTRELADAS.....	35
3.6	VASCULARIZAÇÃO E DRENAGEM LINFÁTICA	35
3.7	BILE.....	36
3.8	REGENERAÇÃO HEPÁTICA E FATORES HEPATOTRÓFICOS	36
3.8.1	Tipos de Fatores de Crescimento do Fígado.....	41
3.8.1.1	Agentes Mitogênicos.....	41
3.8.1.1.1	<i>Fator de Crescimento Epidérmico (EGF – Epidermal Growth Factor)</i>	<i>41</i>
3.8.1.1.2	<i>Fator Transformador do Crescimento-alfa (TGFA – Transforming Growth Factor-α).</i>	<i>42</i>
3.8.1.1.3	<i>Fator de Crescimento Hepático (HGF – Hepatocyte Growth Factor).....</i>	<i>43</i>
3.8.1.1.4	<i>Fator de Crescimento de Fibroblastos Ácidos (αFGF – acidic Fibroblast Growth Factor).....</i>	<i>44</i>
3.8.1.2	Agentes Co-Mitogênicos	44
3.8.1.2.1	<i>Substância Estimuladora Hepática (HSS – Hepatic Stimulatory Substance)</i>	<i>45</i>
3.8.1.2.2	<i>Norepinefrina e Receptor α_1 Adrenérgico</i>	<i>45</i>
3.8.1.2.3	<i>Vasopressina e Angiotensinas II e III.....</i>	<i>46</i>
3.8.1.2.4	<i>Insulina e Glucagon</i>	<i>47</i>
3.8.1.2.5	<i>Estrógenos e Progesterona</i>	<i>48</i>

3.8.1.2.6	<i>Agentes Imunossupressores</i>	49
3.8.1.2.7	<i>Prostaglandinas</i>	50
3.8.1.3	Agentes Inibidores do Crescimento	50
3.8.1.3.1	<i>Fator Transformador do Crescimento – beta (TGFβ – Transforming Growth Factor</i>	50
3.8.1.3.2	<i>Interleucina 1β</i>	51
3.8.1.3.3	<i>Fatores de Crescimento Parcialmente Caracterizados</i>	52
3.9	TERAPIA NUTRICIONAL	52
3.10	ANÁLISE SOROLÓGICA HEPÁTICA	60
3.11	GENES MODULADORES DA MATRIZ EXTRACELULAR	63
3.11.1	Metaloproteinases	63
3.11.1.1	MMP 2 e 9 (Gelatinase A e B)	65
3.11.1.2	MMP 1, 8 e 13 (Colagenases)	65
3.11.2	Colágeno α1	66
3.11.3	Fator Transformador do Crescimento – β1 (TGFβ1)	66
3.11.4	Uroquinase Ativador de Plasminogênio (PLAU)	68
4	MATERIAIS E MÉTODOS	70
4.1	ANIMAIS.....	71
4.2	PROTOCOLO EXPERIMENTAL	72
4.3	EUTANÁSIA DOS ANIMAIS	74
4.4	COLHEITA DOS ÓRGÃOS E PARÂMETROS BIOMÉTRICOS.....	74
4.5	COLHEITA E BIOQUÍMICA SÉRICA DAS AMOSTRAS SANGUÍNEAS ...	75
4.6	PROCESSAMENTO DO FÍGADO PARA HISTOLOGIA	76
4.6.1	Fixação e Inclusão para microscopia de luz	77
4.6.2	Processamento dos blocos	77

4.6.3	Colorações para microscopia de luz	77
4.6.3.1	Amostras incluídas em paraplast.....	77
4.6.3.1.1	<i>Hematoxilina-Eosina (Wallington, 1972).....</i>	<i>78</i>
4.6.3.1.2	<i>Picrossírius (JUNQUEIRA, et al. 1978)</i>	<i>78</i>
4.6.3.1.3	<i>Picrossírius (com passagem no ácido fosfomolibdico 2% - modificado)</i>	<i>78</i>
4.6.3.1.4	<i>Reticulina (impregnação por prata – GOMORI, 1937)</i>	<i>79</i>
4.7	AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA.....	79
4.8	MORFOMETRIA DO COLÁGENO	79
4.9	IMUNO-HISTOQUÍMICA	80
4.9.1	Detecção da proliferação celular (antígeno celular de proliferação nuclear - PCNA)	80
4.10	IMUNO-FLUORESCÊNCIA	81
4.10.1	Imunofluorescência para Colágeno Tipo III	81
4.11	MATERIAL FOTOGRÁFICO.....	82
4.12	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	82
4.13	REAL TIME RT-PCR.....	82
4.13.1	Extração de RNA total pelo método de colunas.....	83
4.13.2	Quantificação do RNA total	83
4.13.3	Tratamento do RNA total com DNase I.....	83
4.13.4	Transcrição Reversa (Confecção do cDNA)	84
4.13.5	PCR em Tempo Real no ABIPRism® 7000 Sequence Detection Systems (Applied Biosystems).....	85
4.13.6	Primers e Sondas	86
4.14	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).....	87
5	RESULTADOS	88
5.1	PARÂMETROS BIOMÉTRICOS	89

5.2	ANÁLISE SOROLÓGICA HEPÁTICA	92
5.3	ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA	94
5.4	MORFOMETRIA DO COLÁGENO	100
5.5	IMUNO-HISTOQUÍMICA – DETECÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR.....	103
5.6	IMUNOFLUORESCÊNCIA PARA COLÁGENO TIPO III	106
5.7	REAL TIME RT-PCR.....	108
5.7.1	Extração de RNA total pelo método de colunas.....	108
5.7.2	Análise da expressão gênica de Colágeno α1 (Tipo 1), TGFβ1 e MMP 2 e PLAU	110
5.8	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).....	117
6	DISCUSSÃO	119
6.1	PARÂMETROS BIOMÉTRICOS E IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA PCNA.....	121
6.2	ANÁLISES SOROLÓGICAS.....	124
6.3	AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA E MACROSCOPIA	124
6.4	QUANTIFICAÇÃO DO COLÁGENO	125
6.5	IMUNOFLUORESCÊNCIA PARA COLÁGENO TIPO III	126
6.6	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	127
6.7	AVALIAÇÃO GÊNICA.....	127
6.7.1	Expressão gênica de Colágeno Tipo I	128
6.7.2	Expressão gênica de TGFβ1	129
6.7.3	Expressão gênica de MMP 2.....	132
6.7.4	Expressão gênica de PLAU	133
6.8	A APLICAÇÃO DE FH VIA INTRAPERITONEAL	134
7	CONCLUSÕES.....	136
8	REFERÊNCIAS	139

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A primeira descrição da regeneração hepática ocorreu na mitologia Grega onde o grande Deus Zeus puniu o titã Prometeu por ter roubado de Olimpo o segredo do fogo e transmitindo-o aos mortais. Acorrentado no topo do monte Cáucaso, todo dia um abutre vinha comer parte do fígado de Prometeu. Entretanto, o órgão constantemente crescia durante a noite, para novamente ser parcialmente comido pelo abutre no dia seguinte, tornando eterno o tormento de Prometeu (GODOY et al., 2006).

A regeneração hepática representa um mecanismo de proteção orgânica contra perda de tecido hepático funcionante seja por injúria química, viral, perda traumática, ou por hepatectomia parcial (HP). Devido à enormidade de casos hepatológicos em animais (cirrose) e principalmente em humanos têm se dado muito crédito a pesquisas relacionadas com a regeneração e nutrição hepática (ZAKKO et al., 1996; ASSYS; MINUK, 1997).

Apesar de ser largamente utilizado, o termo “regeneração” é biologicamente incorreto, uma vez que a resposta induzida pelo dano tecidual hepático promove hiperplasia e hipertrofia compensatória do tecido remanescente, até o restabelecimento da massa hepática primitiva. No entanto, os lóbulos ressecados não são recuperados (PREEDY; PASKA, 1990; RAMALHO et al., 1993; LABRECQUE, 1994; FAUSTO et al., 1995; PARRA et al., 1995b; MICHALOPOULOS; DEFRANCES, 1997).

De todas as questões relacionadas aos mecanismos de regeneração hepática, a maior delas talvez seja como se desencadeia o processo regenerativo. Admite-se que a característica mais notável da regeneração hepática não seja como ela ocorre, mas o que a cessa mais precisamente quando a massa hepática original é restabelecida. Pouco se conhece acerca dos mecanismos que interrompem a regeneração. Com o conhecimento atual, talvez o fígado seja o órgão cujo controle da proliferação celular é mais bem compreendido.

O crescimento regenerativo do fígado vem sendo estudado, com detalhes, após a administração de tetracloreto de carbono ou após hepatectomia parcial em animais experimentais (principalmente ratos e camundongos); ou em humanos após ressecção parcial do fígado ou necrose hepática maciça. Embora mecanismos diferentes possam operar estas situações clínicas e experimentais distintas, o modelo mais utilizado para o estudo *in vivo* dos mecanismos de regulação do crescimento hepático é a regeneração hepática após hepatectomia parcial em ratos, conforme descrito por Higgins e Anderson (1931). A hepatectomia parcial consiste na ressecção dos lobos lateral esquerdo e mediano (lobos anteriores), os quais constituem aproximadamente 67% da massa hepática total. Os lobos lateral direito e caudato (lobos posteriores) correspondem respectivamente a 24 e 9% da massa hepática total (¹HIGGINS; ANDERSON, 1931: apud RAMALHO, 1998, p. 242; BUCHER, 1963; GERBER et al., 1983; KARRAN; EAGLES, 1983; ALISON, 1986; MICHALOPOULOS, 1990; RAMALHO, 1998).

Todas as células hepáticas (hepatócitos, células endoteliais, de Kupffer, de Ito e ductais) proliferam para substituir a perda de tecido hepático. No entanto, os hepatócitos são os primeiros a proliferar, sendo que a maioria dos estudos focalizam estas células por elas constituírem cerca de 90% da massa hepática e 60% do número total de células (RAMALHO et al., 1993; DIHEL; RAI, 1996; MICHALOPOULUS; DEFRANCES, 1997).

Nos últimos anos surgiram novos conhecimentos sobre os fatores envolvidos no processo de regeneração hepática, assim como o efeito específico de fatores de crescimento e nutrientes. Além dos processos intrínsecos que comandam e controlam a divisão celular e regeneração hepática, fatores extrínsecos também atuam no fígado, modificando ou acionando respostas proliferativas ou regenerativas, principalmente os de origem nutricional. A terapia nutricional é bem estabelecida em tratamentos com doenças hepáticas crônicas. O prognóstico de pacientes com doença hepática grave se correlaciona com a gravidade da desnutrição, e a suplementação alimentar pode melhorar o estado nutricional,

¹ HIGGINS, G. M. Experimental pathology of the liver. XII. Effects of feeding dessicated thyroid gland on restoration of the liver. **Archives of Pathology**, v. 16, p. 226-231, 1933.

imunológico e a função hepática desses pacientes. A nutrição enteral é a via mais fisiológica para suplementação nutricional com conhecimento do benefício dos efeitos tróficos ao intestino e fígado pelo efeito de primeira passagem dos nutrientes. Porém, em pacientes com doença hepática grave, há sempre ingestão oral insuficiente levando à anorexia e encefalopatia crônica. O fornecimento adequado de proteínas é importante para a correção da desnutrição protéica e auxilia a síntese protéica e a regeneração hepática. Desta maneira, a nutrição parenteral pode ser necessária para pacientes com doença hepática grave, especialmente naqueles com falência hepática aguda ou desnutrição grave ou no pré-operatório (NOMPLEGGI; BONKOVSKY, 1994; ROMBEAU; ROLANDELLI, 2004).

O objetivo do uso de soluções enriquecidas com aminoácidos é oferecer proteína suficiente para promover o balanço nitrogenado positivo. Estima-se que a necessidade de aminoácidos é o dobro do normal em pacientes com falência hepática, a qual representa o estado hipercatabólico. Em geral, pacientes (humanos) podem receber 1g de aminoácidos por quilo de peso corporal por dia; aos pacientes com carência protéica 1,5g/kg/dia pode ser administrado. Formulações com AACR (Aminoácidos de Cadeia Ramificada) são aceitas por muitos como suplemento aminoácido preferencial em pacientes com falência hepática, mas apesar da controvérsia estas se apresentam como padrão para as fórmulas de aminoácidos (FREUND et al., 1982; MARCHESINI et al., 1982; NOMPLEGGI; BONKOVSKY, 1994; ROMBEAU; ROLANDELLI, 2004).

Atualmente diversas pesquisas têm sido desenvolvidas para identificar qual seria o “gatilho” inicial para a resposta regenerativa. Muitos fatores de crescimento incluindo fator de crescimento do hepático (HGF), fator de crescimento epidérmico (EGF), fator transformador do crescimento (TGF), a insulina, o glucagon, e recentemente as citosinas, fator tumoral da necrose (TNF), a interleucina-1 (IL-1) e IL-2 têm sido aplicado regulando este processo, mas os mecanismos permanecem mal compreendido (TAUB, 2002).

O uso de soluções intravenosas enriquecidas com aminoácidos é um dos fundamentos nutricionais para o tratamento de doenças hepáticas, como a cirrose, ocorrente em humanos e em cães (SANTOS, 1986). Há um interesse especial na

nutrição hepática na clínica veterinária no que diz respeito aos cães, onde a hepatite crônica é encontrada frequentemente em muitas raças sendo percebida como uma doença frustrante pela inevitável progressão para cirrose e pobre prognóstico (WATSON, 2004).

Parra et al. (1992, 1994, 1995b, 1996) desenvolveram uma solução de fatores hepatotróficos exógenos, os FH, inicialmente com o objetivo de induzir o crescimento hepático sem a hepatectomia parcial em ratos. Os FH contêm a seguinte fórmula: aminoácidos, glicose, insulina, glucagon, triiodotironina (T_3) (Quadro 1).

Sabe-se que o expressivo aumento de massa hepática observado por Parra et al. (1992, 1994, 1995b, 1996) em seu tratamento por 10 dias de FH poderia ter várias aplicações, como estimular o crescimento do fígado antes ou depois do transplante entre vivos, acelerar o processo de regeneração hepática após hepatectomia parcial (COGLIATI et al., 2004; MIRANDA et al., 2005), ou mesmo diminuir o colágeno em fígados com fibrose ou cirróticos (PEREIRA et al., 2003; HERNANDEZ-BLAZQUEZ et al., 2005; GUERRA et al., 2009).

Portanto, com a finalidade de desvendar a cinética dos efeitos dos FH no tecido hepático, nesse trabalho foi verificado a ação dos FH ao longo de 12 dias de tratamento. Utilizou-se a mesma solução de FH adotada por Parra et al. (1992, 1994, 1995b, 1996), Pereira et al., (2003) e Guerra et al. (2009) na dose de 40 ml/kg/dia subdividido em duas doses de 20 ml/kg aplicadas a cada 12 horas por via intraperitoneal durante os 2, 4, 6, 8, 10 e 12 dias de tratamento, totalizando 7 grupos de animais incluindo o grupo controle. Avaliou-se o índice de proliferação dos hepatócitos, parâmetros bioquímicos (proteína total, AST, ALT, GGT e fosfatase alcalina, bilirrubina, albumina), alterações na expressão gênica (colágeno $\alpha 1$, MMP 2, TGF $\beta 1$ e PLA α) da matriz extracelular, modificações na arquitetura tecidual hepática e a redução do colágeno volumétrico do tecido hepático durante todo o período da aplicação.

Vários índices podem ser associados à regeneração e/ou proliferação hepática como o peso e volume do fígado, índice mitótico, quantidade de DNA, imuno-histoquímica para antígenos nucleares, expressão gênica ou quantidade de algumas proteínas do soro. Para tanto, utilizou-se técnicas de biologia molecular (Real Time RT-PCR), morfometria (colágeno), histológicas, imuno-histoquímicas (PCNA) e bioquímicas do fígado para o estudo dos efeitos na função hepática causados pelos fatores hepatotróficos ao longo do tratamento.

Por fim, esse trabalho tem o objetivo de desvendar mecanismos da cinética do tecido hepático respondendo à solução de fatores hepatotróficos, revelar sua importância clínica, aumentar as chances de tratamentos das injúrias hepáticas como a fibrose e a cirrose em humanos e cães (SANTOS, 1986; WATSON, 2004), transplantes de fígado e hepatectomias parciais onde o aumento do tecido hepático no fígado remanescente é um fator limitante na sobrevida do paciente.

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

Os objetivos desse trabalho estão descritos a seguir.

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a cinética do tratamento dos fatores hepatotróficos em fígados sadios ao longo das aplicações dos FH por 12 dias em ratas Wistar através da análise de picos de proliferação dos hepatócitos, da expressão gênica de genes que regulam a matriz extracelular, da função e histologia hepática.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar aspectos morfológicos do tecido hepático através técnicas histológicas durante todas as aplicações (2°, 4°, 6°, 8°, 10° e 12° dias de tratamento) dos FH.
- Quantificação do colágeno tipo I e III através da morfometria das técnicas de picrossírius e imunofluorescência durante todo o período das aplicações dos FH.
- Quantificar a proliferação celular por PCNA nos fígados durante todo o período das aplicações dos FH.
- Avaliar, pelo estudo das análises sorológicas (proteína total, AST, ALT, GGT e fosfatase alcalina, bilirrubina, albumina), se o tratamento altera os níveis

das enzimas hepáticas indicando hepatotoxicidade no sistema biliar ou hepatocitário ao longo das aplicações de FH.

- Avaliar a expressão gênica de componentes moduladores da matriz extracelular (Colágeno α I, MMP 2, TGF β 1 e PLAU) através de técnicas de biologia molecular (Real Time RT-PCR) durante os 12 dias de aplicação.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3 REVISÃO DE LITERATURA

Segue abaixo uma revisão de literatura do assunto abordado nessa tese.

3.1 O FÍGADO

O fígado é o maior órgão sólido do corpo, constituindo aproximadamente de 2% a 5% do peso do corpo de um homem adulto. Pode exercer até 100 funções diferentes, a maioria das quais é exercida pelos hepatócitos. Sua anatomia clássica distingue dois lobos principais, direito e esquerdo, e dois acessórios, quadrado e caudado. O órgão é dividido em setores e segmentos com independentes suprimento sangüíneo e biliar aferente e eferente sem circulação colateral entre os segmentos. A maior função do fígado envolve a degradação de aminoácidos, carboidratos, lipídios, e vitaminas e seu subsequente estoque, conversão metabólica, e liberação para o sangue e bile. A bile desempenha um importante papel na digestão de lipídios. Todavia, muitas das funções do fígado estão inter-relacionadas, o que se torna particularmente evidente quando surge anormalidades do fígado, visto que muitas de suas funções são afetadas simultaneamente (ROUILLER, 1964; GUYTON, 2002; GARTNER; HIAT, 2003; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

3.2 HEPATÓCITOS

O fígado é constituído principalmente por células hepáticas. O hepatócito é a célula mais multifuncional do organismo, de forma poliédrica com 6 ou mais faces e medem de 20 a 30 µm de diâmetro. Esta célula apresenta um núcleo central, arredondado, com um ou dois nucléolos bem evidentes. Os retículos endoplasmáticos são bem evidentes. Possui funções glandulares endócrinas e exócrinas e, além de sintetizar e acumular vários compostos, neutraliza outros e transporta corantes do sangue para

a bile. Após as refeições, os hepatócitos convertem o excesso de glicose a glicogênio. Eles desempenham inúmeras funções metabólicas úteis, como a utilização de lipídios para a síntese de lipoproteínas, a degradação de hormônios esteróides e a destoxificação de medicamentos e toxinas. Essas células epiteliais se agrupam em placas que se anastomosam entre si formando unidades morfológicas, os lóbulos hepáticos. Cada lóbulo é uma massa poliédrica de tecido hepático de mais ou menos 0,7 por 2 mm de tamanho. As regiões nos cantos dos poliedros são denominadas espaços porta, compostos por 1 vênula, 1 arteríola, 1 ducto biliar e vasos linfáticos. Nos lóbulos os hepatócitos se dispõem em cordões orientados radialmente. Os cordões são constituídas por células dispostas em uma só camada que são perfuradas e, frequentemente, anastomosam-se, resultando num labirinto complexo, que dá ao lóbulo hepático um aspecto esponjoso (ROUILLER, 1964; GUYTON, 2002; GARTNER; HIAT, 2003; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

3.3 SINUSÓIDES HEPÁTICOS

O espaço que fica entre os cordões de células hepáticas são os chamados sinusóides, ou seja, capilares hepáticos de paredes revestidas por células endoteliais típicas dos capilares sanguíneos. O capilar sinusóide apresenta-se envolto por um delicado arcabouço de fibras reticulares e neles desembocam ramos capilares terminais da artéria hepática que trazem oxigênio para o parênquima hepático. Os capilares sinusóides desembocam na veia centrolobular, no centro do lóbulo e medem entre 10 e 30 μm de diâmetro. Seu endotélio é fenestrado e se assenta sobre uma membrana basal descontínua. Além disso, a junção entre as células endoteliais contíguas é incompleta e há separações de 0,1 a 0,5 μm . Os sinusóides hepáticos se diferenciam dos outros sinusóides do organismo porque entre suas células endoteliais estão intercalados macrófagos conhecidos como células de Kupffer (GUYTON; HALL, 2002; CORMACK, 2003; GARTNER; HIAT, 2003; HIB, 2003; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

3.4 CÉLULAS DE KUPFFER

As células de Kupffer possuem núcleo oval, grande, e nucléolo evidente. Estão localizadas na parede dos sinusóides e apresentam intensa atividade fagocitária, pertencendo ao sistema mononuclear fagocitário. São responsáveis por fagocitose de hemácias em via de desintegração com a consequente digestão de hemoglobina e produção de bilirrubina. Apresentam também grande quantidade de lisossomas que contém no seu interior as enzimas necessárias para a digestão intracelular. Essas células reconhecem e endocitam pelo menos 99% dos microorganismos do sangue da veia porta (GUYTON, 2002; CORMACK, 2003; GARTNER; HIAT, 2003; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

3.5 CÉLULAS ESTRELADAS

No estreito espaço que separa a parede dos capilares sinusóides aos hepatócitos se encontra o espaço de Disse, que contém células armazenadoras de lipídios, com forma estrelada. São as células estreladas hepáticas (ou células de Ito) que armazenam vitamina A em suas gotículas lipídicas. Em resposta a lesão hepática, estas células perissinusoidais que contém gorduras podem proliferar, tornam-se contráteis e produzem fibras colágenas. Elas desempenham um papel principal na extensa fibrose com progressiva ruptura do parênquima que caracteriza a cirrose, doença hepática potencialmente fatal (do grego *kirrhos*, marrom-alaranjado; *ōsis*, condição) (GUYTON, 2002; CORMACK, 2003; GARTNER; HIAT, 2003; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

3.6 VASCULARIZAÇÃO E DRENAGEM LINFÁTICA

O fígado recebe sangue pela veia porta (70%) e uma porção menor pelas artérias hepáticas. Pela veia porta chega ao fígado todo material absorvido pelo intestino,

com exceção dos lipídios que é transportado por via linfática. Os espaços de Disse conectam-se com os vasos linfáticos nos septos interlobulares, por conseguinte, o excesso de líquido nesses espaços é removido por esses vasos (GUYTON, 2002; CORMACK, 2003; GARTNER; HIAT, 2003; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

3.7 BILE

A bile secretada pelos hepatócitos circula pelos canalículos biliares até a periferia do lóbulo hepático. Quando chega à periferia do lóbulo, a bile ingressa em ductos excretores curtos, conhecidos como ductos (ou canais) de Hering. Estes desembocam em ductos maiores, chamados ductos biliares perilobulares, os quais – do mesmo modo que as arteríolas e as vênulas terminais – se dispõem entre as faces laterais dos lóbulos. Após atravessar a lâmina terminal dos espaços porta, os ductos biliares perilobulares desembocam perpendicularmente nos ductos biliares interlobulares destes espaços (HIB, 2003).

3.8 REGENERAÇÃO HEPÁTICA E FATORES HEPATOTRÓFICOS

A menção mais antiga sobre regeneração hepática encontra-se na mitologia grega. Na peça de teatro Prometeu Acorrentado de Ésquilo, o titã Prometeu rouba do Olimpo o segredo do fogo e transmite-o aos mortais. Os mortais aprendem a fazer fogo, e Prometeu, punido por Zeus é acorrentado em um rochedo no monte Cáucaso. Todo dia, um abutre vinha comer parte de seu fígado. À noite, o fígado de Prometeu regenerava, para ser novamente parcialmente comido pelo abutre no dia seguinte. Assim, o tormento de Prometeu foi eterno (GODOY et al., 2006).

O termo regeneração, embora comumente usado, é biologicamente incorreto, uma vez que a resposta induzida pela ressecção no tecido hepático não é verdadeiramente regenerativa. Os lobos ressecados não são recuperados. A restauração da massa hepática ocorre por hiperplasia celular compensatória nos

lobos remanescentes, com consequente aumento em suas dimensões. Isso sugere que o crescimento hepático seja controlado por fatores funcionais ao invés de fatores anatômicos. Qualquer que seja a natureza destes fatores, eles parecem ser bastante precisos, uma vez que o crescimento cessa quando o fígado atinge seu peso original (variações de 5 a 10%). A proliferação dos hepatócitos não se torna desregulada ou autônoma, nem mesmo após ressecções consecutivas. O processo de regeneração hepática é regulado pela ação de vários mecanismos moleculares que agem em uma sequência de tempo característica. Na década de 1960 pesquisadores observaram completa restauração da massa hepática após uma série de 5 hepatectomias sucessivas, com intervalos de 5-7 semanas. Após a primeira hepatectomia parcial a regeneração ocorreu às custas de aumento no número e no tamanho dos lóbulos hepatócitos; enquanto que após as hepatectomias subsequentes houve progressivo predomínio de aumento do número de lóbulos hepáticos (SIMPSON; FINCKH, 1963; FAUSTO, 1990; RAMALHO, 1998; ZIMMERMANN, 2004).

Em 1909, Milne percebeu que qualquer alteração patológica ou experimental, levando a destruição de hepatócitos, era capaz de desencadear o processo de proliferação hepatocelular. Em 1920, Rous e Larimore reportaram o aumento de volume dos lobos hepáticos não submetidos à ligadura, enquanto o restante do fígado era privado do suprimento portal. A regeneração hepática é reconhecida como um espetacular exemplo de crescimento tecidual ordenado e organizado. Pode ser induzida, experimentalmente, por qualquer tratamento agudo, cirúrgico ou químico, o qual remova ou destrua um grande percentual do parênquima hepático. A perda do parênquima rapidamente desencadeia o processo regenerativo até que a massa hepática seja restaurada (¹MILNE, 1909: apud RAMALHO, 1998, p. 242; ROUS; LARIMORE, 1920; MICHALOPOULOS, 1990; RAMALHO, 1998).

Embora todas as células hepáticas participem do processo regenerativo, a maioria dos estudos focaliza Nos hepatócitos. Eles constituem cerca de 90% da massa hepática e 60% do número total de células. As células endoteliais e as células de

¹ MILNE, L. S. The histology of liver tissue regeneration. **Journal of Pathology and Bacteriology**, v. 13, p. 127-160, 1909.

Kupffer constituem 35% da população celular hepática e 5-10% da massa hepática total (WRIGHT; ALISON, 1984; ALISON, 1986; RAMALHO, 1998).

O fígado apresenta uma espetacular capacidade de regeneração quando há perda de tecido hepático. Em ratos a remoção de 75% do parênquima hepático provoca um processo de regeneração, que se completa em apenas um mês. Admite-se que a produção de colona diminua quando um tecido é lesado ou removido parcialmente, com consequente aumento da atividade mitótica. Isso se deve ao fato de as colonas agirem inibindo a atividade mitótica. As provas apresentadas sugerem que esse mecanismo ocorre em vários tecidos e que se trata provavelmente de um fenômeno geral onde o tecido hepático regenerado seja igual ao preexistente. Porém, se a lesão for contínua ou se repetir com frequência, simultaneamente à regeneração, ocorre um considerável aumento de tecido conjuntivo. Essa produção exagerada de conjuntivo desorganiza a regeneração, levando o fígado a um processo patológico grave chamado cirrose, que prejudica todas as funções hepáticas. A morte dos hepatócitos é seguida pela cicatrização e embora os hepatócitos possam se regenerar e produzir uma nova população de células, suas conexões com o sistema porta e drenagem biliar são destruídas, padrão este conhecido como cirrose (STEVENS; LOWE, 2001; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

Os hepatócitos são células de natureza epitelial vivendo aproximadamente 150 dias; portanto é rara a presença de figuras mitóticas. Entretanto, quando drogas hepatotóxicas são administradas, ou uma parte do fígado é removida, os hepatócitos proliferam e o fígado regenera sua arquitetura normal e seu tamanho anterior. A capacidade de regeneração do fígado do homem é muito menor do que de camundongos e ratos. O mecanismo de regeneração é controlado pelo fator de transformação de crescimento α e fator β de transformação de crescimento, fator de crescimento da epiderme, interleucina-6 e fator de crescimento dos hepatócitos. Muitos desses fatores são liberados pelas células estreladas armazenadoras de gordura (células de Ito) situadas no espaço de Disse, embora, também exista fator de crescimento dos hepatócitos ligado à heparina na escassa matriz extracelular do fígado. Na maioria dos casos, a capacidade de replicação dos hepatócitos restantes é responsável pela regeneração em ratos; entretanto, quando a lesão hepatotóxica é demasiadamente grande, a regeneração do fígado ocorre pela atividade mitótica das

células ovais dos colangíolos e dos canais de Hering (RAMALHO et al., 1993; RAMALHO, 1998; GARTNER; HIAT, 2003).

O clássico modelo de regeneração hepática é aquele em que a hepatectomia parcial ocorre com remoção de 70% do fígado. A sobrevivência dos lóbulos aumenta e reconstitui tamanho original do fígado. Modelos alternativos também vêm sendo estudados como hepatectomia hepática seguida de vagotomia do ramo hepático com a finalidade de se observar a regulação autônoma da regeneração no fígado (ANKOMA-SEY, 1999; IKEDA et al., 2009).

A regeneração hepática depois da hepatectomia parcial nos ratos ocorre de 5 a 7 dias. O potencial regenerativo do fígado no momento em que há eventual restauração completa do tamanho normal do fígado depois da hepatectomia tem sido demonstrado na maioria dos animais e humanos. Destas observações, é geralmente aceita que a regeneração hepática é um fenômeno bem administrado, regulado por extraordinários sinais do organismo que exercem efeitos modulatórios (positivos ou negativos) no fígado até que seu tamanho ótimo seja alcançado (ANKOMA-SEY, 1999).

Após a hepatectomia parcial a regeneração do fígado é mediada pela proliferação de células maduras do fígado que restauram o tecido hepático perdido. Nestas células do fígado incluem hepatócitos, células endoteliais, células epiteliais biliares, células estreladas hepáticas e células de Kupffer. Ao contrário das outras regenerações de tecido semelhante a da pele ou medula óssea, no fígado, as células progenitoras ou as células tronco não contam muito com a capacidade regenerativa sendo os hepatócitos as principais células responsáveis. Das células do fígado, os hepatócitos são as primeiras a proliferar e são as de maior importância para a regeneração parenquimal. O fígado adulto exibe uma mínima capacidade replicativa, com mitoses observadas de aproximadamente 1 a cada 20.000 hepatócitos. Depois da perda de massa hepática ou em alguma lesão parenquimatosa, os hepatócitos entram no ciclo celular. Para um estado pré-replicativo, que é seguido pela síntese de DNA e mitose com a divisão celular completando a sequência. A fase pré-replicativa do ciclo pode ser dividida em dois

componentes, um estágio “*priming*” e um estágio “*progression*” (ANKOMA-SEY, 1999).

Não obstante várias décadas de estudo, os fatores reguladores que desencadeiam e/ou modulam o fenômeno regenerativo hepático estão sendo apenas inicialmente compreendidos. Muito progresso foi obtido na elucidação dos mecanismos envolvidos neste fenômeno através do estudo do crescimento controlado de hepatócitos em meios de cultura e das alterações no padrão da expressão gênica após a hepatectomia parcial. Os efeitos dos fatores hepatotróficos na síntese de DNA têm sido geralmente estudados *in vitro*, em culturas de hepatócitos; e *in vivo*, em animais normais ou parcialmente hepatectomizados. Em culturas de hepatócitos, geralmente os fatores são testados não por seu efeito direto na síntese de DNA, mas principalmente por sua habilidade em elevar ou inibir a replicação de DNA induzida pelo EGF (FAUSTO, 1990; MICHALOPOULOS, 1990; RAMALHO, 1998).

A pesquisa de fatores de crescimento na regeneração hepática deve levar em conta os seguintes aspectos:

- Nenhum fator único é suficiente para regular todo processo regenerativo: fatores positivos e negativos podem estimular e inibir a proliferação de hepatócitos. A relação entre estes fatores pode ser mais importante que seus níveis absolutos.
- O local de síntese destes fatores pode ser o fígado ou outros tecidos. No fígado, tanto células parenquimatosas como não parenquimatosas pode originar estes fatores.
- A presença de fatores de crescimento hepático no soro de animais parcialmente hepatectomizados não necessariamente implica que tais fatores sejam responsáveis pelo desencadeamento do processo regenerativo (FAUSTO et al., 1987; BRAUN et al., 1988; LEFFERT et al., 1988; FAUSTO; MEAD, 1989; RAMALHO, 1998).

A resposta celular aos vários fatores de crescimento exige a presença de receptores específicos na membrana plasmática dos hepatócitos. Após a interação do fator de

crescimento ao seu receptor na superfície celular, uma complexa cascata de eventos se sucede (RAMALHO, 1998).

3.8.1 Tipos de Fatores de Crescimento do Fígado

Como fatores de crescimento hepático pode-se incluir um grande número de substâncias parcialmente caracterizadas, assim como diversos fatores amplamente conhecidos. Os fatores de crescimento já bem conhecidos podem ser subdivididos em 3 categorias (RAMALHO et al., 1993; RAMALHO, 1998):

- Agentes mitogênicos ou indutores do crescimento.
- Agentes co-mitogênicos.
- Agentes inibidores do crescimento.

3.8.1.1 Agentes mitogênicos

São substâncias capazes de, por elas próprias, em meios de cultura isentos de soro ou de qualquer outro fator mitogênico, induzir síntese de DNA e mitose numa população de hepatócitos em repouso - *fase G0* (MICHALOPOULOS, 1990; RAMALHO, 1998; ANKOMA-SEY, 1999).

3.8.1.1.1 Fator de Crescimento Epidérmico (EGF – Epidermal Growth Factor)

É o protótipo de um fator mitogênico, que estimula a síntese de DNA na maioria das células epiteliais, inclusive em hepatócitos. Foi a primeira substância em que este efeito foi confirmado, sendo o hormônio mais frequentemente usado para induzir a síntese de DNA em cultura de hepatócitos. Induz a incorporação de timidina tritiada por 60-80% dos hepatócitos em meio de cultura. É potencializado pela insulina e

pelo glucagon, *in vitro* e *in vivo*. Seu efeito sobre a síntese de DNA é utilizado como modelo, contra o qual é comparada a atividade de outros fatores de crescimento hepático. O EGF é produzido nas glândulas salivares, glândulas de Brunner do duodeno, rins e pâncreas. A ressecção das glândulas de Brunner resulta em redução do processo regenerativo, enquanto a sialoadenectomia não alterou a regeneração (MCGOWAN et al., 1981; HILAIRE; JONES, 1982; OLSEN et al., 1988; MARTI et al., 1989; GUPTA, 1992; RAMALHO, 1998;).

3.8.1.1.2 Fator Transformador do Crescimento-alfa (TGF α – Transforming Growth Factor- α)

Descrito originalmente como um fator produzido por células tumorais, o TGF α é também sintetizado por tecidos normais *in vivo* e por células em cultura. Visto que o TGF α e EGF atuam sobre o mesmo receptor, não é surpreendente que o TGF α seja também mitogênico para hepatócitos, sendo equipotentes em sua capacidade de estimular a proliferação de hepatócitos *in vitro*. São peptídeos semelhantes, apresentando homologia em cerca de 30-40% de sua estrutura aminoacídica. A atividade mitogênica do α TGF é inibida pelo TGF β (LUETTEKE et al., 1988; BRENNER et al., 1989; MEAD; FAUSTO 1989; PANDIELLA, 1991; RAMALHO, 1998).

É sintetizado por hepatócitos em regeneração, mas não por células não parenquimatosas, observando-se elevação nos níveis do RNAm para TGF α nas primeiras 4-5 horas após a hepatectomia parcial, com um pico (cerca de 10 vezes o normal) 24 horas após a cirurgia. Os níveis de TGF α se elevam em oito horas com um pico após 24 e outro em 72 horas no pós-operatório. Em cultura de hepatócitos, também se verifica elevação dos níveis do RNAm e da secreção de TGF α durante a síntese de DNA (MEAD; FAUSTO 1989; RAMALHO, 1998).

A secreção de TGF α por hepatócitos em regeneração possivelmente se constitui uma alça autócrina estimuladora da síntese de DNA. Nesse sentido, a produção de TGF α não seria responsável pelo desencadeamento do processo regenerativo, mas

corresponderia a um passo fundamental em direção à síntese de DNA, no qual o TGF α atuaria sobre um hepatócito já deixou o estado de repouso (fase G0) e está adentrado no ciclo celular (fase G1) (MICHALOPOULOS, 1990; RAMALHO, 1998).

A produção de TGF α por hepatócitos pode também representar uma alça de regulação parácrina, estimulando a proliferação das células não parenquimatosas adjacentes (MICHALOPOULOS, 1990; RAMALHO, 1998).

3.8.1.1.3 Fator de Crescimento Hepático (HGF – Hepatocyte Growth Factor)

É o mais importante mitógeno para hepatócitos normais. É mitogênico em cultura de hepatócitos humanos e de ratos. Seu efeito é inibido pela somatostatina, parcialmente inibido pela heparina e exacerbado pela norepinefrina. Glicocorticóides e TGF β reduzem a secreção de HGF. O receptor para o HGF é codificado pelo proto-oncogene c-met, qual é diferente do receptor para o EGF (MICHALOPOULOS et al., 1984; ZARNEGAR; MICHALOPOULOS; 1989; LINDROOS et al., 1991; MICHALOPOULOS; ZARNEGAR; 1992; RAMALHO, 1998).

O HGF é produzido por células não parenquimatosas, não sendo encontrado em hepatócitos de fígados normais ou em regeneração. O principal tipo celular produtor é a célula de Ito. Conhecidas como células estreladas perissinusoidais, as células de Ito estão envolvidas na regulação da matriz hepática e síntese de uma série de fatores de crescimento, entre as quais HGF, aFGF e TGF β . Sua presença em vários tecidos envolvidos na circulação portal sugere que o efeito trófico para o fígado pode ser exibido pelo HGF oriundo de sítios extra-hepáticos. O HGF induz a síntese de DNA em hepatócitos quando injetado na veia porta de cães (FRANCAVILLA et al., 1991c; GUPTA, 1992; MICHALOPOULOS; ZARNEGAR, 1992; RAMALHO, 1998).

Os níveis plasmáticos de HGF elevam mais de 20 vezes dentro de uma hora depois da hepatectomia parcial em ratos e em humanos e isso faz dele o principal candidato à função de desencadeador do processo regenerativo após a cirurgia. Sua elevação em uma hora é condizente com as alterações na expressão gênica, detectadas 30

minutos após a cirurgia. O mecanismo para essa indução extra-hepática do RNAm do HGF é desconhecido. O HGF exerce um efeito mitogênico nos hepatócitos de maneira parácrina e endócrina (MICHALOPOULOS; ZARNEGAR, 1992; RAMALHO, 1998; ANKOMA-SEY, 1999;).

3.8.1.1.4 Fator de Crescimento de Fibroblastos Ácidos (aFGF – acidic Fibroblast Growth Factor)

Também chamado de Fator de Crescimento Ligante à Heparina 1 (“Heparin Binding Growth Factor 1”), é secretado por hepatócitos em regeneração, com pico de secreção coincidindo com o pico de síntese de DNA. Estimula a síntese de DNA em hepatócitos; parecendo, entretanto atuar em populações específicas de hepatócitos, visto que apenas metade das células responde ao aFGF. Sua produção persiste por 7 dias após a hepatectomia parcial. É também produzido por células não parenquimatosas no fígado (células ovas e células de Ito) (KAN et al., 1989; MARSDEN et al., 1992; RAMALHO, 1998).

O aFGF reduz o efeito inibitório do TGF β sobre a mitogênese induzida pelo EGF. Ao se comparar com o EGF, verifica-se que sua atividade mitogênica é consideravelmente menor. A heparina potencializa a atividade biológica do aFGF (KAN et al., 1989; GUPTA, 1992; RAMALHO, 1998).

3.8.1.2 Agentes Co-Mitogênicos

Este grupo é composto por substâncias que estimulam a proliferação do hepatócito de uma maneira indireta. Apresentam as seguintes propriedades (RAMALHO et al., 1993; RAMALHO, 1998; ANKOMA-SEY, 1999):

- potencializam o efeito mitogênico dos indutores do crescimento (por exemplo EGF, HGF, TGF α);

- reduzem o efeito inibitório de agentes inibidores;
- não possuem efeito mitogênico quando isoladamente adicionados em meios de cultura.

3.8.1.2.1 Substância Estimuladora Hepática (HSS – Hepatic Stimulatory Substance)

Isolada originalmente de fígado de ratos recém-desmamados, existem ainda controvérsias acerca da purificação e caracterização da HSS. Substâncias similares foram isoladas de fígados de cães, de porcos e do fígado fetal humano. Uma peculiaridade do HSS é sua aparente especificidade para o fígado, tanto *in vivo* como *in vitro* (LABRECQUE; PESCH, 1975; LABRECQUE, 1991; GUPTA, 1992; RAMALHO, 1998).

In vitro, embora diversos autores tenham reportado efeito mitogênico da HSS para hepatócitos em cultura, foi demonstrado a necessidade da adição de EGF à cultura de hepatócitos para o desencadeamento da resposta proliferativa. A adição simultânea do HSS e EGF à cultura de hepatócitos leva a um enorme incremento na síntese hepatocelular de DNA quando se compara ao efeito isolado do EGF (FLEIG; HOSS, 1989; RAMALHO, 1998).

In vivo, sua capacidade de estimular a síntese de DNA torna-se detectável a partir de 12 horas após a hepatectomia parcial, atinge o pico em 26 horas após a cirurgia (quando a síntese de DNA é 4 vezes mais intensa), e persiste por cerca de 72 horas, sendo indetectável após 8 dias (LABRECQUE; PESCH, 1975; LABRECQUE, 1991; RAMALHO, 1998).

3.8.1.2.2 Norepinefrina e Receptor α_1 Adrenérgico

É um receptor essencial durante as fases iniciais da regeneração hepática. Seu bloqueio com prazosin abole o pico de síntese de DNA observado 24 horas após a

hepatectomia parcial. Efeitos semelhantes foram obtidos com fígados desnervados. A administração de β -bloqueadores (propanolol) também deprime o pico de síntese de DNA após a hepatectomia parcial (MACMANUS et al., 1973; CRUISE et al., 1985; CRUISE et al., 1987; RAMALHO, 1998).

Em cultura de hepatócitos, a norepinefrina possui suas propriedades mediadas pelo receptor α_1 adrenérgico: não é mitogênica sozinha, exacerba o potencial mitogênico do EGF; e é capaz de reduzir o efeito inibitório do TGF β (CRUISE et al., 1986; HOUCK; MICHALOPOULOS, 1989; RAMALHO, 1998).

O receptor α_1 adrenérgico é o principal regulador da via glicogenolítica. Sua estimulação desencadeia a quebra do fosfatidil inositol, com aumento dos níveis citoplasmáticos de diacilglicerol e inositol trifosfato. Estas moléculas medeiam uma cascata de eventos intracelulares de cálcio. Quando os hepatócitos em regeneração são mais sensíveis à norepinefrina (cerca de 10 a 20 horas após a hepatectomia parcial), o receptor α_1 adrenérgico ainda não está acoplado a via do fosfatidil inositol (CRUISE et al., 1988; EXTON, 1988; RAMALHO, 1998).

3.8.1.2.3 Vasopressina e Angiotensinas II e III

Em linhagens de ratos congenitamente deficientes em vasopressina, a regeneração hepática encontra-se atenuada, sendo restabelecida após infusão do hormônio (RUSSELL et al., 1983; RAMALHO, 1998).

A vasopressina é secretada em sinapses simpáticas no fígado juntamente com a norepinefrina. Portanto, ambas as substâncias podem estar envolvidas nos efeitos do sistema simpático sobre a regeneração hepática (MICHALOPOULOS, 1990; RAMALHO, 1998).

3.8.1.2.4 *Insulina e Glucagon*

A insulina e o glucagon são hormônios importantes para o trofismo e metabolismo dos hepatócitos. O glucagon estimula a síntese de proteínas hepáticas e atua sinergicamente com a insulina na regeneração hepática. A ausência de insulina provoca a degeneração e a morte destas células em meio de cultura. Na presença de uma relativa deficiência de insulina hepática, o fígado atrofia. Porém, injeções de insulina têm mostrado a reversão ou prevenção da atrofia hepática sob estas condições (ANKOMA-SEY, 1999; JESUS et al., 2000).

Estudos dos fatores hormonais envolvidos na regeneração do fígado mostram que a elevação da síntese de DNA, pequena com o EGF sozinho, é aumentada pela adição de glucagon ou insulina. A Ação do EGF também está envolvida pela incorporação de timidina. Esses dois hormônios, embora potentes promotores, falham na iniciação da proliferação dos hepatócitos nos animais com fígado sadio, o que sugere a necessidade de adicionar fatores, provavelmente derivados de órgãos esplênicos não-portal (BUCHER et al., 1977).

A insulina, glucagon, e EGF são prováveis reguladores da regeneração hepática em animais. Evidências substanciais sugerem que pelo menos 6 substâncias estão envolvidas no controle da regeneração hepática nos animais. Estas evidências surgiram das investigações dos modelos de regeneração hepática usando animais sadios, frequentemente com confirmação no sistema de cultura de hepatócitos. Insulina, glucagon e EGF têm recebido a maioria dos estudos nesta consideração. Estudos já demonstraram que o sangue venoso portal é necessário para a manutenção do tamanho do fígado e para uma regeneração normal em resposta à ressecção hepática. Estudos sugerem que fatores humorais no sangue portal, possivelmente a insulina e o glucagon, podem ser importantes na regulação da regeneração hepática, mas tal estudo não exclui a possibilidade de outras substâncias poderem estar envolvidas neste processo. O glucagon, como a insulina, tem pouco efeito sozinho, mas, além disso, aumenta a resposta da mistura da insulina com o EGF (MCGOWAN et al., 1981; BAKER, 1985).

A síntese hepatocelular de DNA após a hepatectomia parcial pode ser inibida pela infusão de anticorpos anti-insulina. A evisceração e a pancreatectomia resultam em severa redução da síntese de DNA após a hepatectomia parcial, e a administração de insulina e glucagon revertem completamente este efeito. O trofismo hepático está bem reduzido em animais com diabetes induzidos pela aloxana. A concentração de insulina na veia porta diminui rapidamente após a hepatectomia parcial, enquanto os níveis de glucagon aumentam (BUCHER; SWAFFIELD, 1975; BUCHER et al., 1978; STARZL et al., 1978; CASTRO E SILVA et al., 1987; RAMALHO, 1998).

Não obstante as fortes evidências de que a insulina e o glucagon exerçam papel permissivo para a síntese hepatocelular de DNA e para o processo regenerativo hepático, não há evidências de que estas substâncias apresentem qualquer efeito mitogênico sobre o fígado (MICHALOPOULUS, 1990; RAMALHO, 1998).

3.8.1.2.5 Estrógenos e Progesterona

Evidências substanciais admitem a influência dos estrógenos na regeneração hepática. Após a hepatectomia parcial, seus níveis séricos encontram-se elevados, atingindo um pico de 24 a 48 horas. Os receptores estrogênicos encontram-se aumentados após a cirurgia, assim como o tempo de retenção nuclear dos mesmos, ao contrário, os níveis de testosterona estão reduzidos assim como os receptores nucleares para andrógenos. O tamoxifen bloqueia a síntese hepática de DNA se oferecido precocemente no pós-operatório (FRANCAVILLA et al., 1986; FRANCAVILLA et al., 1989a,b; RAMALHO, 1998).

Os estrógenos induzem o incremento na mitogênese quando adicionados a cultura de hepatócitos contendo EGF ou soro. Em animais sadios, o etinilestradiol atua como promotor de carcinogênese hepática (FRANCAVILLA et al., 1989b; SHI; YAGER, 1989; RAMALHO, 1998;).

Em homens, os níveis séricos de estradiol elevam-se rapidamente, com um pico 48 horas após a ressecção hepática, enquanto os níveis de testosterona diminuem, no

entanto, nenhuma alteração significativa foi observada nos níveis de estradiol e testosterona em mulheres (SVANAS et al., 1989; FRANCAVILLA et al., 1989a; RAMALHO, 1998).

3.8.1.2.6 Agentes Imunossupressores

Trabalhos recentes evidenciaram que a ciclosporina e a FK506, dois potentes imunossupressores, são capazes de estimular a proliferação hepatocelular em ratos submetidos à hepatectomia parcial. Resultados semelhantes foram obtidos em cães. Ao contrário dos experimentos *in vivo* a adição de ciclosporina e FK506 à cultura de hepatócitos não resultou em qualquer efeito sobre a replicação celular (FRANCAVILLA et al., 1991a,b; RAMALHO, 1998).

O efeito destas substâncias é mediado por sua interação a uma nova família de proteínas citossólicas denominadas imunofilinas, as quais são específicas para cada agente imunossupressor (FRANCAVILLA et al., 1993; RAMALHO, 1998).

O papel dos imunossupressores na regeneração hepática vem sendo confirmado por outra série de experimentos utilizando rapamicina. Estruturalmente similar e possuindo a mesma proteína citosólica de ligação que a FK506, a rapamicina tem efeito negativo sobre a proliferação hepática. Inibe a replicação dos hepatócitos em meios de cultura, a síntese de DNA e a proliferação hepatocelular após a hepatectomia parcial, e ainda a síntese de DNA no intestino delgado remanescente após nefrectomia unilateral; (FRANCAVILLA et al., 1991b; RAMALHO, 1998).

Estes resultados indicam que as imunofilinas podem influenciar na regeneração hepática tanto de forma estimulatória quanto inibitória. Indicam ainda uma possível existência de substâncias endógenas análogas à ciclosporina, FK506 e rapamicina, as quais podem constituir um elo de ligação entre o sistema imune e o sistema de controle do crescimento celular (FRANCAVILLA et al., 1993; RAMALHO, 1998).

3.8.1.2.7 Prostaglandinas

A adição de ácido araquidônico ou prostaglandinas a cultura de hepatócitos induz aumento na síntese de DNA. Semelhantemente, o tratamento de animais cirróticos com prostaglandina E₂ (PGE₂) aumenta a síntese hepática de DNA 24 horas após a hepatectomia parcial. Foi demonstrado recentemente que células de Kupffer de fígados em regeneração possuem elevada capacidade de secreção de PGE₂. O aumento na secreção de PGE₂ por células de Kupffer ocorre precocemente e persiste por até 48 horas após a cirurgia (ADDREIS et al., 1981; CALLERY et al., 1990; URAKAWA et al., 1990; RAMALHO, 1998;).

Observou-se, ainda, a inibição da síntese de DNA por drogas bloqueadoras da síntese de prostaglandinas, por exemplo, a indometacina, sugerindo importante participação das prostaglandinas no processo regenerativo hepático. Entretanto, o mecanismo pelo qual as prostaglandinas influenciam a regeneração hepática ainda não está claro (KWON, 1990; RAMALHO, 1998).

3.8.1.3 Agentes Inibidores do Crescimento

Estas substâncias foram definidas em culturas primárias de hepatócitos, baseado em suas capacidades em inibir a mitogênese induzida pelo EGF.

3.8.1.3.1 Fator Transformador do Crescimento – beta (TGFβ – Transforming Growth Factor-β)

Está associado a uma série de funções *in vivo*, incluindo a de induzir a proliferação de células mesenquimais e de participar do processo de cicatrização de feridas. Em células epiteliais, incluindo hepatócitos, o TGFβ é, ao contrário, um potente inibidor do crescimento. Em cultura de hepatócitos, inibe a mitogênese induzida pelo EGF,

pelo TGF α e pelo HGF. Existem fortes evidências de que seja inibidor da síntese de DNA na regeneração hepática *in vivo*. A injeção de TGF β , antes e após a hepatectomia parcial, inibe o pico de síntese de DNA que ocorre 24 horas após a cirurgia. Se utilizado em doses elevadas, a síntese de DNA é completamente inibida. O mecanismo pelo qual exerce seu efeito inibitório é ainda desconhecido (GOUSTIN et al., 1986; RUSSEL et al., 1988; SPORN, 1988; FAUSTO, 1991; RAMALHO, 1998).

O RNAm do TGF β é encontrado nas células de Ito e em células endoteliais, mas não em hepatócitos de fígados em regeneração ou de fígados normais. Isto sugere que o TGF β funcione como um efetor de um circuito inibitório parácrino. Este circuito estaria ativado durante regeneração hepática, talvez para prevenir uma proliferação incontrolada dos hepatócitos (BRAUN et al., 1988; FAUSTO; MEAD 1989; RAMALHO, 1998).

3.8.1.3.2 Interleucina 1 β

É capaz de inibir a proliferação de hepatócitos. O grau de inibição da síntese de DNA não é completa como no caso do TGF β , permanecendo um nível residual de cerca de 20% de síntese (NAKAMURA et al., 1988; RAMALHO, 1998).

Menor capacidade inibitória foi também observada com Interleucina 6 (IL-6). Esta molécula é conhecida por sua intensa atividade no fígado, redirecionando a síntese protéica em direção a síntese de proteínas da fase aguda. Seu efeito na síntese de DNA reflete um reprogramamento “orquestrado” na expressão gênica, no qual a síntese de proteínas da fase aguda passa a preceder os processos de síntese que conduzem à replicação do hepatócito. A interleucina 6 parece ter efeito mitogênico na regeneração hepática. Estudos em camundongos hepatectomizados deficientes de IL-6 revelaram uma regeneração anormal após a cirurgia (NAKAMURA et al., 1988; RAMALHO, 1998; ALWAYN et al., 2008).

3.8.1.3.3 Fatores de Crescimento Parcialmente Caracterizados

Nesse grupo estão incluídas substâncias isoladas e de plaquetas de animais parcialmente hepatectomizados e de animais sadios, de fígados em regeneração e de fígados de ratos recém-nascidos, e do soro e do plasma de pacientes com necrose hepática fulminante. Com exceção de um fator inibitório extraído de plaquetas, todas estas preparações estimulam a replicação de DNA em hepatócitos *in vivo*, e em cultura após indução por EGF. Entretanto, elevadas quantidades dos mesmos componentes geralmente inibem a síntese de DNA (FAUSTO, 1990; RAMALHO, 1998).

Parece certo que plaquetas contêm fatores que estimulam e que inibem a síntese de DNA em hepatócitos em cultura. Visto que, *in vivo*, hepatócitos não entram em contato direto com plaquetas, não se sabe como estes fatores se interagem com hepatócitos (FAUSTO, 1990; RAMALHO, 1998).

3.9 TERAPIA NUTRICIONAL

Adequada avaliação do estado nutricional em pacientes portadores de hepatopatias crônicas permite diagnosticar importantes desvios e enseja a aplicação de medidas de correção capazes de melhorar o prognóstico, especialmente quando se pretende submeter tais pacientes ao recurso heróico do transplante hepático. A terapia nutricional representa um dos procedimentos de maior importância no manejo das doenças do fígado, devendo ser considerada como um adjuvante imprescindível às opções terapêuticas de que dispõe a clínica (PAROLIN et al., 2002).

Frequentemente, proteínas sintetizadas pelo fígado estão reduzidas em pacientes portadores de hepatopatias. Clinicamente essas deficiências se evidenciam pelo decréscimo dos respectivos valores no sangue circulante, como a albumina, a protrombina, a ceruloplasmina, a transferrina e a proteína que se liga ao retinol. Entre os aminoácidos importantes para a integridade muscular a glutamina é

considerada como essencial; sua síntese está aumentada nos processos catabólicos e ela representa 61% dos aminoácidos constituintes da massa muscular. Entre outros nutrientes importantes que devem ser considerados na correção da deficiência nutricional destacam-se a arginina, pelo seu poder de geração de óxido nítrico, a colina, cistina, taurina e tirosina que necessitam de reposição porque, nas hepatopatias, sua síntese está prejudicada e a insulina e o glucagon, elementos considerados de fundamental importância no crescimento do parênquima hepático e na integridade da mucosa intestinal, onde a produção de IgA representa uma das garantias da integridade imunológica (NOMPLEGGI; BONKOWSKY, 1994).

Da mesma forma, a doença hepática crônica cursa com deficiência das vitaminas hidrossolúveis, tiamina, piridoxina e ácido fólico, especialmente se o fator etiológico for o álcool (PAROLIN et al., 2002).

A glicose é usada como fonte principal de energia no fígado doente, mas sua contribuição à regeneração compensatória do fígado ainda não está esclarecida. É um substrato energético predominante na regeneração do fígado depois da hepatectomia e que o deslocamento para utilização da gordura somente ocorre quando a glicose não está disponível em quantidade suficiente. No complemento para a manipulação nutricional, deve ser possível explorar os mecanismos moleculares que regulam a divisão organizada das células (reparação do tecido) para aumentar a taxa de sobrevivência dos pacientes que sofrem com doenças hepáticas. Estas decisões têm um impacto significativo na reparação dos tecidos de uma variedade de outros órgãos e tecidos, particularmente nas condições da diabetes (LAI et al., 1992; CHANDA; MEHENDALE, 1996).

O aumento na quantidade de insulina usada em animais tratados com solução hepatotrófica comparados com experimentos de Parra et al. (1992) – 12,5 U versus 5 U / 100 ml de solução – mostrou uma indução à resposta hiperplásica hepática similar à resposta obtida por Parra et al. (1994).

Trabalhos de resposta da fibronectina para a regeneração do fígado depois da hepatectomia parcial mostraram que a fibronectina plasmática é útil para marcar a detecção da regeneração do fígado. Os níveis de fibronectina plasmáticas são bem

correlacionadas com a porcentagem de mudança do peso do fígado durante a regeneração em ratos cirróticos ou não cirróticos (KWON, 1990).

Tem sido demonstrado que a massa hepática tem relação de 2,5% a 3% de proporcionalidade com o peso do corpo (FURTADO, 1964; BUCHER et al., 1977; VAN THIEL et al., 1987; PARRA, 1988; PARRA, 1994).

Como em termos práticos há uma aceitação geral da existência de um equilíbrio entre o tamanho do fígado e o fornecimento de fatores hepatotróficos, estudos tem relatado que este equilíbrio pode ser quebrado pela suplementação exógena com alguns fatores hepatotróficos conhecidos, destacando um aumento do tamanho do fígado (não hepatectomizado) além do tamanho biologicamente pré-determinado (PARRA, 1992, 1994, 1995b).

Foi demonstrado que é possível aumentar o tamanho do fígado sadio dos ratos, contrariando a determinação biológica do tamanho do fígado pré-determinado do animal, por administração intraperitoneal de fatores hepatotróficos (FH) (uma solução contendo glicose, aminoácidos, insulina, glucagon, vitaminas e eletrólitos) que imitam qualitativamente as substâncias e hormônios presentes no sangue esplâncnico (PARRA et al., 1992).

Guerra et al. (2009) também demonstrou em seus experimentos que, a mesma solução de FH usada por Parra et al. (1992), aumenta significativamente o peso do fígado em ratos cirróticos tratados com FH por 10 dias (11,3%). Guerra induziu os animais à cirrose com o uso de tioacetamida, através de injeções intraperitoneais 3x/semana por 14 semanas. Após obter o quadro cirrótico, os animais foram tratados com FH aplicados 2x/dia por 10 dias consecutivos na dose de 40 ml/kg/dia.

Fórmulas capazes de modificar a relação de proporção do fígado com o peso do corpo do animal têm sido desenvolvidas em estudos anteriores em ratos, com aumento do tamanho do fígado causado pela infusão intraperitoneal de FH, tais como a glicose, aminoácidos, insulina, glucagon, vitaminas, eletrólitos e triiodotironina (T₃) (PARRA et al., 1995b).

Infusão através da veia periférica de hormônio tireóideo (T_3) pode induzir pequenas, mas significantes aumentos na proliferação hepática em ratos saudáveis, um efeito que pode ser aumentado pela adição de glucagon, aminoácidos, e heparina. Também tem sido mostrado que os hormônios da tireóide aumentam a proliferação dos hepatócitos nas culturas de células do fígado. Do mesmo modo, os aminoácidos aumentam a resposta da regeneração no fígado sadio e na proliferação dos hepatócitos em cultura (SHORT et al., 1972; BUCHER et al., 1978; LEFFERT; KOCH, 1978; BAKER, 1985).

A adição de T_3 para a solução de fatores hepatotróficos mostrou uma tendência maior (50,68%) para a estimulação hiperplásica, um fato que foi mais ou menos esperado porque o hormônio da tireóide é conhecido como sendo um estimulador de síntese de DNA e da regeneração hepática, certamente causando um aumento na massa hepática em ratos não operados embora em uma taxa mais baixa. Essa enorme simulação potencial do T_3 foi também observado em grupo de ratos com dose dupla de T_3 (2x - 14,125µg de T_3 em 100 ml de solução alcoólica), onde promoveu uma resposta maior em um período curto de 8 dias (aumento do fígado de 50,74% para 85,91%). Assim, o hormônio da tireóide parece ser um importante fator que, quando acrescentado à solução básica (fatores hepatotróficos), pode causar uma maior estimulação da regeneração comparada a isso obtido nos estudos anteriores (²HIGGINS; ANDERSON, 1931: apud RAMALHO, 1998, p. 242; ANDERSON, 1933; STERNHEIMER, 1939; CANZANELLI et al., 1949; SHORT et al., 1972; LEFFERT; KOCH, 1977; PARRA et al., 1992; PARRA, 1994).

O uso de fatores hepatotróficos exógenos (fator de crescimento hepático e insulina) pela perfusão da veia porta também revelou melhoras na injúria hepática em animais cirróticos, minimizou danos na ultraestrutura dos hepatócitos, protegeu a função hepática e diminuiu a fibrose hepática em ratos com hipertensão portal (ZHONG-TAO et al., 2006).

² HIGGINS, G. M. Experimental pathology of the liver. XII. Effects of feeding dessicated thyroid gland on restoration of the liver. **Archives of Pathology**, v. 16, p. 226-231, 1933.

Uma simples manipulação nutricional é capaz de induzir a proliferação hepatocelular em fígados “sadios” de ratos e camundongos. Inicialmente os animais são mantidos exclusivamente com solução glicosada a 20%, sem qualquer outra fonte nutricional durante três dias. A seguir uma refeição hiperprotéica é oferecida, por exemplo, caseína hidrolisada. A síntese de DNA não se altera durante os três dias de indução, mas eleva-se rapidamente após a administração de aminoácidos, sendo o pico obtido 15 horas após a refeição hiperprotéica, quando há um aumento de 16 vezes na síntese de DNA, retornando aos níveis basais em 28 horas. A análise da expressão de proto-oncogenes durante o período de indução (dieta exclusiva em glicose) revela aumento nos níveis de RNAm para os oncogenes c-jun, c-myn e p-53, semelhantemente ao observado nas primeiras horas após a hepatectomia parcial. Considerando também que o pico de síntese de DNA após a suplementação protéica ocorre 7-9 horas mais cedo em relação ao requerido após a cirurgia, pode-se presumir que a iniciação dos hepatócitos no ciclo celular ocorre ainda durante o período de privação protéica. Após a administração de aminoácidos, o hepatócito progride em direção a síntese de DNA, podendo-se detectar re-expressão do proto-oncogene p-53 e ativação de c-Ha-ras, cujo pico coincide com o pico de síntese de DNA. Durante o período de indução, quando hepatócitos são transferidos para meios de cultura, estes são capazes de atingir o pico de síntese de DNA mais precocemente que hepatócitos normais (cerca de 24 horas mais cedo), na ausência de qualquer fator de crescimento. Não se conhece o mecanismo pelo qual manipulação nutricional induz iniciação de hepatócitos. O efeito pode ser secundário a uma reação de stress induzida por alterações nutricionais e/ou adaptações metabólicas. Adaptações metabólicas ocorrem no pós-operatório imediatamente, causadas por maior demanda funcional imposta ao fragmento hepático remanescente. É curioso o fato de que alterações metabólicas e/ou reações de stress nutricional sejam capazes de desencadear o processo de proliferação celular (MEAD et al., 1990; RAMALHO, 1998).

O desenvolvimento do fígado sadio por estimulação de fatores exógenos tem sido demonstrado nos estudos anteriores e tem sido atribuído um mecanismo regenerativo envolvendo um aumento do número de hepatócitos. A maior dificuldade do estudo do aumento do tamanho do fígado nos experimentos no qual o tamanho estimado é comparado a massa observada é determinar o tamanho estimado nos

animais vivos. Isso é feito indiretamente pela relação peso do fígado/peso do corpo no grupo controle de animais. Este procedimento também estipula o cálculo do crescimento do fígado para o peso final do corpo, um fato que elimina a possível influência no tratamento com glicose, aminoácidos e hormônios nas variações do apetite do animal, consumo de alimento e taxa de crescimento do corpo (PARRA, 1994, 1995b).

Em uma comparação dos teores de colágeno hepático em um grupo de ratos sete dias após hepatectomia de 70%, com média de crescimento da massa residual de 71,55% e em outro grupo, sete dias após estimulação do crescimento de seus fígados sadios com média de 121,05% pela administração intraperitoneal de FH foi revelado que o crescimento hepático, a partir de fígados sadios estimulados pelos FH, ocorre com defasagem na produção de colágeno, a semelhança do que se verifica após a hepatectomia de 70% (PARRA, 1996).

Estudos mostraram que em animais, com fibrose induzida, tratados FH apresentaram redução da proporção volumétrica do colágeno da matriz extracelular do fígado. Os ratos receberam 40ml/kg por via intraperitoneal durante dez dias consecutivos. A proporção volumétrica de colágeno no fígado com fibrose induzida reduziu cerca de 43% nos animais do grupo tratado com fatores hepatotróficos exógenos, enquanto o grupo controle (tratados com solução fisiológica na mesma dosagem a densidade volumétrica do colágeno permaneceu constante (PEREIRA et al., 2003). Guerra et al. (2009) também demonstra a redução de 37,1% de colágeno presente no fígado de ratos cirróticos tratados com FH por 10 dias.

Os FH têm um efeito maior quando introduzido através da veia porta, imitando o caminho fisiológico, quando comparado à administração através de uma veia periférica (PARRA et al., 1992, 1995b).

A associação de fatores usados como poderosos mitógenos do hepatócito tais como fator de crescimento epidérmico (EGF) e fator de crescimento hepático (HGF), que tem comprovado ser capazes de induzir por eles mesmos um crescimento no tamanho do fígado sadio nos animais, pode possivelmente induzir uma resposta melhor, talvez dentro de um período curto de tempo. Entretanto, com uma injeção

diária da solução hepatotrófica o crescimento do fígado foi alcançado acompanhado por um aumento da taxa de mortalidade, com um comportamento bifásico, um pico durante os primeiros dias depois de iniciado as injeções e um segundo pico durante os últimos dias. Os dois picos foram atribuídos a diferentes causas, o primeiro relatado para uma possível toxicidade inicial da solução utilizada e o segundo pico foi minimizado pela redução do número de dias de injeções de 10 para 7 assim como para obter um número de animais sobreviventes de quem os resultados pudessem ser analisados estatisticamente sem prejudicar o aumento do tamanho do fígado (OPLETA et al. 1987; FUJIWARA et al., 1993; PARRA et al., 1994; PARRA 1995b).

Estudos em ratos hepatectomizados e com o uso de FH demonstraram que o aumento da massa hepática possibilita determinar mudanças na matriz extracelular, especialmente nos componentes do colágeno. No entanto, a eficácia das formulações dos FH foi acompanhada pelo aumento da mortalidade dos animais (PARRA et al., 1992, 1994, 1995b, 1996).

Foi demonstrado que a perspectiva da estimulação da regeneração do fígado pela administração de FH pela via portal tem grande aplicabilidade clínica nas situações de redução do tamanho do fígado depois da hepatectomia parcial ou necrose do hepatócito (hepatite e abscesso) e nas situações envolvendo o fígado sadio, tais como casos de transplante de doadores vivos, fornecendo ao receptor um maior segmento hepático implantável e ao doador uma maior massa residual do fígado. Além disso, os pacientes com cirrose em que a estimulação regenerativa pela hepatectomia parcial tem sido mostrada para produzir uma melhora histológica e funcional podem beneficiar deste método sem a inconveniência da função reduzida trazida pela cirurgia (COSTA; SMORLESI, 1951; ISLAMI et al., 1958; LEEVY et al., 1959; GALANTI; PUCHETTI, 1960; HANEY et al., 1972; SAAD, 1972; PARRA, 1982, 1995b; GUERRA et al., 2009).

Durante o processo de regeneração hepática, o parênquima hepático cresce com diferenças nas velocidades de reprodução de seus elementos histológicos, sendo os hepatócitos os que apresentam crescimento mais rápido e o componente colágeno da matriz extracelular o mais lento. Isto confere maior friabilidade do fígado recém-regenerado. A matriz extracelular contém uma armação estrutural e mantém o

hepatócito num estado diferenciado e modula a reparação do fígado (BISSEL et al., 1990; MARTINEZ-HERNANDEZ; AMENTA, 1993a,b; PARRA, 1996).

A presença de células primordiais no fígado é assunto ainda bastante controverso. Estas parecem surgir apenas em situações muito específicas, como nos casos em que hepatócitos são maciçamente destruídos e/ou estão impedidos de se replicar, por exemplo, em algumas formas de hepatite fulminante em humanos, ou após necrose hepática maciça induzida experimentalmente pelo tetracloreto de carbono. Nestas situações, as células primordiais tornam-se funcionantes, sendo capazes de gerar hepatócitos ou participar na origem de hepatocarcinomas (GERBER et al., 1983; FAUSTO, 1990; MICHALOPOULOS, 1990; RAMALHO, 1998).

Adicionando carboximetilcelulose (0,25%) na mesma solução hepatotrófica usada por ele em estudos anteriores, Parra (1995b) demonstrou a capacidade de aumento da regeneração do fígado, que pelos custos crescentes da mortalidade, impediu dessa maneira a validação estatística dos dados obtidos devido ao pequeno número de animais sobreviventes (PARRA, 1995b).

Incertezas persistem sobre como estes fatores interagem para iniciar a síntese de DNA e a divisão celular. Pesquisadores sugerem que a ação dos fatores hepatotróficos ocorre em duas fases para produzir a regeneração do fígado. De acordo com essa hipótese, os fatores, ou os ativadores mitogênicos, incluem o EGF, nutrientes e talvez prostaglandina e estimuladores da substância hepática, uma vez que reguladores intracíclicos, ou fatores de progressão do ciclo celular, incluem o fator de crescimento epidermal, insulina, glucagon, e possivelmente o cálcio. O EGF e os nutrientes são os maiores controladores da primeira fase da regeneração hepática, e a insulina e o glucagon são os maiores controladores da segunda fase. A interação células/hormônios não-parenquimais podem também estarem envolvidas, desde então pequenos números de células não-parenquimais podem ser identificadas em culturas. Estudos futuros podem fornecer evidências sobre as fases da regeneração que estão envolvidas na regeneração hepática (LEFFERT et al., 1979; ARMATO; ANDREIS, 1983; BACKER, 1985).

3.10 ANÁLISE SOROLÓGICA HEPÁTICA

Provas sorológicas para averiguar o estado geral do fígado e sistema biliar, podem se dividir entre as que são valores reais da função hepática: albumina, creatinina, proteína total e protombina; e as que são marcadoras de doença hepática ou do sistema biliar, como as diferentes enzimas hepáticas. Desta forma, a verificação dos níveis plasmáticos de alguns compostos é um método útil para o reconhecimento das doenças que afetam a funcionalidade do fígado, auxiliando no diagnóstico diferencial direcionando o exame clínico.

Grupo das transaminases: alanino aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST). Possuem atividade relacionada com a integridade dos hepatócitos, permitindo que estas células realizem com eficiência a função de desintoxicação pela conjugação com os aminoácidos. AST é uma enzima que cataboliza aminoácidos permitindo que entrem no ciclo do ácido cítrico. Essa enzima faz a transaminação do grupo amino do aspartato para o α -cetoglurato, formando oxalato. Pode ser encontrada ainda no músculo cardíaco, rins, cérebro e células vermelhas do sangue. A ALT catalisa a interconversão do agrupamento amino da alanina para o α -cetoglurato formando piruvato e, portanto, desempenha importante função na gliconeogênese e no metabolismo de aminoácidos. A atividade da ALT é observada principalmente no fígado mas também pode ser encontrada em outros locais como músculos, coração, rins, cérebro e tecido adiposo, mas em menos fração de tal forma que é considerada um marcador hepato-específico. Por ser uma enzima citosólica o aumento da sua concentração indica permeabilidade da membrana e, portanto, morte celular. Assim, o aumento plasmático concomitante de ALT e de AST confirma a origem hepática da lesão. Apesar da ALT refletir injúria hepática, a AST tem uma correlação mais forte com a presença de fibrose (KAPLOWITZ, 1982; BANKS, 1992; MURIEL; ESCOBAR, 2003; GIANNINI et al., 2005; GRIGORESCU, 2006; SCHINDHELM et al., 2006).

Atualmente, tem-se utilizado a relação AST/ALT como um marcador de maior sensibilidade e especificidade em humanos. Pacientes normais apresentam valor de aproximadamente 0,8 e este valor aumenta em estágio avançado de fibrose.

Quando essa proporção é maior ou igual a 1, a cirrose pode ser caracterizada. Uma proporção maior que 1,16 apresentou 81% de sensibilidade e 55% de especificidade em identificar pacientes cirróticos que morreram dentro de um ano (GRIGORESCU, 2006; CHEN et al., 2008; MANNING; AFDHAL, 2008).

O grupo da fosfatase alcalina (FA) e a gama-glutamiltansferase (GGT) é um grupo de enzimas hepáticas que indicam obstrução do sistema biliar, quer seja no fígado ou nos canais maiores da bile que se encontram fora deste órgão. A FA é uma enzima que transporta metabólitos através das membranas celulares e pode ser encontrada nos ossos, intestinos, rins, placenta e nos leucócitos. 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. No fígado está presente na superfície do epitélio dos ductos biliares e na membrana dos hepatócitos. A proliferação desses ductos aumenta a síntese e a liberação dessa enzima e, assim sendo, níveis aumentados de FA estão correlacionados ao grau de integridade do tecido hepático (KAPLOWITZ et al., 1982; GIANNINI et al., 2005).

A GGT é uma enzima que cataliza o metabolismo da glutatona e dos compostos conjugados a ela. A GGT faz a transferência do grupo γ -glutamil dos peptídeos para outros aminoácidos. Ela está presente nos hepatócitos e células do epitélio biliar, mas também é encontrada nos túbulos renais, pâncreas e intestino. Sua utilização como teste de função hepática é justificada por sua alta sensibilidade em doenças hepáticas refletindo em anormalidades da estrutura e da função hepática. O mecanismo de alteração da GGT é dado pelos níveis plasmáticos aumentados da enzima indicando a origem hepatobiliar da lesão (colestase, fibrose e cirrose) (KAPLOWITZ et al., 1982; ARIAS et al., 1994; GIANNINI et al., 2005; MANNING; AFDHAL, 2008; SCHUPPAN; AFDHAL, 2008).

A bilirrubina (BIL) é o principal pigmento da bile nos humanos. Seus altos níveis plasmáticos provocam icterícia. É formada a partir de eritrócitos velhos que são removidos da circulação por fagocitose. A hemoglobina é quebrada em porção globina e porção heme e seus componentes são reciclados. Quando esses componentes são separados, a globina é hidrolisada até os aminoácidos, os quais voltarão à circulação. O ferro localizado no interior do grupo heme é liberado e volta

aos estoques teciduais. O resíduo do grupo heme, a biliverdina, é transportado para o fígado onde é reduzido à bilirrubina. A bilirrubina, inicialmente é insolúvel (bilirrubina não-conjugada), mas torna solúvel pelo processo de biotransformação, realizado pela enzima glicuranyl transferase, ao ser conjugada um glicuronato. Esta forma de bilirrubina pode, então, entrar no hepatócito e sua maior parte é secretada na bile. Uma pequena parte retorna à circulação, sendo excretada pelo rim na forma de urobilinogênio. Em condições patológicas, a concentração plasmática de bilirrubina, tanto livre quanto conjugada, aumenta caracterizando icterícia. As causas desse aumento podem ser decorrentes de aumento na destruição de eritrócitos, obstrução dos ductos biliares ou lesão dos hepatócitos, de modo que mesmo as quantidades habituais de bilirrubina não são excretadas pela bile. O teste de bilirrubina total (BILT) corresponde à fração conjugada e não-conjugada. É um teste específico de desordem hepática, visto que seu metabolismo é exclusivamente no fígado e seu valor real de função hepática reflete a habilidade do fígado de recolher, processar e separar a bilirrubina da bile (BLANCKAERT; SCHIMID, 1982; BANKS, 1992; GUYTON; HALL, 2002; BANCROFT; GAMBLE, 2002).

Os exames de albumina (ALB) e proteína total (PT) passaram a ser utilizados após estudos de 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 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 et al., 1973).

O teste da proteína total avalia a concentração plasmática de proteínas (albumina e globulinas). A cirrose é uma das condições patológicas que provoca a redução dos níveis plasmáticos de proteínas. A incapacidade do hepatócito de sintetizar as proteínas em quantidade suficiente resulta na diminuição da pressão osmótica do plasma e formação de edema associado à afecção (GUYTON; HALL, 2002).

A albumina contribui para o gradiente de concentração entre o sangue e o fluido extracelular, sendo responsável por cerca de 70% da pressão osmótica vascular, além de captar e transportar algumas substâncias como a bilirrubina livre é uma

proteína sintetizadora no fígado e corresponde à quase metade da proteína total sendo que a outra metade é formada pelas imunoglobulinas (BANKS, 1992).

A globulina (GLO) juntamente com a ALB compõe a PT plasmática. A fração das GLO compreende as α , β e γ -globulinas. O grupo das γ -globulinas é composto pelas imunoglobulinas e são sintetizadas nos órgãos do sistema reticuloendotelial. As demais são sintetizadas pelo fígado e, assim como a ALB, desempenham funções de transporte de substâncias (BANKS, 1992).

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 et al., 1982).

3.11 GENES MODULADORES DA MATRIZ EXTRACELULAR

Os principais genes envolvidos na modulação da matriz extracelular do fígado são:

3.11.1 Metaloproteínases

Vários mecanismos controlam a síntese e degradação da matriz extracelular (MEC). A degradação de proteínas na MEC é mediada principalmente pelas metaloproteínases (MMPs), que são um grupo de enzimas que utilizam íons de zinco para exercerem suas atividades. A maioria das MMPs são sintetizadas e secretadas como pro-enzimas não ativas. Alterações na expressão de MMP pode implicar em fibrogênese hepática podendo levar a cirrose. De acordo com sua estrutura e substrato ao qual se liga, membros da família das MMPs são classificados em subgrupos de collagenases, estromelisinases, estromelisinases like, matrilisinas, gelatinases, MMPs transmembrana e outras MMPs (RUDOLPH et al., 1999).

Knittel et al. (1999) e Mizutani et al. (2001) classificam as MMPs como: as collagenases (MMP1, 8 e 13), são 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 estromelisinases (MMP 3, 10 e 11), que degradam proteoglicanas, glicoproteínas e tem alguma atividade no colágeno tipo IV e elastina. 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 TIMP2 (BASBAUM; WERB, 1996).

Além do zinco, todos os membros da família das MMPs compartilham o domínio pró-peptídico, que contém um resíduo cisteína, responsável pela manutenção da proteína sob sua forma latente (pró-MMP). As sequências adicionais contribuem para o funcionamento único de cada tipo de enzima. Há um peptídeo sinalizador ligado ao pró-peptídeo que direciona a secreção da MMP latente e uma região rica em prolina liga o domínio catalítico ao domínio hemopexina, que determina os substratos específicos de cada MMP e seus inibidores, que, por sua vez, agem ao se ligarem ao domínio catalítico. Substratos e inibidores, porém, não são exclusivos para cada MMP. O controle extracelular da atividade de MMP pode ser inibido por quatro componentes no grupo dos tecidos inibidores de MMPs (TIMP1 a TIMP4). 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 (CAWSTON, 1995; RIES; PETRIDES, 1995; BASBAUM; WERB, 1996; ZAKI; SIGAL; 2000).

No fígado as MMPs são produzidas principalmente por células estreladas inativas. Entretanto TIMPs são detectáveis em todos os tipos celulares hepáticos, apresentando níveis mais elevados em células não parenquimais de origem fibroblástica (células estreladas ativas e miofibroblastos (ROJKIND, 1982; KNITTEL et al., 1999).

As células que produzem um excesso de colágeno I, como as células estreladas ativas dentro dos septos fibrosos em fígados fibróticos ou cirróticos, devem expressar menos MMPs que as células estreladas quiescentes. Devido a essa combinação de mecanismos, a degradação de MEC é estritamente regulada, o que previne prejuízo tissular inadvertido (BODE et al., 1999).

Já foi demonstrado também que em ratos hepatectomizados, as MMPs contribuem para a modulação do ambiente hepatocitário durante o período de regeneração hepática (KIM et al., 2000).

3.11.1.1 MMP 2 e 9 (Gelatinase A e B)

A MMP 2 pertence ao grupo das gelatinases, ela é expressa nas células estreladas, miofibroblastos, e em baixos níveis nas células de Kupffer. Regula a membrana basal degradando seus componentes incluindo colágeno tipo IV, laminina e fibronectina (KNITTEL et al., 1999).

Estudos demonstram que a elevação dos níveis de gelatinase A acompanham a diminuição da degradação da MEC 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, células estreladas e hepatócitos (KNITTEL et al., 1999).

3.11.1.2 MMP 1, 8 e 13 (Colagenases)

O colágeno 1 (colágeno tipo I ou colágeno $\alpha 1$) é degradado apenas pelas MMPs 1, 8 e 13. Dessa forma, essas MMPs agem na resolução da fibrose hepática, formando o grupo das MMPs colagenases. A MMP 13 é a colagenase intersticial específica dos

ratos, enquanto que MMP 1 é a dos humanos (FREIJE et al., 1994; KNITTEL et al., 1999; LEE et al., 2003; SCHAEFER et al., 2003).

A MMP1 é capaz de clivar todas as três cadeias do colágeno tipo I no mesmo locus entre a glicina e isoleucina na cadeia $\alpha 1$ e entre a glicina e leucina na cadeia $\alpha 2$ (HIGHBERGER et al., 1979).

A MMP 13 é secretada por fibroblastos e células estreladas. No entanto, apesar das células estreladas poderem produzir e secretar a proenzima, elas não são capazes de convertê-la em MMP13 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 ativação da pro-MMP 13 (SCHAEFER et al., 2003).

3.11.2 Colágeno $\alpha 1$

O colágeno tipo I consiste de três cadeias polipeptídicas, cada uma com uma massa molecular de aproximadamente 95 kda, que se associam em uma estrutura de tríplice hélice. É um colágeno regulado positivamente pelo TGF $\beta 1$, que atua sobre as células estreladas ativas. A ativação de colágeno tipo I pelas células estreladas podem ser bloqueadas por antioxidantes. A degradação do colágeno I é realizada pelas collagenases, ou seja, as MMPs 1, 8 e 13 (CASINI et al., 1993; LEE et al., 1995; FRIEDMAN, 2000; ILMURO et al., 2003; SCHAEFER et al., 2003).

3.11.3 Fator Transformador do Crescimento – $\beta 1$ (TGF $\beta 1$)

O TGF $\beta 1$ é uma citosina liberada em situações de injúria hepática crônica, a qual é secretada em sua forma inativa e pode ser ativada por plasmina. A plasmina libera o

TGF β 1 da MEC para que ela seja ativada (YAMAGUCHI, 1990; ZHANG et al., 1999).

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. É contraditório que os níveis de RNAm e proteínas de TGF β 1 sejam baixos em fígados normais de roedores e humanos e altos na regeneração hepática, desenvolvimento, resposta inflamatória para injúria tecidual, fibrose hepática e carcinoma hepatocelular. Sendo assim, a exata função do TGF β 1 em fígados normais e com patologias em crescimento continua desconhecida (BRAUN et al., 1988; CZAJA et al., 1989; NAGY et al., 1991; ANNONI et al., 1992; BEDOSSA et al., 1995; DELHAYE et al., 1999).

A diminuição da degradação da MEC durante uma injúria crônica hepática deve ser atribuída à ação do TGF β 1 através da ativação de células estreladas. A ativação de células estreladas pelo TGF β 1 leva a uma maior expressão de enzimas fibrinogênicas como as TIMPs, PAI I e de procolágenos α 1. Em adição, aumenta a expressão de PAI I em hepatócitos e em células endoteliais *in vitro*. É também atribuído ao TGF β 1 a síntese e ativação de MMP 2, citocinas inflamatórias e a estimulação de células estreladas a entrarem na fase S do ciclo celular. Por conseguinte, considerado um indutor da síntese de colágeno e do processo de fibrogênese (CASINI et al., 1993; MARTI et al., 1993; RIEDER et al., 1993; BUSO et al., 1994; KNITTEL et al., 1996; MARGOLIN et al., 1997; RUDOLPH et al., 1999; TSUKAMOTO et al., 1999; ZHANG et al., 1999; MARTELLI-JÚNIOR et al., 2003).

O TGF β 1 estimula também a síntese de todos os componentes da MEC, sintetizadas pelas células estreladas. Sendo assim, promove uma explicação para a acumulação co-localizada com essas células durante a injúria hepática crônica. TGF β 1 induz a expressão de principalmente TIMPs e PAIs (KNITTEL, et al., 1996).

3.11.4 Uroquinase Ativador de Plasminogênio (PLAU)

Dois tipos de ativadores de plasminogênio podem ser distinguidos: tecido ativador de plasminogênio (tPA) e uroquinase ativador de plasminogênio (PLAU). Se diferem quanto a reatividade imunológica e pelos genes que os codificam. Em adição, uPAR atua na regulação da remodelação da matriz e aumenta a eficiência da geração de plasmina, ligando PLAU a sua proenzima, pró-PLAU, de tal modo que a ativação pode ocorrer diretamente na superfície celular (VERHEIJEN et al., 1986; ELLIS, et al., 1992; BEHRENDT et al., 1995).

Os ativadores de plasminogênio possuem inibidores específicos: inibidor de ativador de plasminogênio I e II (PAI I e II). Ambos podem formar complexos estáveis proteolicamente inativos com PLAU e tPA (QUAX et al., 1990).

A atividade do sistema ativador de plasmina é controlado pelos seus inibidores específicos PAIs. PLAU e PAI são importantes reguladores do balanço entre as atividades proteolíticas e antiproteolíticas que determinam o “*turnover*” da MEC, iniciando a cascata proteolítica importante na remodelação tecidual associada com regeneração hepática ou fibrose (LEYLAND et al., 1996; ZHANG, et al., 1999).

Estudos demonstram que a expressão de ativadores de plasminogênio e PAI é baixa ou indetectável em fígados de ratos normais. Entretanto, na regeneração hepática após hepatectomia, a expressão de plasmina e PAI I aumenta. Na cirrose hepática em ratos a expressão de tPA, PLAU e PAI é importante na remodelação da MEC em fígados fibróticos e cirróticos (QUAX et al., 1990; THORNTON et al., 1994; SEKI, 1996; ZHANG et al., 1999).

Os ativadores de plasminogênio são proteases bem conhecidas que catalizam a conversão de plasminogênio em plasmina. A 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 MEC, como organogênese, remodelação tecidual, inflamação, invasão tumoral, metástase e

migração celular. Também é atribuída a plasmina as funções de ativação de fatores de crescimento e participação no mecanismo de proliferação de hepatócitos (DANO et al., 1985; VASSALLI et al., 1991; ANDREASEN et al., 1997; HAMADA et al., 1997; AKAO et al., 2002; MANGNALL et al., 2003).

Células endoteliais e células estreladas tem sido identificadas como as maiores secretoras de PAI I, apesar dos hepatócitos apresentarem alguma expressão quando submetidos a alguma toxina (KUIPER et al., 1989; ZHANG e al., 1999).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4 MATERIAIS E MÉTODOS

A seguir serão descritos as metodologias utilizadas para a execução da proposta em questão.

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados 105 ratas albinas Wistar (*Rattus norvegicus*) pesando aproximadamente 200g cada. Os animais foram identificados e acondicionados em número de 5 em gaiolas de polipropileno (41 x 34 x 16) forradas com serragem (maravalha) trocadas a cada 5 dias e tampadas por grade metálica, sob condições controladas de temperatura ($20\pm 4^{\circ}\text{C}$) e umidade relativa do ar (45% - 75%), com ciclo de 12 horas de claro/escuro. Os animais receberam água (filtrada, $\text{pH} \pm 7.0$) e ração (Nuvilab) em regime *ad libitum* por todo o período experimental.

Os animais utilizados no experimento foram provenientes do biotério do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP e permaneceram alojados no mesmo local durante o período de aplicação dos FH. Este projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Bioética da FMVZ/USP com número e protocolo nº1110/2007

Todos os experimentos foram realizados no Laboratório de Anatomia Microscópica e Imuno-histoquímica (LAMI) do Departamento de Cirurgia e no Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP.

4.2 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Os 105 animais foram separados em 7 grupos de 15 animais:

- Grupo CT (Controle tratado com Solução Salina 0,9% por 12 dias)
- Grupo 2 (2 dias de tratamento)
- Grupo 4 (4 dias de tratamento)
- Grupo 6 (6 dias de tratamento)
- Grupo 8 (8 dias de tratamento)
- Grupo 10 (10 dias de tratamento)
- Grupo 12 (12 dias de tratamento)

O tratamento consistiu em uma solução de FH conforme a Quadro 1 (PARRA et al., 1995b), injetada por via intraperitoneal em duas injeções (intervalo de 12 horas e com conteúdo das seringas divididas em iguais proporções), na dosagem de 40 ml/kg/dia durante 12 dias. Além dos fatores hepatotróficos mencionados, cada animal recebeu 2,26 µg/200 g/dia (200 g de peso vivo) de uma solução alcoólica de L-triiodotironina (T₃) (também com intervalo de 12 horas e com conteúdo das seringas divididas em iguais proporções). Para sua administração utilizamos uma pipeta graduada e o conteúdo foi colocado nas seringas (em iguais proporções) que já continham a solução de fatores hepatotróficos, de modo a evitar a precipitação do T₃.

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

Quadro 1 – Composição da solução de fatores hepatotróficos (FMVZ/USP – São Paulo – 2009)

4.3 EUTANÁSIA DOS ANIMAIS

Ao término dos procedimentos experimentais os animais foram eutanasiados pela dose excessiva de anestésico inalatório Isoflurano¹ (CLOSE et al., 1996, 1997) administrado através de circuito de Magill, em oxigênio 100%, por meio de um aparelho de ventilação mecânica², com auxílio de máscara de tamanho apropriado. A entrada do animal em anestesia foi verificada pelas frequências cardíaca e respiratória, pelo grau de relaxamento muscular e reflexos digitais.

4.4 COLHEITA DOS ÓRGÃOS E SEUS PARÂMETROS BIOMÉTRICOS

No momento da eutanásia os animais foram pesados e o fígado retirado para coleta de dados paramétricos como o peso (com o auxílio de uma balança analítica), volume e densidade.

O volume do fígado foi calculado pelo Método Scherle (SCHERLE, 1970). Foram também coletados os seguintes parâmetros após a eutanásia dos animais:

Peso da carcaça

Peso total das vísceras

Ganho de peso (GP) dos animais durante o tratamento utilizando a seguinte fórmula:

$$\frac{(PR_f - PR_i) \cdot 100}{PR_i}$$

¹ Cristália, Brasil

² Takaoka 640, Brasil

Onde:

PRi – Peso do rato inicial

PRf – Peso do rato final

Índice hepatossomático (IHS), utilizando a seguinte fórmula:

$$\frac{MF.100}{PRf}$$

Onde:

MF – Massa do fígado

PRf – Peso do rato final

Índice vísceras-peso total do animal (IVP), utilizando a seguinte fórmula:

$$\frac{VIS.100}{PRf}$$

Onde:

VIS – Peso das vísceras

PRf – Peso do rato final

Índice hepato-corporal (IHC), utilizando a seguinte fórmula:

$$\frac{MF.100}{CAR}$$

Onde:

MF – Massa do fígado

CAR – Peso da carcaça

4.5 COLHEITA E BIOQUÍMICA SÉRICA DAS AMOSTRAS SANGUÍNEAS

O sangue foi colhido no momento da eutanásia dos animais, após os mesmos perderem os reflexos digitais e permanecerem sob relaxamento muscular. A colheita das amostras sanguíneas foi efetuada por punção cardíaca, sendo que o volume obtido foi de, no máximo, 1mL utilizando-se agulha e seringa de 3mL, ambas heparinizadas. As amostras permaneceram sobre o gelo picado até o término dos

procedimentos quando foram centrifugadas a 6000 rpm por 5 min. O plasma obtido foi armazenado em freezer (-80°C).

As amostras de plasma de 10 animais por grupo foram avaliadas pelo analisador bioquímico VetTest®³.

Foram realizadas as seguintes análises bioquímicas do plasma:

- Alanina aminotransferase (ALT)
- Aspartato aminotransferase (AST)
- Albumina (ALB)
- Fosfatase alcalina (FA)
- Gama-glutamiltanspeptidase (GGT)
- Bilirrubina total (BILT)
- Proteína total (PT)
- Globulina (GLOB)

4.6 PROCESSAMENTO DO FÍGADO PARA HISTOLOGIA

A seguir estão descritos os procedimentos para processamento histológico do fígado.

³ IDEXX Laboratories, Inc. Westbrook, ME, EUA

4.6.1 Fixação e inclusão para microscopia de luz

As amostras biológicas coletadas (Fígado e Duodeno) foram fixadas em Methacarn (por 12 horas), Bouin (por 6 horas) e em Mc Dowell. Os fragmentos foram incluídos em paraplast (JUNQUEIRA, 1995) e resina.

4.6.2 Processamento dos blocos

Blocos de paraplast foram cortados em 5µm e blocos de resina foram cortados em 2µm de espessura em micrótomo manual. Os cortes foram distendidos em banho-maria e pescados por lâminas de vidro.

4.6.3 Colorações para microscopia de luz

Para verificação da arquitetura celular e do colágeno, foram utilizadas as seguintes colorações:

4.6.3.1 Amostras Incluídas em Paraplast

Os cortes histológicos medindo 5µm de espessura foram coradas nas colorações descritas a seguir:

4.6.3.1.1 *Hematoxilina-Eosina (Wallington, 1972)*

Essa técnica foi utilizada para observação do aspecto histomorfológico do tecido.

4.6.3.1.2 *Picrossírius (JUNQUEIRA et al, 1978)*

Essa técnica foi utilizada para evidênciação das fibras colágenas.

4.6.3.1.3 *Picrossírius (com passagem no ácido fosfomolíbdico 2% - modificado)*

Essa técnica foi utilizada para evidênciação e quantificação das fibras colágenas.

Procedimento da coloração:

- Desparafinização (1 hora na estufa)

- Diafanização/Coloração:

- Xilol I (5 min.)
- Xilo II (5 min.)
- Álcool + Xilol (2 min.)
- Álcool 95% (5 min.)
- Álcool 70% (5 min.)
- Água Destilada (5 min.)
- Ácido fosfomolíbdico 2% (2 min.)
- Água Destilada (2 min.)
- Picrossírius (1 hr.)
- Água Corrente (10 min.)
- Álcool 100% I (5 seg.)
- Álcool 100% II (5 seg.)
- Álcool + Xilol (5 seg.)
- Xilol I (5 min)

- Xilol II (5 min)
- Montagem

Reticulina (Impregnação por prata – GOMORI, 1937)

Essa técnica foi utilizada para evidenciar as fibras reticulares (impregnação usada somente no fígado).

4.7 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

A análise das lâminas foi realizada no Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo sob supervisão da Prof^a Dr^a Maria Lúcia Zaidan Dagli. Para descrição de possíveis lesões, as lâminas foram comparadas aos pares, sendo uma delas o grupo controle, e avaliadas.

4.8 MORFOMETRIA DO COLÁGENO

Foram selecionados ao acaso 10 animais de cada grupo. Foram confeccionadas 10 lâminas para cada animal em cortes não seriados, sendo que em cada lâmina foram medidos 5 campos em objetiva 60x, cada campo medindo $67.014,21\mu\text{m}^2$. Foi quantificada a proporção volumétrica das fibras colágenas no espaço dos sinusóides com ausência de vasos do espaço porta, veia centrolobular e cápsula do fígado. 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 lâminas coradas apenas por Picrossírius (com passagem em ácido fosfomolibdico 2%). O programa

utilizado para o contraste do colágeno e sua mensuração foi realizada por software⁴ específico.

A quantidade de colágeno presente em cada campo foi medida em unidades de área (μm^2). O valor obtido nos 5 campos medidos de cada lâmina foi somado. Em cada animal foi tirado a média dos valores somados dos 5 campos medidos de cada uma das 10 lâminas do mesmo animal. Foi calculada a média final dos 10 animais de cada grupo, valores esses utilizados no programa estatístico.

4.9 IMUNO-HISTOQUÍMICA

A seguir a descrição da reação de imuno-histoquímica para PCNA.

4.9.1 Detecção da proliferação celular (antígeno celular de proliferação nuclear - PCNA)

Para a quantificação de células no ciclo celular utilizamos 10 animais de cada grupo experimental. Anticorpos primários contra PCNA (Dako) diluídos 1:200 foram detectados pelo método da estreptavidina-biotina-peroxidase. Como o PCNA marca a ciclina, uma proteína nuclear expressada na fase S do ciclo celular, células positivas foram evidenciadas após a coloração com DAB. Foram contadas mil células, considerando aquelas com núcleo marrom como positivas e os resultados foram representados como porcentagem de células PCNA⁺ em relação ao total de células contadas. As lâminas foram incubadas com cortes do intestino (duodeno), sendo utilizado como controle positivo da reação de imuno-histoquímica para verificação da proliferação celular.

⁴ KS400, marca ZEISS, ano 2000

4.10 IMUNOFLUORESCÊNCIA

A seguir a reação de imunofluorescência para colágeno tipo III.

4.10.1 Imunofluorescência para Colágeno Tipo III

Para a quantificação de colágeno tipo III utilizamos 10 animais de cada grupo experimental. Amostras de fígado incluídos em paraplast e fixados em methacarn foram cortados em 5µm de espessura e desmascarados em solução de Tris-EDTA, durante 20 minutos em microondas. Em seguida, os cortes foram submetidos ao bloqueio da peroxidase em solução de H₂O₂ 5%, diluído em metanol, durante 30 minutos. Após lavagens, o bloqueio antigênico das lâminas foi realizado em solução de leite desnatado a 5%, durante 15 minutos. Posteriormente, os cortes foram lavados e incubados em câmara úmida, *overnight* e a 4°C, com anticorpos policlonal anti-(colágeno III)(Rockland). Em seguida, as lâminas foram incubadas com anticorpos secundários biotinilados (Dako) durante 30 minutos, em câmara úmida. Depois, realizamos a conjugação com os seguintes anticorpos secundários fluorescentes: Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 594, Alexa Fluor 350 ou Alexa Fluor 647 (Invitrogen). A marcação fluorescente foi amplificada pelo sistema TSA⁵ (Tyramide Signal Amplification). As lâminas foram montadas com Vectashield para evitar o esgotamento da fluorescência (Vector) e vedadas com esmalte. O material foi imediatamente fotografado em microscópio⁶, equipado com sistema de fluorescência.

⁵ New Life Science Products, Boston, MA, EUA

⁶ OLYMPUS modelo BX60

4.11 MATERIAL FOTOGRÁFICO

As fotomicrografias foram realizadas por meio do software KS400⁷. Utilizou-se o microscópio OLYMPUS⁸ e a câmera AxioCam⁹ para o procedimento.

4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística da bioquímica sérica, dos parâmetros biométricos, da morfometria do colágeno, imuno-histoquímica e imuno-fluorescência, foi empregado o programa Minitab®¹⁰, a análise de variância (ANOVA) e o pós-teste de Tukey-Kramer. Os resultados com $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

4.13 REAL TIME RT-PCR

A técnica do Real Time RT-PCR incluiu os grupos CT, 2, 6, 10 e 12, sendo que, participaram aleatoriamente da amostragem 8 animais por grupo. Através da análise do Real Time RT-PCR avaliamos a expressão gênica de genes específicos da matriz extracelular do fígado.

⁷ KS400, 4.4, marca ZEISS, ANO 2000.

⁸ Modelo BX60

⁹ Modelo HCr, marca ZEISS

¹⁰ Release 15 Statistical Software (State College, PA - EUA)

4.13.1 Extração de RNA total pelo método de colunas

O fígado dos ratos foram retirados com o auxílio de instrumental cirúrgico, fracionado em fragmentos menores (3mm^2 de diâmetro) e 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 para posterior análise. Cerca de 30mg de tecido foram pesados e macerados em β -Mercaptoetanol. Dentro de colunas portando filtros as amostras foram centrifugadas com reagentes específicos (enzimas e tampões) em várias etapas. Ao final das centrifugações as amostras foram congeladas a -80° até o momento de sua quantificação.

4.13.2 Quantificação do RNA total

Para a quantificação do RNA total a amostra foi diluída 1:4, ou seja, 40 μL de H_2O DEPC adicionada de 10 μL do RNA total e homogeneizada suavemente. A quantificação foi realizada em Biofotômetro a 260nm. A qualidade do RNA total extraído (bandas 18S e 28S) foi visualizada em gel de agarose a 1%.

4.13.3 Tratamento do RNA total com DNase I

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

1µl DNase I reaction buffer 10x
1µl da enzima DNase I (1U/µl)
H ₂ O DEPC para o volume final de 10µl

A seguir, os tubos foram mantidos a temperatura ambiente por 15 minutos. Ao término desta incubação, adicionou-se 1 µl de EDTA (25 mM) 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.

4.13.4 Transcrição Reversa (Confecção do cDNA)

Aos tubos contendo RNA total (tratados previamente com DNase I), foram adicionados 1µl 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 é continuada 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 (para retirar os resíduos de RNA da amostra de cDNA) e incubados a 37°C por 20 minutos. O cDNA será armazenado a –20°C até o momento da amplificação do cDNA.

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

Após a transcrição reversa, foi efetuado o PCR em Tempo Real (Real Time RT-PCR) no aparelho ABIPrism®¹¹. 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® é um termociclador acoplado há uma câmera CCD.

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

À medida que a reação de amplificação se processa um gráfico é construído. Neste gráfico, a ordenada corresponde ao número de cópias e a abscissa ao número de ciclos. Diferentemente do sistema tradicional de amplificação, onde o que se observa será 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 Real Time RT-PCR é possível determinar este perfil de amplificação, o que representa uma das vantagens metodológicas. O ponto na abscissa correspondente ao início do trecho linear é chamado de Ct (*cycle threshold* ou ciclo limiar) e este valor é utilizado para a comparação relativa da expressão gênica: quanto menor o Ct, teoricamente mais expressa é determinada mensagem, ou seja, a diferença de 1 Ct, representa o dobro de expressão.

O sistema adotado para a detecção da expressão gênica das substâncias-alvos e beta-actina foi o sistema TaqMan. Neste sistema, além do par de primers, é

¹¹ ABIPrism® 7000 Sequence Detection Systems (Applied Biosystems)

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 (FNQ) 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.

4.13.6 Primers e Sondas

Os primers e sondas específicos foram adquiridos junto a AppliedBiosystems® pela identificação Assay ID. Foram utilizados os seguintes primers: colágeno $\alpha 1$ (tipo I), MMP 2, TGF $\beta 1$ e PLAU.

- Colágeno I (Rn 00801649 q1)
- MMP II (Rn 01538167 m1)
- TGF $\beta 1$ (Rn 00572010 m1)
- PLAU (Rn 00695755 m1)

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. Os primers e a sonda para o β -actina foram desenhados pelo Dr. José Luis Avanzo e adquiridos junto a AppliedBiosystems©.

4.14 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Amostras de fígado medindo cerca de 5mm de diâmetro foram fixadas em glutaraldeído 2,5% em solução fosfato de sódio 0,1M com pH 7,4. As amostras foram lavadas em solução fosfato de sódio 0,1M com pH 7,4 criofraturadas em nitrogênio líquido e pós-fixadas em tetróxido de ósmio (OsO_4) 1% por 2 horas à 4°C. Em seguida, os fragmentos foram tratados com ácido tânico 1%, desidratados em concentrações crescentes de alcoóis (60%, 70%, 80%, 90%, 100%) e secas no ponto crítico pelo aparelho Balzers Union¹² com o uso de CO_2 líquido. As amostras foram montadas no suporte porta-amostra (Stub) e metalizadas com ouro pelo aparelho Emitech¹³. Os fígados foram armazenados na estufa à 40°C por 72 horas e levados ao Microscópio de Varredura¹⁴ para serem analisados e fotografados.

¹² Balzers Union CPD-020

¹³ Emitech K 550

¹⁴ Leo 435 VP (LEO Eletron Microscopy Ltda, Cambridge, UK)

5 RESULTADOS

A seguir os resultados de todas as metodologias aplicadas no experimento.

5.1 PARÂMETROS BIOMÉTRICOS

Os animais de todos os grupos, após feito o protocolo experimental, foram sacrificados e os parâmetros biométricos foram coletados em seguida. O índice hepatossomático, índice que relaciona o peso relativo do fígado (peso do fígado em relação ao peso total do animal) dos grupos 2, 4, 6, 8, 10 e 12 (4.0, 3.8, 4.0, 4.3, 4.4 e 4.7%, respectivamente), apresentou aumento gradativo ao longo dos 12 dias de administração dos FH em relação ao grupo CT (3.9 %). Consequentemente, a massa hepática obteve o mesmo aumento (Tabela 1 e Figuras 1, 2 e 3). Os itens da tabela abaixo que seguem em **negrito** representam os parâmetros considerados mais importantes.

Tabela 1 – Tabela demonstrando os parâmetros biométricos obtidos após o sacrifício dos ratos de todos os grupos experimentais (FMVZ/USP – São Paulo – 2009)

Parâmetros Biométricos	Grupo CT	Grupo 2	Grupo 4	Grupo 6	Grupo 8	Grupo 10	Grupo 12
Peso inicial do rato (g)	203,5	208,1	202,4	209,7	214,3	212,4	203,7
Peso final do rato (g)	203,0	200,3	204,9	216,3	221,5	217,3	220,3
Ganho de peso (g)	-0,5 (a;b) (6,37)	-7,8 (a) (4,03)	2,5 (b) (3,37)	6,6 (b) (6,89)	7,2 (b) (16,65)	4,9 (b) (5,90)	16,5 (c) (7,98)
Peso da carcaça (g)	165,2	163,6	165,4	172,8	177,9	173,7	172,6
Peso das vísceras (g)	37,8	36,7	37,0	43,5	43,7	43,5	47,7
Peso do fígado (g)	8,0 (a) (0,85)	8,0 (a) (0,86)	7,8 (a) (0,92)	8,6 (a) (0,59)	9,6 (b) (0,90)	9,5 (b) (0,78)	10,4 (c) (0,66)
Volume do fígado (cm³)	7,6 (a) (0,81)	7,5 (a) (0,82)	7,4 (a) (0,88)	8,0 (a) (0,53)	8,9 (b) (0,84)	8,9 (b) (0,79)	9,8 (c) (0,63)
Densidade do fígado (cm³/g)	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1
Índice vísceras/peso final (%)	18,6	18,3	18,0	20,1	19,7	20,0	21,6
Índice fígado/carcaça (%)	4,8	4,9	4,8	5,0	5,4	5,5	6,0
Índice hepatossomático (%)	3,9 (a) (0,36)	4,0 (a) (0,35)	3,8 (a) (0,41)	4,0 (a) (0,25)	4,3 (b) (0,41)	4,4 (b) (0,33)	4,7 (c) (0,16)

Legenda: As letras quando iguais na mesma linha e comparadas entre os grupos, indicam igualdade estatística ($p > 0,05$); letras diferentes representam diferença significativa ($p \leq 0,05$) quando submetidos ao teste de Tukey. O desvio padrão está indicado abaixo das médias. Grupos: CT= controle (12 dias de tratamento com solução salina 0,9%); Grupos 2, 4, 6, 8, 10 e 12 representam os dias de tratamento com FH

Legenda: *Grupos com diferença estatística em relação ao grupo CT quando submetidos ao teste Tukey ($p \leq 0,05$)

Figura 1 – Figura demonstrando os parâmetros biométricos obtidos após o sacrifício dos ratos

Legenda: *Grupos com diferença estatística em relação ao grupo CT quando submetidos ao teste Tukey ($p \leq 0,05$)

Figura 2 – Figura demonstrando os parâmetros biométricos obtidos após o sacrifício dos ratos

Legenda: *Grupos com diferença estatística em relação ao grupo CT quando submetidos ao teste Tukey ($p \leq 0,05$). O desvio padrão está representado na tabela 1

Figura 3 – Média e desvio padrão da massa hepática e do índice hepatossomático dos grupos experimentais após o período experimental

5.2 ANÁLISE SOROLÓGICA HEPÁTICA

O soro dos animais foi obtido após a centrifugação das amostras de sangue colhidas no momento do sacrifício. As amostras foram submetidas ao aparelho bioquímico VetTest® para avaliação dos indicadores enzimáticos da função hepática (Tabela 2 e Figuras 4 e 5).

Tabela 2 – Tabela demonstrando os valores médios obtidos dos parâmetros bioquímicos séricos avaliados do soro de todos os grupos experimentais (FMVZ/USP – São Paulo – 2009)

Tipo de Prova de Função Hepática	Grupo CT	Grupo 2	Grupo 4	Grupo 6	Grupo 8	Grupo 10	Grupo 12
ALB (g/dL) (3,8 – 4,8)	2,74 (a) (0,27)	1,69 (b) (0,26)	1,35 (b) (0,19)	1,46 (b) (0,20)	1,26 (b) (0,18)	1,44 (b) (0,27)	2,3 (b) (0,17)
FA (U/L) (16 – 302)	95,2 (a) (10,32)	107,2 (a) (20,01)	102,5 (a) (19,99)	97,1 (a) (23,15)	94,4 (a) (14,43)	112,8 (a) (14,65)	103,5 (a) (8,63)
ALT (U/L) (20 – 61)	40,5 (a) (7,62)	70,5 (b) (27,31)	58,9 (a,b) (10,91)	55 (a,b) (9,06)	57,6 (a,b) (15,17)	54,3 (a,b) (8,53)	62,1 (a,b) (8,21)
AST (U/L) (39 – 111)	85,2 (a) (30,18)	137,4 (b) (34,59)	130,6(a,b) (39,11)	118 (a,b) (50,82)	131,8 (a,b) (58,67)	143,1 (a,b) (53,08)	101,6 (a,b) (28,31)
GGT (U/L) (1 – 6)	0	0	0	0	0	0	0
BILT (mg/dL) (0,1 – 0,7)	< 0,14 (a) (0,09)	< 0,14 (a) (0,11)	< 0,1 (a) (0,0)	< 0,1 (a) (0,0)	< 0,1 (a) (0,0)	< 0,1 (a) (0,0)	< 0,1 (a) (0,0)
PT (g/dL) (5,3 – 6,9)	6,46 (a) (0,38)	5,25 (b) (0,38)	5,6 (b,c) (0,48)	5,85 (c) (0,13)	5,44 (b) (0,29)	5,42 (b) (0,32)	5,56 (b) (0,28)
GLO (g/dL) (1,5 – 2,8)	3,31 (a) (0,24)	3,57 (a) (0,31)	4,23 (a) (0,39)	4,38 (a) (0,18)	4,16 (a) (0,17)	3,97 (a) (0,31)	3,24 (a) (0,25)
Relação AST/ALT	2,10 (a)	1,95 (a)	2,22 (a)	2,14 (a)	2,29 (a)	2,63 (a)	1,64 (a)
Relação ALB/PT (%)	42,41 (a)	31,81 (b)	24,11 (b)	24,96 (b)	23,16 (b)	26,57 (b)	41,37 (a)

Legenda: As letras entre parênteses, quando são iguais na mesma linha, indicam igualdade estatística ($p > 0,05$) e quando são diferentes representam diferença ($p \leq 0,05$) entre os grupos quando submetidos ao teste de Tukey. Os valores entre parênteses abaixo de cada tipo de prova de função correspondem aos valores de referência. Grupos: CT= controle (12 dias de tratamento com solução salina 0,9%); Grupos 2, 4, 6, 8, 10 e 12 representam os dias de tratamento com FH. ALB= albumina do soro (g/dL); FA= fosfato alanintransferase (U/L); ALT= alanina aminotransferase (U/L); AST= aspartato aminotransferase (U/L); GGT= gama glutamil transferase (U/L); BILT= bilirrubina total (mg/dL); PT= proteína total (g/dL); Globulina (g/dL)

Figura 4 – Figura ilustrando a dosagem bioquímica sérica de enzimas em todos os grupos experimentais

Legenda: *Figura 4 e 5: Grupos com diferença estatística em relação ao grupo CT quando submetidos ao teste Tukey ($p \leq 0,05$). Os valores são representados em média. Grupos: CT= controle (12 dias de tratamento com solução salina 0,9%); Grupos 2, 4, 6, 8, 10 e 12 representam os dias de tratamento com FH. FA= fosfato alanintransferase; ALT= alanina aminotransferase; AST= aspartato aminotransferase; ALB= albumina do soro; GGT= gama glutamil transferase; BILT= bilirrubina total; PT= proteína total; GLO= Globulina

Figura 5 – Figura ilustrando a dosagem bioquímica sérica de enzimas em todos os grupos experimentais

Houve diminuição dos níveis de ALB e PT ($p \leq 0,05$) ao longo do tratamento (Tabela 2 e Figura 5). A relação ALB/PT (relação entre a albumina e a proteína total do

sangue) indica que os grupos 2, 4, 6, 8 e 10 apresentaram valores percentuais (31.81, 24.11, 24.96, 23.16 e 26.57, respectivamente) significativamente diminuídos ($p \leq 0,05$) em relação grupo CT (42.41%)(Tabela 2).

Não houve alteração ($p > 0,05$) na função hepática das enzimas FA, GGT, GLO e BILT no decorrer de todos os dias de tratamento com FH (Figuras 4 e 5). As enzimas ALT e AST obtiveram diferença estatística ($p \leq 0,05$) apenas no grupo 2 quando comparado ao grupo CT (Figura 4).

5.3 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

O fígado de todos os animais de todos os grupos experimentais foram coletados, emblocados e cortados no micrótomo. Utilizou-se as colorações H.E., Picrossírius e Reticulina para avaliar a arquitetura tecidual. Não foram constatados alterações histopatológicas significantes no fígado de nenhum grupo experimental (Figuras 6, 7, 8, 9 e 10).

Legenda: 6A-B – Fígado sadio tratado com FH por 6 dias; 6A – Coloração: H-E; 6B – Coloração: Picrossírius;
Legenda – A: artéria; V: veia; DB: ducto biliar; H: hepatócitos; VC: veia centrolobular; Barra de escala: 200µm

Figura 6 – Fotomicrografias do tecido hepático das ratas tratadas com FH por 6 dias. As figuras são representativas para todos os grupos experimentais, uma vez que, não houve alteração histopatológica em todos os grupos tratados quando comparados ao grupo controle

Legenda: CTA-B – Fígado sadio de um animal do grupo controle; CTA – Coloração: H-E; CTB – Coloração: Picrosirius; Legenda – H: hepatócitos; TP: tríade portal; Barra de escala: 100µm

Figura 7 – Fotomicrografias do tecido hepático das ratas do grupo controle. As figuras são representativas para todos os grupos experimentais, uma vez que, não houve alteração histopatológica em todos os grupos tratados quando comparados ao grupo controle

Legenda: 6A-B – Fígado sadio de um animal do grupo controle; 6A – Coloração: H-E; 6B – Coloração: Picrosírius; Legenda: VC: veia centrolobular; Barra de escala: 100µm

Figura 8 – Fotomicrografias do tecido hepático das ratas tratadas com FH por 6 dias. As figuras são representativas para todos os grupos experimentais, uma vez que, não houve alteração histopatológica em todos os grupos tratados quando comparados ao grupo controle

Legenda: CTA-B – Fígado sadio de um animal do grupo controle; CTA-B – Coloração: Picrossírius sem hematoxilina; Legenda – VC: veia centrolobular; TP: tríade portal

Figura 9 – Fotomicrografias do tecido hepático das ratas do grupo controle. As figuras são representativas para todos os grupos experimentais, uma que vez que, não houve alteração histopatológica em todos os grupos tratados quando comparados ao grupo controle

Legenda: CTA-B – Fígado sadio de um animal do grupo controle; CTA-B – Coloração: Reticulina; Legenda – VC: veia centrolobular; FR: fibras reticulares

Figura 10 – Fotomicrografias do tecido hepático das ratas do grupo controle. As figuras são representativas para todos os grupos experimentais, uma vez que, não houve alteração histopatológica em todos os grupos tratados quando comparados ao grupo controle

5.4 MORFOMETRIA DO COLÁGENO

Lâminas coradas por picrossírius e tratadas com ácido fosfomolibdico 2% tiveram a finalidade de selecionar por coloração apenas o colágeno. A morfometria através do programa KS400 (Figura 11) nos mostrou que houve redução significativa da proporção volumétrica do colágeno hepático nos grupos 6, 10 e 12, quando comparados ao grupo controle (CT). A média da área ocupada pelo colágeno no lóbulo hepático dos 10 animais de cada grupo experimental em um campo microscópico de $67.014,21\mu\text{m}^2$ foi de $162,12\mu\text{m}^2$ (0,24%) no grupo CT, $153,59\mu\text{m}^2$ (0,23%) no grupo 2, $131,04\mu\text{m}^2$ (0,19%) no grupo 6, $122,21\mu\text{m}^2$ (0,18%) no grupo 12 e $121,64\mu\text{m}^2$ (0,18%) no grupo 12 (Tabela 3; Figura 12). As médias dos grupos 6, 10 e 12 são estatisticamente diferentes da média do grupo CT quando submetidas ao teste de Tukey com $p \leq 0,05$ (Tabela 3 e Figura 12).

Legenda: A, B e C) Fígado sadio tratado por 10 dias com FH; Tecido corado por Picrosirius tratado com ácido fosfomolibdico 2%. Barra de escala: 50 μ m; D) Software KS400 fotografando o tecido; E) Seleção das fibras colágenas contrastada do fundo por limiar de cor; F) Conversão do colágeno selecionado para valores numéricos (μ m²); Legenda – Seta: colágeno; C: colágeno; VC: veia centrolobular; H: hepatócito; TP: tríade portal

Figura 11 – Fotomicrografia do fígado ilustrando a mensuração do volume de colágeno em todos os grupos experimentais com o uso do software KS400

Tabela 3 – Valores médios da área de colágeno mensurada em $67.014,21\mu\text{m}^2$ de um corte histológico do fígado de 10 animais para cada um dos grupos (FMVZ/USP – São Paulo – 2009)

Grupo	N	Área em μm^2	PV do colágeno
CT	10	162,12 (53,26) (a)	0,24%
2	10	153,59 (43,64) (a)	0,23%
6	10	131,04 (34,23) (b)	0,19%
10	10	122,21 (34,98) (b)	0,18%
12	10	121,64 (37,05) (b)	0,18%

Legenda: Letras diferentes são estatisticamente diferentes segundo o teste Tukey para o valor de $p \leq 0,05$; O desvio padrão está indicado entre parênteses; PV: Proporção volumétrica; Os grupos 2, 6, 10 e 12 receberam, respectivamente, tratamento com FH por 2, 6, 10 e 12 dias; O grupo controle recebeu tratamento com solução salina (0,9%) por 12 dias

Legenda: Grupos com diferença estatística significativa $p \leq 0,05$; Grupos: CT= controle; Grupos 2, 6, 10 e 12 representam 12 dias de tratamento com FH

Figura 12 – Comparação da média e desvio padrão da proporção volumétrica de colágeno das áreas em μm^2 em regiões dos sinusóides hepáticos dos grupos CT, 2, 6, 10 e 12

A proporção volumétrica (PV) de colágeno dos grupos 2, 6, 10 e 12 foi, respectivamente, 5,26%, 19,17%, 24,62% e 24,97% inferior à do grupo CT (Tabela 4).

Tabela 4 – Valores percentuais indicando a redução da proporção volumétrica de colágeno dos grupos 2, 6, 10 e 12 em relação ao grupo controle (CT) (FMVZ/USP – São Paulo – 2009)

Grupo	N	Redução da PV de colágeno em relação ao Grupo CT
2	10	-5,26%
6	10	-19,17%
10	10	-24,62%
12	10	-24,97%

Legenda: PV – Proporção volumétrica; grupo CT= controle; Grupos 2, 6, 10 e 12 representam os dias de tratamento com FH.

5.5 IMUNO-HISTOQUÍMICA – DETECÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR

A proliferação dos hepatócitos foi analisada por reação imuno-histoquímica para o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), sendo quantificado o número de células positivas (hepatócitos) por mm² de tecido hepático. Os resultados descritos na figura 13 demonstram menor proliferação celular dos hepatócitos nos animais do grupo controle (CT), e um pico maior de proliferação celular no grupo 2 em relação aos demais (Figuras 13 e 14).

Houve expressiva marcação de hepatócitos PCNA⁺ no grupo 2 (cerca de 4.5x maior que no CT com diferença estatística $p \leq 0,05$), diminuindo (2.5x) até o término do tratamento ($1,9 \pm 0,30$; $8,8 \pm 1,67$; $5,4 \pm 0,82$; $4,0 \pm 0,37$; $4,5 \pm 0,76$; $4,9 \pm 0,44$; $2,6 \pm 0,91$ nos grupos CT e de 2 à 12 respectivamente; valores expressos em %) (Figura 14 e Tabela 5).

Legenda: CT – Fígado de animal do grupo controle; 2) Fígado de animal do grupo 2; 12) Fígado de animal do grupo 12; As setas apontam núcleos positivos ao PCNA

Figura 13 – Fotomicrografias referentes aos testes imuno-histoquímicos realizados com a utilização de PCNA como marcador nuclear em todos os grupos experimentais

Tabela 5 – Valores percentuais indicando a marcação imuno-histoquímica positiva para proliferação celular (PCNA) em hepatócitos em todos os grupos experimentais (FMVZ/USP – São Paulo – 2009)

Grupo	N	% de células positivas para PCNA
CT	8	1,9% (0,30) (a)
2	8	8,8% (1,67) (b)
4	8	5,4% (0,82) (a)
6	8	4,0% (0,37) (a)
8	8	4,5% (0,76) (a)
10	8	4,9% (0,44) (a)
12	8	2,6% (0,91) (a)

Legenda: Letras diferentes são estatisticamente diferentes segundo o teste Tukey para o valor de $p \leq 0,05$; O desvio padrão está indicado entre parênteses

Legenda: *Grupos com diferença estatística em relação ao grupo controle ($p \leq 0,05$)

Figura 14 – Gráfico demonstrando o índice de proliferação celular dos hepatócitos em todos os grupos experimentais

5.6 IMUNOFLUORESCÊNCIA PARA COLÁGENO TIPO III

Houve redução do colágeno volumétrico tipo III em todos os grupos ($6,0 \pm 1,21$; $4,6 \pm 1,18$; $4,5 \pm 0,92$; $3,7 \pm 0,76$ – grupos CT, 2, 6 e 12 respectivamente), porém somente o grupo 12 obteve redução do colágeno com validação estatística quando comparado ao grupo controle ($p \leq 0,05$) (Figuras 15 e 16 e Tabela 6).

A) Fígado controle marcado por Imunofluorescência para colágeno tipo III; B) Software AxioCam HCr fotografando o tecido; C) Seleção das fibras colágenas constrastada do fundo por limiar de cor; D) Conversão do colágeno selecionado para valores numéricos (μm^2); E) Valores mensurados da região selecionada convertida em arquivo word; F) Fotomicrografia com inserção da barra de escala

Figura 15 – Mensuração de colágeno tipo III nos grupos CT, 2, 6 e 12 através do software AxioCAM HCr

Figura 16 – Figura demonstrando marcação positiva na reação de imunofluorescência para colágeno tipo III nos grupos CT, 2 e 12

Grupo	N	Mensuração de colágeno tipo III (%- μm^2)
CT	7	6,0 (1,21) (a)
2	7	4,6 (1,18) (a)
6	7	4,5 (0,92) (a)
12	7	3,7 (0,76) (b)

Legenda: Letras diferentes são estatisticamente diferentes segundo o teste Tukey para o valor de $p \leq 0,05$; O desvio padrão está indicado entre parênteses

Tabela 6 – Porcentagens (μm^2) da mensuração de colágeno tipo III pela técnica de imunofluorescência nos grupos CT, 2, 6 e 12 (FMVZ/USP – São Paulo – 2010)

5.7 REAL TIME RT-PCR

A análise de expressão gênica foi realizada no Departamento de Patologia (FMVZ).

5.7.1 Extração de RNA total pelo método de colunas

As amostras de fígado dos animais selecionados dos grupos CT, 2, 6, 10 e 12 (8 amostras para cada grupo) foram submetidas ao processo de extração de RNA pelo sistema de purificação e extração por colunas. Este material foi quantificado e normalizado pelo espectrofotômetro para a realização da transcrição reversa do RNA em cDNA (Quadro 2). Foi verificada a qualidade do RNA extraído pela corrida em gel de agarose 1,5% (Figura 17). O padrão das bandas 18S e 28S está representado na figura 17. A partir do cDNA foi realizado a técnica do PCR em tempo real para análise da expressão gênica de colágeno $\alpha 1$ (tipo I), TFG β 1, MMP 2 e β -actina (controle endógeno).

Algumas amostras tiveram que ser excluídas da análise por não terem cDNA de boa qualidade ou até mesmo por erro de pipetagem. Mesmo assim outras variáveis

podem ter ocorrido, fato este que não impossibilitou análise gênica pelo número de amostras que permaneceram viáveis em cada grupo.

Grupos	Amostra	Pureza	[ng/μl]	Vi (μl)	VH ₂ O (μl)
CT	1	1,62	712	1,40	6,60
	2	1,68	909	1,10	6,90
	3	1,65	733	1,36	6,64
	4	1,62	1006	0,99	7,01
	5	1,65	519	1,93	6,07
	6	1,70	661	1,51	6,49
	7	1,62	360	2,78	5,22
	8	1,63	476	2,10	5,90
2	9	1,59	794	1,26	6,74
	10	1,63	1237	0,81	7,19
	11	1,60	903	1,11	6,89
	12	1,65	1072	0,93	7,07
	13	1,60	658	1,52	6,48
	14	1,68	972	1,03	6,97
	15	1,65	904	1,11	6,89
	16	1,56	80	12,50	-4,50
6	17	1,61	1003	1,00	7,00
	18	1,65	1350	0,74	7,26
	19	1,72	2134	0,47	7,53
	20	1,62	1020	0,98	7,02
	21	1,68	1229	0,81	7,19
	22	1,64	709	1,41	6,59
	23	1,63	790	1,27	6,73
	24	1,67	803	1,25	6,75
10	25	1,68	1776	0,56	7,44
	26	1,64	1301	0,77	7,23
	27	1,63	1371	0,73	7,27
	28	1,59	795	1,26	6,74
	29	1,72	1603	0,62	7,38
	30	1,72	1151	0,87	7,13
	31	1,67	1144	0,87	7,13
	32	1,69	1164	0,86	7,14
12	33	1,59	862	1,16	6,84
	34	1,73	786	1,27	6,73
	35	1,72	769	1,30	6,70
	36	1,57	657	1,52	6,48
	37	1,65	902	1,11	6,89
	38	1,67	1101	0,91	7,09
	39	1,65	937	1,07	6,93
	40	1,67	837	1,19	6,81

Legenda: [ng/μl]: Concentração de RNA medido em espectrofotômetro; Vi: volume inicial de RNA para transcrição em cDNA; VH₂O: volume de água q.s.p. (8μl de volume final)

Quadro 2 – Quantificação do RNA extraído dos animais e cálculos para a realização da transcrição reversa (FMVZ/USP – São Paulo – 2009)

Figura 17 – Padrão de bandas do RNA (18S e 28S) em gel de agarose 1,5%, demonstrando a qualidade obtida na extração de RNA do fígado dos animais selecionados pelo método das colunas

5.7.2 Análise da expressão gênica de Colágeno α 1 (tipo 1), TGF β 1, MMP 2 e PLAU

O resultado da amplificação dos primers pelo método do PCR tempo real para as amostras dos grupos controle, 2, 6, 10 e 12 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 tratados para um determinado primer, normalizadas com fígado controle. Para isso o grupo controle foi considerado 100% ou 1. Nas figuras 18, 19, 20 e 21 e tabelas 7, 8, 9 e 10 os resultados de expressão relativa de todos os grupos estão descritos para os respectivos genes colágeno α 1, TGF β 1, MMP 2 e PLAU.

Os resultados de expressão gênica do colágeno α 1 revelaram um aumento em sua expressão relativa em relação ao grupo controle de $3,91 \pm 1,22$; $3,20 \pm 2,28$; $1,93 \pm 1,04$; $1,85 \pm 1,22$ nos respectivos grupos 2, 6, 10 e 12. O grupo 2 obteve diferença quando comparado ao grupo CT com significância estatística. Os grupos 2 e 12

também foram diferentes estatisticamente segundo o teste de Tukey (Figura 18 e Tabela 7).

Legenda: Letras diferentes são significantes estatisticamente, para o valor de $p \leq 0,05$ segundo o teste de Tukey; A coluna superior que sobrepõe a coluna inferior representa o desvio padrão

Figura 18 – Gráfico da expressão relativa do gene colágeno $\alpha 1$ no tecido hepático nos grupos experimentais CT, 2, 4, 10 e 12

Tabela 7 – Expressão relativa do RNAm de colágeno $\alpha 1$ normalizado com o RNAm da β -actina em fígado de ratos. Os valores representam a média dos grupos CT, 2, 6, 10 e 12 utilizados no experimento (FMVZ/USP – São Paulo – 2009)

Grupos	Expressão relativa
Grupo CT	1 a
N=8	-
Grupo 2	3,91 b
N=8	(1,22)
Grupo 6	3,20 a,b,c
N=6	(2,28)
Grupo 10	1,93 a,b,c
N=6	(1,04)
Grupo 12	1,85 a,c
N=7	(1,22)

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

A expressão relativa do TGF β 1 foi diferente somente entre os grupos 12 e CT. A média e desvio padrão da expressão relativa dos grupos 2, 6, 10 e 12 foram respectivamente $1,25 \pm 0,23$; $1,37 \pm 0,26$; $1,31 \pm 0,30$; $1,73 \pm 0,30$ segundo o teste Tukey (Figura 19 e Tabela 8).

Legenda: Letras diferentes são significantes estatisticamente, para o valor de $p \leq 0,05$ segundo o teste de Tukey. A coluna superior que sobrepõe a coluna inferior representa o desvio padrão

Figura 19 – Gráfico da expressão relativa do gene TGFβ1 no tecido hepático nos grupos experimentais CT, 2, 6, 10 e 12

Tabela 8 – Expressão relativa do RNAm de TGFβ1 normalizado com o RNAm da β-actina em fígado de ratos. Os valores representam a média dos grupos CT, 2, 6, 10 e 12 utilizados no experimento (FMVZ/USP – São Paulo – 2009)

Grupos	Expressão relativa
Grupo CT	1 a
N=8	-
Grupo 2	1,25 a,b
N=5	(0,23)
Grupo 6	1,37 a,b
N=4	(0,26)
Grupo 10	1,31 a,b
N=5	(0,30)
Grupo 12	1,73 b
N=5	(0,30)

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

O gene MMP 2 não obteve diferença estatística em sua expressão relativa entre todos os grupos experimentais estudados de acordo com o teste Tukey. A média e desvio padrão da expressão relativa do gene MMP 2 nos grupos 2, 6, 10 e 12 foram respectivamente $1,28 \pm 0,26$; $1,20 \pm 0,36$; $1,07 \pm 0,29$; $1,25 \pm 0,26$ (Figura 20 e Tabela 9).

Legenda: Letras iguais representam igualdade estatística ($p \geq 0,05$) segundo o teste de Tukey. A coluna superior que sobrepõe a coluna inferior representa o desvio padrão

Figura 20 – Gráfico da expressão relativa do gene MMP 2 no tecido hepático nos grupos experimentais CT, 2, 6, 10 e 12

Tabela 9 – Expressão relativa do RNAm de MMP 2 normalizado com o RNAm da β -actina em fígado de ratos. Os valores representam a média dos grupos CT, 2, 6, 10 e 12 utilizados no experimento (FMVZ/USP – São Paulo – 2009)

Grupos	Expressão relativa
Grupo CT	1 a
N=7	-
Grupo 2	1,28 a
N=8	(0,26)
Grupo 6	1,20 a
N=7	(0,36)
Grupo 10	1,07 a
N=8	(0,29)
Grupo 12	1,25 a
N=5	(0,26)

Legenda: As médias da mesma coluna seguidas por letras iguais não representam diferença estatística ($p \geq 0,05$) segundo o teste de Tukey. O desvio padrão está entre parênteses

O gene PLAU não obteve diferença estatística em sua expressão relativa entre todos os grupos experimentais estudados de acordo com o teste Tukey. A média e desvio padrão da expressão relativa do gene PLAU nos grupos 2, 6, 10 e 12 foram respectivamente $1,32 \pm 0,59$; $1,44 \pm 0,47$; $1,32 \pm 0,37$; $1,28 \pm 0,23$ (Figura 21 e Tabela 10).

Legenda: Letras iguais representam igualdade estatística ($p \geq 0,05$) segundo o teste de Tukey. A coluna superior que sobrepõe a coluna inferior representa o desvio padrão

Figura 21 – Gráfico da expressão relativa do gene PLAU no tecido hepático nos grupos experimentais CT, 2, 6, 10 e 12

Tabela 10 – Expressão relativa do RNAm de PLAU normalizado com o RNAm da β -actina em fígado de ratos. Os valores representam a média dos grupos CT, 2, 6, 10 e 12 utilizados no experimento (FMVZ/USP – São Paulo – 2009)

Grupos	Expressão relativa
Grupo CT	1 a
N=6	-
Grupo 2	1,32 a
N=5	(0,59)
Grupo 6	1,44 a
N=8	(0,47)
Grupo 10	1,32 a
N=8	(0,37)
Grupo 12	1,28 a
N=7	(0,23)

Legenda: As médias da mesma coluna seguidas por letras iguais não representam diferença estatística ($p \geq 0,05$) segundo o teste de Tukey. O desvio padrão está entre parênteses

5.8 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Microscopia eletrônica de varredura (MEV) demonstrou a presença de fibras colágenas envolvendo os hepatócitos. O grupo tratado por 12 dias com fatores hepatotróficos, o grupo 12, apresentou menor densidade volumétrica de colágeno quando comparado ao grupo controle tratado por 12 dias com solução salina 0,9% (grupo CT) (Figura 22). Esses resultados confirmam a mensuração do volume de colágeno obtido através da análise morfométrica dos grupos experimentais pelo picrossírius.

Legenda: As setas em vermelho identificam as fibras colágenas, que estão presentes em menor quantidade no grupo 12 quando comparado ao grupo CT

Figura 22 – Fotomicrografia de varredura representativa do fígado criofraturado em N₂; Grupos CT e 12 identificando fibras colágenas presentes no arcabouço fibroso que envolve os hepatócitos e as demais células do fígado

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Há uma variedade de fatores que apresentam efeitos sobre o crescimento hepático, exercendo suas ações isoladamente ou em sinergismo com outras substâncias. O fígado, como importante fonte produtora e armazenadora de matéria orgânica responde com síntese à solicitação de outro tecido em estado de carência, aumentando sua massa se necessário. Da mesma forma se recupera ou aumenta sua própria massa quando sofre agressões, por ação parácrina e autócrina, de maneira rápida, pois estaria constantemente sob ação de múltiplos fatores, produzidos por ele ou por outros tecidos, ligados ao crescimento e ao metabolismo (GORLA Jr. et. al., 2001).

Em 1985 conhecia-se pelo menos seis substâncias envolvidas no controle da regeneração hepática: Insulina, o glucagon, o fator de crescimento epidérmico (EGF), o hormônio tireoideano (T_3), cálcio e aminoácidos (BAKER, 1985).

Já foi constatado que a suplementação nutricional possui crescente importância no tratamento de doenças hepáticas (O'BRIEN; WILLIAMS, 2008), melhorando o estado imunológico e a função hepática destes pacientes. O fornecimento adequado de proteínas, vitaminas e sais minerais demonstra ser essencial para a correção da desnutrição protéica e desidratação, auxiliando na síntese de proteínas e na regeneração hepática (ROMBEAU; ROLANDELLI, 2004). Além dos principais nutrientes envolvidos na recuperação destes pacientes, é relatado a ação de alguns hormônios no metabolismo e trofismo hepático como a insulina, glucagon e o T_3 (ANKOMA-SEY, 1999; JESUS et al., 2000).

O aumento do tamanho do fígado de ratos sadios (não-hepatectomizados) por estímulo de FH tem sido demonstrado em estudos anteriores e, sabe-se que, mecanismos regenerativos participam no aumento do número de hepatócitos (PARRA et al., 1992, 1994, 1995b, 1996).

A composição da solução de fatores hepatotróficos utilizada por Parra et al. (1992, 1994, 1995b, 1996) é constituída por aminoácidos, hormônios, vitaminas, insulina,

glucagon e eletrólitos. Possui a finalidade de simular a ação de nutrientes e fatores de crescimento que ascendem ao fígado pela veia porta. O uso da via intraperitoneal para a administração desta solução baseia-se no pressuposto de que a absorção da maior parcela dessas substâncias ocorre, principalmente, através dos vasos do peritônio, fluindo para sistema porta e sinusóides hepáticos. Desta forma, a barreira representada pela mucosa do aparelho digestório nas administrações orais seria eliminada, promovendo um melhor suporte nutricional aos pacientes debilitados (PARRA et al., 1982; MATSUDA et al., 1997).

Esse trabalho relata a cinética dos FH aplicados em ratos sadios por 12 dias de tratamento. A discussão foi subdividida didaticamente em itens para facilitar a compreensão do leitor.

6.1 PARÂMETROS BIOMÉTRICOS E IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA PCNA

Comparou-se nesse trabalho o peso do fígado e os índices hepáticos relacionados ao peso vivo e corpóreo dos animais de todos os grupos experimentais confirmando os resultados de Parra quanto ao aumento do volume hepático. Os animais de todos os grupos experimentais (com exceção do grupo 2) obtiveram ganho de peso progressivo de acordo com o aumento de dias de aplicação de FH. Os dados relacionados ao crescimento hepático foram semelhantes aos descritos por Parra et al. (1992, 1996), que obtiveram um aumento entre 34,5 e 121% em animais que receberam uma dose única da solução de FH (40mg/kg), porém com alto índice de mortalidade. Guerra et al. (2009) também demonstrou em seus experimentos que ratos cirróticos tratados com FH possuem aumento de 11,3% do peso do fígado. A perda de peso (-7,2g) do grupo 2 pode estar associada ao manejo inicial na manipulação dos animais, causando um estresse e, após 2 dias de tratamento, adaptação e resposta ao medicamento (FH). O índice hepatossomático (índice relativo que relaciona o peso do fígado com o peso corpóreo do animal) dos grupos 2, 4, 6, 8, 10 e 12 (4.0, 3.8, 4.0, 4.3, 4.4 e 4.7%, respectivamente) apresentaram aumento gradativo de acordo com o aumento de dias de aplicação dos FH.

Como os animais tratados com a solução de FH apresentaram aumento de massa hepática e consequentemente aumento do índice hepatossomático em relação aos animais controles, houve hiperplasia e/ou hipertrofia celular, ocasionando o aumento de peso. Sabendo dessa possibilidade em nossos resultados e para esclarecer essa dúvida, foram realizadas lâminas dos blocos de paraplast para realizar imuno-histoquímica para PCNA (antígeno nuclear de proliferação celular). Os hepatócitos foram marcados positivamente e contados comparando os grupos experimentais com o controle. Como as células marcadas representavam células em estado mitótico, o grupo 2 apresentou-se com um pico de proliferação maior (4,5x maior do que o controle) do que os demais grupos. No entanto, o peso do fígado não acompanhou o efeito da proliferação de hepatócitos, ou seja, o volume não foi aumentado do fígado no grupo tratado por 2 dias com FH. Com o fígado aumentado no grupo 12 e com a proliferação de hepatócitos consideravelmente baixa (cerca de 2x maior que o grupo CT), há a necessidade de se mensurar a quantidade de células nos grupos experimentais com a finalidade de validar a hipótese de que a hipertrofia celular ocasionou no aumento do volume hepático. O acréscimo na taxa de proliferação deste tipo celular nos leva a reforçar a hipótese de que os FH estimulam a síntese de DNA, principalmente por parte dos hepatócitos. A avaliação da proliferação celular pela imuno-histoquímica para PCNA comprovou que houve um processo de hiperplasia, com aumento na taxa de proliferação dos hepatócitos.

A solução de FH possui triiodotironina (T_3) e sabe-se que sua administração produz aumento significativo na capacidade proliferativa. Estudos já comprovaram esse efeito em fígados intactos e em cultura de hepatócitos sobretudo quando se acrescentam glucagon, aminoácidos e heparina (SHORT, et al., 1972; LEFFERT et al., 1979; PARRA et al., 1994).

Os hormônios tireoideanos são essenciais na proliferação dos hepatócitos, modelando receptores hepáticos para o hormônio do crescimento e a expressão do gene do insulin-like growth factor-I (IGF-I). O IGF-1 diminuiu a ação metabólica dos hormônios tireoideanos sobre o fígado por redução do número e expressão de seus receptores. A Triiodotironina liga-se a receptores esteróides PPARs (peroxisome proliferator-activated receptors), cuja descoberta lança luz sobre o papel de receptores nucleares na regulação do crescimento e diferenciação dos hepatócitos

(MICHALOPOULUS; DEFRANCES, 1997; PELLIZAS et al., 1998; TORRES et al., 1999).

A triiodotironina também promove um aumento na fluidez da membrana dos hepatócitos do fígado em regeneração (DRAHOTA et al., 1999).

Em se tratando da ação da insulina, a glicose ingerida é armazenada sob forma de glicogênio e adenina, por: (1) inibição da fosforilase, impedindo a transformação do glicogênio em glicose, (2) aumento da captação de glicose pelos hepatócitos e (3) aumento da atividade de enzimas que promovem a síntese de glicogênio (fosfofrutoquinase e glicogênio sintetase). Essas ações, combinadas, resultam no armazenamento do glicogênio pelo fígado, o que pode aumentar a massa hepática em até 6% (GORLA Jr. et al., 2001).

A insulina previne ou reverte a atrofia por um processo que envolve replicação celular. Apesar disso, ela não apresenta potencial mitogênico primário. Seus sinais e o de seus receptores precisam estar presentes para que a mitogênese ocorra, mas não iniciam, por si, os eventos que levam à mitose (MICHALOPOULUS; DEFRANCES, 1997). Os sinais iniciados por catecolaminas, epinefrina e norepinefrina seriam enviados por mensageiros secundários e provavelmente participam do mecanismo de "gatilho" da regeneração hepática, enquanto a insulina intensificaria o estímulo para a regeneração (KNOPP, et al., 1997). Apesar de sua ação secundária sobre a mitogênese, as consequências de sua presença fazem com que seja considerada um dos principais fatores hepatotróficos conhecidos (GORLA Jr. et al., 2001).

A solução de FH utilizada por nós e Parra utiliza em sua composição o glucagon. Há indícios de que o glucagon não produz efeitos se administrado isoladamente e estudos em cães sugerem que se deva administrá-lo com a insulina após hepatectomia (STARZL et al., 1977; KANAZAWA, 1991). Como há indícios de sua participação na síntese de DNA, a participação do glucagon parece ocorrer sinergeticamente com outros compostos químicos incluindo a insulina participando da proliferação celular (WHITTEMORE et al., 1975).

6.2 ANÁLISES SOROLÓGICAS

As amostras sanguíneas coletadas foram centrifugadas para obtenção dos soros, os quais passaram por análise bioquímica, a fim de se estudar a função hepática ao longo de 12 dias de tratamento com os FH. Houve diminuição dos níveis de albumina e PT ao longo do tratamento. A relação ALB/PT (relação entre a albumina e a proteína total do sangue) indica que os grupos 2, 4, 6, 8 e 10 (31,81%, 24,11%, 24,96%, 23,16% e 26,57%, respectivamente) apresentaram valores percentuais significativamente diminuídos em relação grupo CT (42,41%), sinalizando quadro de hipoproteinemia. Mesmo com a diminuição da albumina, não se pode afirmar que houve dano hepatocelular já que a hipoalbuminemia não é exclusiva de doenças hepáticas. Nenhum dos outros testes de função hepática, indicadores mais sensíveis, apresentaram aumento em seus níveis, quadro que caracterizaria algum tipo de lesão do fígado. As enzimas ALT e AST obtiveram diferença estatística apenas no grupo 2. Acredita-se que a adaptação metabólica dos FH no organismo dos animais causaram uma leve alteração no quadro dessas enzimas nos 2 primeiros dias de tratamento, uma vez que os níveis de ALT e AST voltaram ao normal até o fim do tratamento (grupos 4, 6, 8, 10 e 12).

O estudo destas enzimas em fígados que receberam os FH é de grande importância para o conhecimento do quadro funcional hepático dos animais submetidos a tal tratamento. Os resultados de todos os níveis sorológicos hepáticos durante todo o tratamento inferem que, o uso da solução de FH não compromete a função hepática em fígados tratados por FH.

6.3 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA E MACROSCOPIA

Todas as estruturas do tecido avaliados pelo exame histopatológicos revelaram-se normais. Foram feitas colorações por Picrossírius, H.E. e Reticulina que comprovaram a preservação do parênquima hepático. A morfometria do colágeno em tecidos corados por picrossírius tratado com ácido fosfomolibdico 2% mostrou a

redução significativa da proporção volumétrica do colágeno hepático nos grupos 6, 10 e 12, quando comparados ao grupo controle (CT). Foram calculadas as médias da área ocupada pelo colágeno no lóbulo hepático dos 10 animais de cada grupo experimental em um campo microscópico. As médias dos grupos 6, 10 e 12 foram estatisticamente diferentes da média do grupo CT quando submetidas ao teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

A avaliação macroscópica do fígado não revelou nenhuma anormalidade. Apenas o volume do fígado foi aumentado devido a aplicação dos FH conforme comprovado nas análises biométricas.

6.4 QUANTIFICAÇÃO DO COLÁGENO

A proporção volumétrica (PV) de colágeno foi menor nos grupos 6, 10 e 12 (respectivamente 19,17%, 24,62% e 24,97%). O presente experimento confirma os dados de Parra et al. (1996), que mostrou em seus estudos com ratos hepatectomizados tratados com FH um aumento da massa hepática, bem como mudanças na matriz extracelular, especialmente na redução dos componentes do colágeno, fato também observado nos ratos sadios deste estudo. Parra et al. (1996) realizou uma comparação dos teores de colágeno hepático em um grupo de ratos sete dias após hepatectomia de 70%, com média de crescimento da massa residual de 71,55% e outro grupo, sete dias após estimulação do crescimento de seus fígados sadios, com média de 121,05% pela administração intraperitoneal (portal) de FH, revelando um crescimento hepático nos fígados hepatectomizados e nos sadios estimulados pelos FH, ambos os grupos com defasagem na produção de colágeno. Guerra et al. (2009) demonstrou que animais cirróticos tratados com os mesmos FH por 10 dias obtiveram redução de 37,1% do colágeno volumétrico hepático. Mesmo tratando-se de modelos experimentais diferentes (ratos sadios, hepatectomizados, cirróticos), a aplicação dos FH reduziram o volume de colágeno no fígado.

Trabalhos envolvendo fibrose hepática induzida, onde os animais foram tratados com 40ml/kg de FH por via intraperitoneal durante dez dias consecutivos (em uma

dose diária) mostraram resultados semelhantes aos nossos quanto à redução da proporção volumétrica do colágeno. O colágeno do fígado com fibrose induzida reduziu cerca de 43% nos animais do grupo tratado com FH, ao passo que o colágeno do grupo controle (tratados com solução salina na mesma dosagem) permaneceu constante. Essa diminuição do colágeno também foi observada em nossos animais sadios e não-hepatectomizados tratados com FH (PARRA et al., 1996).

A redução de colágeno observada neste e nos experimentos descritos acima demonstram que o tecido hepático está se reorganizando de forma que seu arcabouço fibroso suporte a quantidade de células que sofreram mitose induzida pelos FH. Assim, as células estreladas sintetizam menos colágeno aumentando a predominância das células hepáticas. Uma análise morfométrica do espaço entre as fibras colágenas e reticulares e hepatócitos no parênquima hepático também poderiam afirmar essa hipótese que está baseada em índices de proliferação celular e diminuição do volume do colágeno.

6.5 IMUNOFLUORESCÊNCIA PARA COLÁGENO TIPO III

A matriz extracelular do fígado apresenta os colágenos: tipo I, III, V, VI, VII e IV (na membrana basal das células). Os hepatócitos e células estreladas sintetizam colágeno tipo I, III e IV; células ductais e endoteliais produzem apenas colágeno tipo IV dentre os principais tipos de colágenos do fígado. Os colágenos tipo I e III estão presentes na cápsula do fígado, tríade portal e espaço de Disse, assumindo a maior quantidade de colágeno presente no fígado. A análise morfométrica pelo picrossírius e pela imunofluorescência para colágeno tipo III permitiu demonstrar a redução desses tipos de colágenos, sendo que o colágeno tipo III foi avaliado com maior precisão pela técnica de imunofluorescência.

Durante o período de aplicação dos FH a imunofluorescência para colágeno tipo III evidenciou que aos 12 dias de tratamento, o volume de colágeno tipo III diminuiu consideravelmente ($p \leq 0,005$). A mensuração ocorreu no espaço de Disse (região

com maior acúmulo de colágeno tipo III), o que sugere uma redução do colágeno no parênquima hepático causado pela ação dos FH. A especificidade da técnica permite fazer a análise de outros tipos de colágenos com a finalidade de comparar entre os tipos de colágenos hepáticos qual(is) deles reduz seu volume no fígado em maior ou menor proporção volumétrica.

A importância da regressão do volume de colágeno tipo III no fígado é a mesma citada no item de quantificação do colágeno. Porém podem existir tipos de colágeno que cooperem melhor para a reformulação de um arcabouço hepático mais espaçado. O colágeno tipo III é um deles, que atua reduzindo sua quantidade provavelmente pela baixa atividade de síntese das células estreladas. Essas modificações ocorreram devido à presença dos FH aplicados por 12 dias

6.6 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) realizada nos fígados tratados dos grupos experimentais teve como objetivo apenas ilustrar as fibras colágenas presentes no tecido. A MEV foi utilizada como um método qualitativo no qual pode-se verificar diferença da quantidade de fibras colágenas presentes no tecido criofraturado dos grupos CT e 12. O grupo controle apresentou maior volume de colágeno nos sinusóides hepáticos. Os FH demonstram atuar na matriz extracelular reduzindo o volume de colágeno já comprovado pela técnica de picrossírius (já comprovado por PARRA et al., 1996) e demonstrando ainda a disposição tridimensional e arquitetônica desse tipo de fibra.

6.7 AVALIAÇÃO GÊNICA

A matriz extracelular (MEC) é um complexo estrutural que cerca e apóia as células encontradas nos tecidos. A MEC é referida geralmente como tecido conjuntivo. A regulação da matriz extracelular é realizada pela interação de diversos moduladores

gênicos. Uma grande família de genes está envolvida na regulação da MEC do fígado sendo que alguns dos principais são as metaloproteinases (MMPs), inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMP), ativadores e inibidores de plasminogênio (PLAU), fator transformador do crescimento $\beta 1$ (TGF $\beta 1$), fator de necrose tumoral $\alpha 1$ (TNF $\alpha 1$), colágeno tipo I e III, etc.

Os fatores hepatotróficos se mostraram eficientes na inibição da expressão de genes pró-fibrogênicos, como o colágeno $\alpha 1$ e TGF $\beta 1$ que atuam direta e indiretamente na produção e deposição de ECM, na ativação de células estreladas (hepatic stell cells – HSCs) e na inativação de enzimas pró-fibróticas. A expressão gênica de MMP 2 e PLAU não foram alteradas durante a aplicação de FH (ZHANG et al., 1999, 2005; FRIEDMAN, 2000; LEE et al., 2003).

6.7.1 Expressão gênica de Colágeno Tipo I

O colágeno tipo I consiste de três cadeias polipeptídicas, cada uma com peso molecular de aproximadamente 95 kDa, que se associam em uma estrutura de tripla hélice (ILMURO et al., 2003). Esse colágeno fibrilar é regulado positivamente pelo TGF $\beta 1$, que atua sobre as HSCs ativadas (CASINI, 1993). A produção de colágeno tipo I pelas HSCs pode ser bloqueada por antioxidantes (LEE et al., 1995). A degradação do colágeno I é realizada pelas collagenases, ou seja, as metaloproteinases (MMPs) 1, 8 e 13 (SCHAEFER et al., 2003).

Estudos demonstraram que a expressão gênica de pro-colágeno $\alpha 1$ e MMP 13 são reciprocamente modulados, portanto, fatores de transcrição requeridos para a produção de colágeno tipo I devem regular negativamente MMPs e vice-versa (ROJKIND, 1999; SCHAEFER et al., 2003).

Entre os grupos estudados nesse experimento, o grupo 2, cujo tratamento com FHs se deu por 2 dias, apresentou uma alta expressão de colágeno quando comparado a todos os demais grupos. A solução de FHs promove uma ativação de células estreladas, células essas responsáveis pela deposição de colágeno. No entanto, os

demais grupos tratados reduzem a expressão de colágeno. Com o grupo controle apresentando uma expressão de colágeno menor que o grupo 2, observa-se que os FHs quando aplicados promovem uma ativação de HSCs por 2 dias após o tratamento inicial, diminuindo a expressão de colágeno com o decorrer dos dias de aplicação de FH. Mesmo com a aplicação de FH aumentando a expressão de colágeno, a análise de morfometria de colágeno revela que o colágeno diminui com o decorrer do tratamento quando comparado ao grupo CT. Verificamos então que a expressão gênica não corresponde quantidade de protéica do colágeno, uma vez que a expressão está alta e a quantidade de colágeno baixa. A expressão relativa do colágeno tipo I de 1,0; $3,91 \pm 1,22$; $3,20 \pm 2,28$; $1,93 \pm 1,04$; $1,85 \pm 1,22$ nos respectivos grupos CT, 2, 6, 10 e 12 confirmam esta comparação gênica com a protéica.

A inativação das HSCs tem como consequência a parada da produção de colágeno. A aplicação de FH tem uma importante ação cinética celular onde, apesar de aumentar e regredir a expressão gênica de colágeno no decorrer do tratamento, diminui o volume de colágeno no parênquima hepático comprovado por análises morfométricas. Uma vez que a produção de colágeno diminui, em hepatopatias onde a fibrose é o principal fator limitante da doença essa regressão torna-se extremamente importante. Fibroses de etiologias virais, causadas por hepatites ou ainda de origem medicamentosa, tanto em animais quanto em humanos, são patologias que poderiam ser tratadas por agentes que reduzem o colágeno no arcabouço hepático. Os FH atuam na redução da expressão gênica de colágeno e na diminuição da proliferação celular, mostram que os FH atuam sincronizando suas ações no fígado.

6.7.2 Expressão gênica de TGF β 1

O TGF β 1 controla o crescimento hepático em fígados sadios 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 à regeneração hepática limitada. É contraditório que os níveis de mRNA e proteínas de TGF β 1

sejam baixos em fígados saudáveis de roedores e humanos e altos na regeneração hepática, desenvolvimento, resposta inflamatória para injúria tecidual, fibrose hepática e carcinoma hepatocelular (BRAUN et al., 1988; CARR et al., 1989; CZAJA et al., 1989; FRANCAVILLA et al., 1991; NAGY et al., 1991; ANNONI et al., 1992; BEDOSSA et al., 1995; DELHAYE et al., 1999).

Os resultados da análise da expressão relativa de TGF β 1 nos grupos experimentais revelaram um aumento significativo de sua expressão no grupo 12. Como a proliferação celular diminuiu com o decorrer do tratamento (PCNA), os FHs parecem ter ativado o TGF β 1, que por sua vez, inibiu a proliferação hepatocitária. Há o aumento da expressão de TGF β 1 no decorrer do tratamento, sendo que a proliferação hepatocitária diminui ao longo do tratamento. Logo, percebe-se que o TGF β 1 auxilia na sinalização da proliferação celular aos 12 dias de tratamento, uma vez que, o fígado possui um volume pré-determinado em sua formação, não podendo ultrapassar excessivamente seu volume pré-estabelecido. Com a ajuda dos FH, o fígado ultrapassa o volume pré-estabelecido crescendo até seu limite topográfico por influência de fatores exógenos.

A ação gênica do TGF β 1 demonstra que em casos cirúrgicos onde é obrigatória a hepatectomia de mais de 70% do volume hepático, e em que, é necessário o aumento do volume hepático remanescente em hepatopatias, a aplicação dos FH torna-se altamente importante aumentando o tamanho do fígado. Assim, o volume do fígado remanescente aumenta permitindo uma hepatectomia e sobrevida com maior êxito. O fígado remanescente aumentado pela ação do FH responde positivamente quanto ao metabolismo e função hepática, e consequentemente dá maior sucesso ao procedimento cirúrgico.

A diminuição da degradação da MEC durante a injúria crônica hepática deve ser atribuída a ação do TGF β 1 através da ativação de HSCs, levando a uma maior expressão de enzimas fibrogênicas. É também atribuído ao TGF β 1 a síntese e ativação de MMP 2, citocinas inflamatórias e a estimulação da proliferação das HSCs. Sendo assim, o TGF β 1 pode ser considerado um indutor da síntese de colágeno e do processo de fibrogênese (CASINI et al., 1993; MARTI et al., 1993; KNITTEL et al., 1996; MARGOLIN et al., 1997; TSUKAMOTO et al., 1999; ZHANG et

al., 1999; NAKAMURA et al., 2000; MARTELLLI-JUNIOR et al., 2003). Além da redução da degradação da matriz o TGF β 1 estimula a síntese de todos componentes da matriz produzidos pelas HSCs (KNITTEL et al., 1996).

No entanto, o efeito fibrogênico do TGF β 1 não ocorreu no tratamento dos animais por 12 dias, uma vez que o aumento de TGF β 1 foi inversamente proporcional ao aumento de colágeno. Essa ação é evidenciada na figura 19 e tabela 8 do TGF β 1 e figura 18 e tabela 7 do colágeno α 1 (tipo I). O TGF β 1 apresenta várias ações dentre elas sua atuação fibrogênica. Apesar disso, sua ação relacionada ao bloqueio do estímulo da proliferação dos hepatócitos parece ser mais evidente no tratamento do fígado com FHs. Apesar deste resultado controverso o TGF β 1 comprova sua ação na inibição da proliferação celular, impedindo o aumento de volume hepático de forma a prejudicar seus limites biológicos e consequentemente topográficos.

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 (LEE et al., 2003; SCHAEFER et al., 2003; DI SARIO et al., 2004), estromelinas e a metaloproteinase de membrana I (MT1-MMP) (KNITTEL, 1999). Porém, no fígado as MMPs são produzidas principalmente por HSC quiescentes. Já foi demonstrado 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. 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 MEC que ocorre durante vários processos patofisiológicos, incluindo reparo tissular, reparo de feridas, fibrose e invasão tumoral (LEE et al., 2003).

6.7.3 Expressão gênica de MMP 2

As MMPs são secretadas no espaço extracelular como proenzimas, na qual tem ativadores específicos, normalmente mecanismos de clivagem associado a superfícies celulares. Também é expressa em miofibroblastos, e em baixos níveis nas células de Kupffer. A MMP 2 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).

Em nossos resultados a MMP 2 não demonstrou participar de forma efetiva no mecanismo de ação dos FHs. Não houve diferença estatística em todos os grupos experimentais estudados. Acredita-se que a MMP 2 estivesse menos expressa nos grupos tratados por mais de 8 dias, inativando menos HSC e conseqüentemente produzindo menos colágeno. A ausência de degradação da matriz extracelular ocorreu porque a remodelação da MEC já estava ocorrendo pela baixa síntese de colágeno pelas HSCs, e não por degradação pelas MMPs. Mesmo assim, a análise de outras MMPs torna-se extremamente importante para determinar melhor os mecanismos envolvidos na ação dos FHs.

As MMPs podem ser divididas em quatro grupos: collagenases (MMP 1, 8 e 13), degradadoras de colágenos fibrilares, ou seja, colágenos tipo 1, 2 e 3; gelatinases (MMP 2 e 9), as quais clivam colágenos desnaturados, ou seja, colágeno tipo IV (membrana basal), V e II (elastina); estromelisinases (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 7 (KNITTEL et al., 1999; MIZUTANI et al., 2001).

6.7.4 Expressão gênica de PLAU

A avaliação da expressão gênica de PLAU não revelou nenhuma diferença entre os grupos estudados. PLAU é um importante regulador do balanço entre as atividades proteolíticas e antiproteolíticas que determinam o “*turnover*” da MEC, iniciando a cascata proteolítica importante na remodelação tecidual associada com regeneração hepática ou fibrose (LEYLAND et al., 1996; ZHANG, et al., 1999).

Todavia, expressão de ativadores de plasminogênio é baixa ou indetectável em fígados de ratos normais. Estudos em fígados após hepatectomias e em fígados cirróticos demonstraram alterações na expressão de PLAU. Em fígados tratados por FH a expressão gênica de PLAU foi igual em todos os grupos tratados sem diferença estatística (QUAX et al., 1990; THORNTON et al., 1994; SEKI, 1996; ZHANG et al., 1999).

Por atuar na proteólise de MEC, como organogênese, remodelação tecidual, inflamação, invasão tumoral, metástase e migração celular, esperava-se que os grupos tratados por mais dias com FH apresentassem níveis maiores de expressão do PLAU. Como não foi necessário haver fibrólise direta e indireta uma vez que, o colágeno já estava reduzindo por estar sendo sintetizado em menor quantidade, não houve alteração na expressão de PLAU. O gene PLAU também está relacionado com a ativação de fatores de crescimento e tem participação no mecanismo de proliferação de hepatócitos (DANO et al., 1985; VASSALLI et al., 1991; ANDREASEN et al., 1997; HAMADA et al., 1997; AKAO et al., 2002; MANGNALL et al., 2003).

Como a matriz extracelular é mediada por diversos agentes como TGF β 1, Col I, III, IV, metaloproteinases, PLAU, TIMP, HGF, TNF, interleucinas, torna-se necessário o estudo de uma maior quantidade de genes com a finalidade de revelar a cascata de eventos que estão ocorrendo em fígados submetidos ao tratamento com FH. A MEC possui componentes que reagem a fatores exógenos, endógenos, patologias, que por sua vez, aumentam ou diminuem expressões de genes ativando ou inibindo receptores e células que exercerão funções específicas.

O estudo da expressão gênica de moduladores da matriz extracelular do tecido hepático ainda é escasso e necessita de maiores investigações. São inúmeros os mecanismos envolvidos na regulação da MEC nos estudos em animais saudáveis, no entanto praticamente inexistem estudos em animais tratados com os FHs.

6.8 A APLICAÇÃO DE FH VIA INTRAPERITONEAL

A composição da solução utilizada nesta pesquisa teve a finalidade de simular a ação de elementos que ascendem ao fígado pela veia porta, conhecida no seu conjunto como fatores hepatotróficos. O uso da via intraperitoneal para a administração dos fatores hepatotróficos preconizada neste experimento se baseia no pressuposto de que a absorção da maior parcela dessas substâncias ocorre principalmente através dos vasos do peritônio visceral, fluindo para sistema porta. Desta forma a barreira física representada pela mucosa do aparelho digestório que limita a absorção de nutrientes nas administrações orais é eliminada.

A aplicação das soluções em estudo por via intraperitoneal substitui a dificuldade em manter o animal cateterizado por via portal durante uma ou mais semanas. Contudo, tem-se verificado que fatores hepatotróficos exógenos tem maior efeito quando introduzido através de uma veia portal, mimetizando seu percurso fisiológico quando comparado a outra administração como pela veia periférica (PARRA et al., 1992,1995).

Toda nutrição parenteral de curta duração de caráter venoso central pode resultar em sepse que pode ser fatal para pacientes imunocomprometidos. É prudente a inserção de cateter de lúmen único, em forma de túnel, por via subcutânea para nutrição parenteral por mais de quatro dias, além de cuidados extras que devem ser tomados para prevenção de sepse na via do cateter.

A perspectiva de estimular a regeneração hepática através da administração de fatores hepatotróficos por via portal tem grande aplicabilidade clínica, tanto em situações de redução do tamanho do fígado após hepatectomia ou necrose dos

hepatócitos (hepatite e abscessos) e em situações que envolvem o fígado intacto, como nos casos de transplantes de doadores inter-vivos, onde o receptor com um fígado reduzido (por hepatopatia ou hepatectomia) tem a oportunidade de aumentar sua massa hepática pelos FH, permitindo assim um procedimento cirúrgico com maior chance de sobrevida.

O expressivo aumento de massa hepática observado por Parra et al. (1992, 1994, 1995b, 1996) em seu tratamento com FH pode ter várias aplicações, como estimular o crescimento do fígado antes ou depois do transplante inter-vivos, acelerar o processo de regeneração hepática após hepatectomia parcial (COGLIATI et al., 2004; MIRANDA et al., 2005), ou mesmo diminuir o colágeno em fígados com fibrose ou cirróticos (PEREIRA et al., 2003; HERNANDEZ-BLAZQUEZ et al., 2005; GUERRA et al., 2009). Estas observações tornam-se importantes na perspectiva de tratamento hepático, principalmente em casos de fibrose e cirrose hepática, transplantes, hepatectomias e demais hepatologias, tanto em humanos quanto em animais, fornecendo contribuições clínico-cirúrgicas para o bem estar do paciente.

7 CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

Após a análise dos resultados pode-se concluir que:

A aplicação dos fatores hepatotróficos em ratos Wistar aumenta a massa hepática confirmando os efeitos mitogênicos da solução. A proliferação celular foi maior nos 2 primeiros dias de tratamento e a medida que a proliferação celular diminuiu no decorrer da aplicação dos FH, também diminui a proporção volumétrica do colágeno, o que é coerente com a menor expressão do gene para colágeno tipo I ao longo do experimento. A redução do colágeno tipo III no grupo 12 pela técnica de imunofluorescência e a diminuição do colágeno total do estroma aos 8, 10 e 12 dias de aplicação dos FH por análise morfométrica do picrossírius comprova a reorganização das fibras do parênquima hepático. Dessa forma, o estroma hepático se recompôs de tal maneira que as células proliferadas se rearranjaram no arcabouço fibroso até o final do tratamento. O aumento da proliferação celular pode estar relacionado com a diminuição de produção de colágeno ao longo das aplicações dos FHs.

A avaliação gênica revelou que a expressão de colágeno tipo I está alta nos primeiros dias de tratamento, diminuindo aos 12 dias de aplicação dos FH. A proliferação hepatocitária e a expressão de colágeno diminuem simultaneamente indicando que os FH induzem a parada ou diminuição da proliferação celular e síntese de colágeno. O TGF β 1 foi mais expresso aos 12 dias de tratamento, comprovando sua ação inibitória da proliferação celular uma vez que, com o fígado sendo estimulado por FH exógenos, há um limite biológico no qual o fígado tem que cessar seu crescimento devido a sua limitação topográfica. A MMP 2 (responsável pela degradação de colágeno) e o gene PLAU (responsável pela fibrólise direta e indireta) demonstraram não sofrer nenhuma interferência sob a ação dos FH. Com a expressão normal de MMP 2 e PLAU e a redução da expressão do colágeno, a diminuição da síntese de colágeno pelas células estreladas explica a inalteração desses genes.

A ação dos FH também não alterou as enzimas hepáticas na análise sorológica. Os níveis plasmáticos das enzimas foram normais indicando ausência de hepatopatias no sistema biliar e hepatocitário.

O tratamento com FH pela via intraperitoneal demonstrou ser eficiente pelos resultados obtidos nesse experimento e pela ausência de mortalidade. No entanto, outras vias de aplicação de fatores hepatotróficos exógenas também são possíveis como o uso de cateter via venosa (portacath), onde, a mimetização da via de nutrição esplênica pode tornar os efeitos cinéticos dos FH mais eficientes. Para tanto, há a necessidade de se criar um modelo experimental. A aplicação via intraperitoneal apesar de obter eficiente absorção e ação de seus compostos, possui um volume muito grande da solução aplicada no abdômen do animal. A via portal ou a aplicação de soluções de metabolização hepática pelo sistema venoso central pode favorecer o metabolismo da solução em questão, reduzindo estresse de manipulação do animal e introduzindo um volume de FH correspondente ao seu tempo fisiológico de absorção.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ADDREIS, P. G.; WHITFIELD, J. F.; ARMATO, U. Stimulation of DNA synthesis and mitosis of hepatocytes in primary cultures of neonatal rat liver by arachidonic acid and prostaglandins. **Experimental Cell Research**, v. 134, p. 265-272, 1981.
- 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**, v. 107, n. 3-4, p. 169-174, 2002.
- ALISON, M. R. Regulation of hepatic growth. **Physiological Reviews**, v. 66, p. 499-541, 1986.
- ALWAYN, I. P. J.; VERBESEY, J. E.; KIM, S.; ROY, R.; ARENAULT, D. A.; GREENE, A. K.; NOVAK, K.; LAFORME, A.; LEE, S.; MOSES, M. A.; PUDER, M. A critical role for matrix metalloproteinases in liver regeneration. **Journal of Surgical Research**, v. 145, p. 192-198, 2008.
- ANDREASEN, P. A.; KJOLLER, L.; CHRISTENSEN, L.; DUFFY, M. The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: a review. **International Journal of Cancer**, v. 72, n. 1, p. 1-22, 1997.
- ANKOMA-SEY, V. Hepatic regeneration-revisiting the myth of Prometheus. **News in Physiological Sciences**, v. 14, p. 149-155, 1999.
- ANNONI, G.; WEINER, F. R.; ZERN, M. A. Increased transforming growth factor-beta 1 gene expression in human liver disease. **Journal of Hepatology**, v. 14, n. 2-3, p. 259-264, 1992.
- ARIAS, I. M.; BOYER, J. L.; FAUSTO, N.; JACOBY, W. B.; SCHACHTER, D.; SHAFRITZ, D. A. **The liver: biology and pathobiology**. 3. ed. 1994. 1628 p.
- ARMATO, U.; ANDREIS, P. G. Prostaglandins of the F series are extremely powerful growth factors for primary neonatal rat hepatocytes. **Life Sciences**, v. 33; p. 1745-1755, 1983.
- ASSYS, N.; MINUK, G. Y. Liver regeneration: methods for monitoring and their applications. **Journal of Hepatology**, v. 26, n. 4, p. 945-952, 1997.

BAKER, A. L. Hepatotrophic factors: basic concepts and clinical implications. **Acta Medica Scandinavica Supplement**, v. 8, n. 201, p. 703, 1985.

BANCROFT, J. D.; GAMBLE, M. **Theory and practice of histological techniques**, 5. ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 2002. 796 p.

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

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

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**, v. 21, n. 3, p. 760-766, 1995.

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

BISSEL, M.; CARON, J. M.; BABISS, L. E.; FRIEDMAN S. Transcriptional regulation of the albumin gene in cultured rat hepatocytes: role of basement-membrane matrix. **Molecular Biology Medical**, v. 7, 187-197, 1990.

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.

BODE, W.; FERNANDEZ-CATALAN, C.; GRAMS, F.; GOMS-RUTH, F. X.; NAGASE, H.; TSCHESCHE, H.; MASKOS, K. Insights into MMP-TIMP interactions. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 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 regeneration: a possible paracrine mechanism of growth regulation. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 85, n. 5, p. 1539-1543, 1988.

BRENNER, D. A.; KOCH, K. S.; LEFFERT, H. L. Transforming growth factor- α stimulates proto-oncogene c-jun expression and a mitogenic program in primary cultures of adult rat hepatocytes. **DNA and Cell Biology**, v. 8, p. 279- 285, 1989.

BUCHER N. L.; PATEL, U.; COHEN, S. Hormonal factors concerned with liver regeneration. **Ciba Foundation Symposium**, n. 55, 95-107, 1977.

BUCHER, N. L. R. Regeneration of the mammalian liver. **International Review of Cytology**, v. 15, p. 245-300, 1963.

BUCHER, N. L. R.; SWAFFIELD, M. N. Regulation of hepatic regeneration in rats by synergistic action of insulin and glucagon. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 72, p. 1157-1160, 1975.

BUSSO, 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**, v. 20, n. 1, p. 186-190, 1994.

CALLERY, M. P.; MANGINO, M. J.; FLYE, M. W. Kupffer cell prostaglandin- E_2 production is amplified during hepatic regeneration. **Hepatology**, v. 14, p. 368-372, 1990.

CANZANELLI, A.; RAPPORT, D.; GUILD, R. Control of liver regeneration and nucleic acid content by the thyroid, with observations on the effects of pyrimidines. **American Journal of Physiology**, v. 157, p. 225-33, 1949.

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**, v. 105, n. 1, p. 245-253, 1993.

CASTRO E SILVA JR., O.; CENEVIVA, R.; FERREIRA, A. L.; FOSS, M. C.; DE-LUCCA, F. L. Liver trophism in dogs made diabetic by total pancreatectomy or alloxan administration. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 20, p. 269-276, 1987.

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**, v. 13, p. 431-437, 1995.

CHANDA, S.; MEHENDALE, H. M. Nutritional modulation of the final outcome of hepatotoxic injury by energy substrates: an hypothesis for the mechanism. **Medical Hypotheses**, v. 46, n. 3, p. 261-268, 1996.

CHEN, Y. P.; DAI, L.; WANG, J. L.; ZHU, Y. F.; FENG, X. R.; HOU, J. L. Model consisting of ultrasonographic and simple blood indexes accurately identify compensated hepatitis B cirrhosis. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 23, n. 8, p. 1228-1234, 2008.

CLOSE, B.; BANISTER, K.; BAUMANS, V.; BERNOTH, E. M.; BROMAGE, N.; BUNYAN, J.; ERHARDT, W.; FLECKNELL, P.; GREGORY, N.; HACKBARTH, H.; MORTON, D.; WARWICK, C. Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 1. DGXI of the European Commission. **Laboratory Animals**, v. 30, n. 4, p. 293-316, 1996.

CLOSE, B.; BANISTER, K.; BAUMANS, V.; BERNOTH, E. M.; BROMAGE, N.; BUNYAN, J.; ERHARDT, W.; FLECKNELL, P.; GREGORY, N.; HACKBARTH, H.; MORTON, D.; WARWICK, C. Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 2. DGXI of the European Commission. **Laboratory Animals**, v. 31, n. 1, p. 1-32, 1997.

COGLIATI, B.; PEREIRA, H. M.; PARRA, O. M.; DA SILVA, J. R. M.; HERNANDEZ-BLAZQUEZ, F. J. Avaliação da proliferação celular hepática após a administração de fatores hepatotróficos em ratos hepatectomizados. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 12, 2004, Ribeirão Preto. **Anais**. Disponível em: <http://www.usp.br/siicusp/12osiicusp/ficha1116.htm>>. Acessado em 25/04/2008.

CORMACK, D. H. **Fundamentos de histologia**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. p. 371.

COSTA, A.; SMORLESI, L. Il ripristino del fegato e la reversione rapida della cirrosi da CC14 dopo asportazione di larga parte del fegato cirrotico. **Archivio De Vecchi Anatomicopathologic**, v. 16, p. 49-70, 1951.

CRUISE, J. L.; HOUCK, K. A.; MICHALOPOULOS, G. K. Induction of DNA synthesis in cultured rat hepatocytes through stimulation of alpha-1 adrenoreceptor by norepinephrine. **Science**, v. 227, p. 749-751, 1985.

CRUISE, J. L.; KNECHTLE, S.; BOLLINGER, R.; KUHN, C.; MICHALOPOULOS, G. K. α_1 – Adrenergic effects and liver regeneration. **Hepatology**, v. 7, p. 1189-1194, 1987.

CRUISE, J. L.; MUGA, S. J.; LEE, Y. S.; MICHALOPOULOS, G. K. Regulation of hepatocyte cell growth: alpha-1 adrenergic receptor and ras r21 changes in liver regeneration. **Journal of Cellular Physiology**, v. 140, p. 195-201, 1988.

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**, v. 1, n. 3, p. 219-226, 1989.

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**, 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. Hepatocyte proliferative activity in human liver cirrhosis. **Journal of Hepatology**, v. 30, n. 3, p. 461-471, 1999.

DIEHL, A. M.; RAI, R. Review: regulation of liver regeneration by pro-inflammatory cytokines. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 11, n. 5, p. 466-470, 1996.

DRAHOTA, Z.; RAUCHOVÁ, H.; SEDLÁK, V.; KOCI, J.; CERVINKOVÁ, Z.; The effect of triiodothyronine on changes of membrane fluidity in regenerating rat liver. **Physiology Research**, v. 48, n. 2, p. 167-170, 1999.

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**, v. 667, p. 13-31, 1992.

EXTON, J. H. Role of phosphoinositides in the regulation of liver function. **Hepatology**, v. 8, p. 152-166, 1988.

FAUSTO N. Growth factors in liver development, regeneration and carcinogenesis. **Progress in Growth Factor Research**, v. 3, n. 3, p. 219-234, 1991.

FAUSTO, N.; LAIRD, A. D.; WEBBER, E. M. Liver Regeneration 2. Role of growth factors and cytokines in hepatic regeneration. **Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 9, n. 15, p. 1527-1536, 1995.

FAUSTO, N.; MEAD, J. E. Regulation of liver growth: protooncogenes and transforming growth factors. **Laboratory Investigation**, v. 60, p. 4-13, 1989.
FAUSTO, N.; MEAD, J. E.; BRAUN, L.; THOMPSON, N. L.; PANZICA, M.;

GOYETTE, M.; BELL, G. I.; SHANK, P. R. Proto-oncogene expression and growth factors during liver regeneration. **Symposium on Fundamental Cancer Research**, v. 39, p. 69-86, 1987.

FAUSTO, N.; MEAD, J. E.; GRUPPUSO, P. A.; BRAUN, L. TGF β in liver development, regeneration and hepatocarcinogenesis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 593, p. 231-242, 1990.

FLEIG, W. E.; HOSS, G. Partial purification of rat hepatic stimulator substance and characterization of its action on hepatoma cells and normal hepatocytes. **Hepatology**, v. 9, p. 240-248, 1989.

FRANCAVILLA, A.; GAVALER, J. S.; MAKOWKA, L.; BARONE, M.; MAZZAFERRO, V.; AMBROSINO, G.; IWATSUKI, S.; GUGLIELMI, F. W.; DiLEO, A.; BALESTRAZZI, A.; VAN THIEL, D. H.; STARLZ, T. E. Estradiol and testosterone levels in patients undergoing partial hepatectomy. A possible signal for hepatic regeneration? **Digestive Diseases Sciences**, v. 34, p. 818-822, 1989a.

FRANCAVILLA, A.; POLIMENO, L.; BARONE, M.; AZZARONE, A.; STARLZ, T. E. Hepatic regeneration and growth factors. **Journal of Surgical Oncology Supplement**, v. 3, p. 1-7, 1993.

FRANCAVILLA, A.; POLIMENO, L.; DiLEO, A.; BARONE, M.; OVE, P.; COETZEE, M. L.; EAGON, P.; MAKOWKA, L.; AMBROSINO, G.; MAZZAFERRO, V.; STARLZ, T. E. The effect of estrogen and tamoxifen on hepatocyte proliferation in vivo and in vitro. **Hepatology**, v. 9, p. 614-620, 1989b.

FRANCAVILLA, A.; BARONE, M.; AZZARONE, A.; PANELLA, C.; GIANGASPERO A. Cell regeneration in the pathobiology of liver carcinomas. **Italian Journal of Gastroenterology**, v. 23, n.9, p. 589-593, 1991a.

FRANCAVILLA, A.; STARLZ, T. E.; CARR, B.; AZZARONE, A.; CARRIERI, G.; ZENG, Q. H.; PORTER, K. A. The effects of FK 506, cyclosporine, and rapamycin on

liver growth in vitro and in vivo. **Transplantation Proceedings**, v. 23, n. 6, p. 2817-2820, 1991b.

FRANCAVILLA, A.; STARZL, T. E.; PORTER, K.; SCOTTI-FOGLIENI, C.; MICHALOPOULOS, G. K.; CARRIERI, G.; TREJO, J.; BARONE, M.; ZENG, Q. H. Screening for candidate hepatic growth factors by selective portal infusion after canine Eck's fistula. **Hepatology**, v. 14, p. 665-670, 1991c.

FREIJE, F. 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**, v. 269, n. 24, p. 16766-16773, 1994.

FREUND, H.; DIENSTAG, J.; LEHRICH, J. YOSHIMURA, N.; BRADFORD, R. R.; ROSEN, H.; ATAMIAN, S.; SLEMMER, E.; HOLROYDE, J.; FISCHER, J. E. Infusion of branched-chain amino acid-enriched solution in patients with hepatic encephalopathy. **Annals of Surgery**, v. 196, p. 209-220, 1982.

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

FUJIWARA, K.; NAGOSHI, S.; OHNO, A.; HIRATA, K.; OHTA, Y.; MOCHIDA, S.; TOMIYA, T.; HIGASHIO, K.; KUROKAWA, K. Stimulation of liver growth by exogenous human hepatocyte growth factor in normal and partially hepatectomized rats. **Hepatology**, v. 18, p. 1443-1449, 1993.

FURTADO, A. J. L. **Aspectos cirúrgicos da regeneração hepática**. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Coimbra, Coimbra, 1964. 335p.

GALANTI, G.; PUCHETTI, V. La nostra esperienza nel trattamento della cirrose mediante resezione epatica. **Chirurgia e Patologia Sperimentale**, v. 8, p. 1487-1497, 1960.

GARTNER, L. P.; HIAT, L. P. **Tratado de histologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. p. 456.

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**, v. 9, n. 1, p. 29-33, 1973.

GERBER, M. A.; THUNG, S. N.; SHEN, S.; STROHMEYER, F. W.; ISHAK, K. G. Phenotypic characterization of hepatic proliferation. Antigenic expression by proliferation epithelial cells in fetal liver, massive hepatic necrosis and nodular transformations of the liver. **American Journal of Pathology**, v. 110, p. 70-74, 1983.

GIANNINI, E. G.; TESTA, R.; SAVARINO, V. Liver enzyme alternation: a guide for clinicians. **Canadian Medical Association Journal**, v. 172, n. 3, p. 367-379, 2005.

GODOY, J. L.; MATIAS, J. E. F.; COELHO, J. C. U. Regeneração hepática: o mito de Prometeu revisado. **Jornal Brasileiro de Transplantes**, v. 9, p. 535-539, 2006.

GORLA Jr., J. A.; FAGUNDES, D. J.; PARRA, O. M.; ZAIA, C. T. B. V. Fatores hepatotróficos e regeneração hepática. Parte II: fatores de crescimento. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 16, n. 4, p. 1991.

GOMORI, G. Silver impregnation of reticulim in paraffin sections. **American Journal of Pathology**, v. 13, p. 993, 1937.

GOUSTIN, A. S.; LEOF, E. B.; SHIPLEY, G. D.; MOSES, H. L. Growth factors and cancer. **Cancer Research**, v. 46, p. 1015-1029, 1986.

GRIGORESCU, M. Noninvasive biochemical makers of liver fibrosis. **Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases**, v. 15, n. 2, p. 149-159, 2006.

GUERRA, R. R.; TROTTA, M. R.; PARRA, O. M.; AVANZO, J. L.; BATEMAN, A.; ALOIA, T. P. A.; DAGLI, M. L. Z.; BLAZQUEZ, F. J. H. Modulation of extracellular matrix by nutritional hepatotrophic factors in thioacetamide-induced liver cirrroses in the rat. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 42, n. 11, p. 1027-1034, 2009.

GUPTA, S. Hepatic growth factors: progress and perspective. In: GITNICK, G. **Current Hepatology**, v. 12, p. 75-130, 1992.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de fisiologia médica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p. 973.

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

HANEY, A.; PEACOCK JR., E. E.; MADDEN, J. W. Liver regeneration and hepatic collagen deposition in rats with dimethylnitrosamine-induced cirrhosis. **Annals Surgery**, v. 175, p. 863-869, 1972.

HERNANDEZ-BLAZQUEZ, F. J.; GUERRA, R. R.; TROTTA, MAURÍCIO R.; MIRANDA, G. P.; WENCESLAU, C. G. C.; DAGLI, M. L. Z.; PARRA, O. M. Effect of hepatotrophics factors in rat liver cirrhosis. In: **XIII Congreso nacional de histología e ingeniería tisular. First International congress of histology and tissue engineering**, Alcalá de Henares. Histology and Histopathology, v. S1, p. S156-S156, 2005.

HIB, J. **Di Fiore histologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. p. 513.

HIGGINS, G. M. Experimental pathology of the liver. XII. Effects of feeding dessicated thyroid gland on restoration of the liver. **Archives of Pathology**, v. 16, p. 226-231, 1933.

HIGGINS, G. M.; ANDERSON, R. M. Experimental pathology of the liver. I. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. **Archives of Pathology**, v. 12, p. 186-202, 1931.

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**, v. 89, n. 202-208, 1979.

HILAIRE, R. J.; JONES, A. L. Epidermal growth factor: its biological and metabolic effects with emphasis on the hepatocyte. **Hepatology**, v. 2, p. 601-611, 1982.

HOUCK, K. A.; MICHALOPOULOS, G. K. Altered responses of regenerating hepatocytes to norepinephrine and transforming growth factor-b. **Journal of Cellular Physiology**, v. 141, p. 503-509, 1989.

IKEDA, O.; OZAKI, M.; MURATA, S.; MATSUO, R.; NAKANO, Y.; WATANABE, M.; HISAKURA, K.; MYRONOVYCH, A.; KAWASAKI, T.; KOHONO, K.; OHKOHCHI, N. Autonomic regulation of liver regeneration after partial hepatectomy in mice. **Journal of Surgical Research**, v. 152, p. 218-223, 2009.

ILMURO, 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**, v. 124, n. 2, p. 445-458, 2003.

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

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

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

JUNQUEIRA, L. C. U.; COSSERMELLI, W.; BRENTANI, R. R. Differential staining of collagens type I, II and III by Sirius Red and polarization microscopy. **Archivum Histologicum Japonicum**, v. 41, p. 267, 1978.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004, p. 488.

KAN, M.; HUAN, J.; MANSSON, P.; YASUMITSU, H.; CARR, B.; MCKEEHAN, W. Heparin-binding growth factor type 1 (acidic fibroblast growth factor): a potential biphasic autocrine and paracrine regulator of hepatocyte regeneration. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 86, p. 7432-7436, 1989.

KANAZAWA, H. Effect of glucagon and insulin on the histochemical and functional alterations in the Langerhans islands after hepatectomy in dogs. **Nippon Geka Gakkai Zasshi**, v. 92, n. 5, p. 535-542, 1991.

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.

KIM, T.; MARS, W. M.; STOLZ, D. B.; MICHALOPOULOS, G. K. Expression and activation of Pro-MMP-2 and Pro-MMP-9 during liver regeneration. **Hepatology**, v. 30, p. 75-82, 2000.

KNITTEL, T.; FELLMER, P.; RAMADORI, G. Gene expression and regulation of plasminogen activator inhibitor type I in hepatic stellate cells of rat liver. **Gastroenterology**, v. 111, n. 3, p. 745-754, 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-beta 1. **Journal of Hepatology**, v. 30, n. 1, p. 48-60, 1999.

KNOPP, J.; MACHO, L.; FICKOVA, M.; ZORAD, S.; KVET, N. Y. R.; JARO, S. C. Insulin and catecholamines act at different stages of rat liver regeneration. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 827, p.489-493, 1997.

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. **Federation of European Biochemical Societies Letters**, v. 245, n. 1-2, 229-334, 1989.

KWON, A. H.; INADA, Y.; UETSUJI, S.; YAMAMURA, M.; HIOKI, K.; YAMAMOTO, M. Response of fibronectin to liver regeneration after hepatectomy. **Hepatology**, v. 11, n. 4, p. 593-598, 1990.

LABRECQUE, D. Liver regeneration: a picture emerges from the puzzle. **Journal of Gastroenterology**, v. 89, n. 8, p. 586-596, 1994.

LABRECQUE, D. R. Hepatic stimulator substance: discovery, characteristics and mechanism of action. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 36, p. 669-673, 1991.

LABRECQUE, D. R.; PESCH, L. A. Preparation and partial characterization of hepatic regenerative stimulator substance (SS) from rat liver. **Journal of Physiology**, v. 248, p. 273- 284, 1975.

LAI, H. S.; CHEN, W. J.; CHEN, K. M. Energy substrate for liver regeneration after partial hepatectomy in rats: effects of glucose vs fat. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 16, n. 2, p. 152-156, 1992.

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**, 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 collagen type I is mediated by oxidative stress through c-myb expression. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 96, n. 5, p. 2461-2468, 1995.

LEEVY, C. M.; HOLLISTER, R. M.; SCHMID, R.; MACDONALD, R. A.; DAVIDSON, C. S. Liver regeneration in experimental carbon tetrachloride intoxication. **Proceedings of the Society for Experimental Biology**, v. 102, p. 672-675, 1959.

LEFFERT, H. L.; KOCH, K. S. Proliferation of hepatocytes. **Ciba Foundation Symposium**, v. 51, p. 61-82, 1977.

LEFFERT, H. L.; KOCH, K. S. Proliferation of hepatocytes. In: PORTER, R.; WHELAN, J. (Ed). **Hepatotropic factors**. (Ciba Foundation Symposium, N° 55). Amsterdam: Elsevier, North-Holland, 1978, p. 61-82.

LEFFERT H. L.; KOCH, K. S.; MORAN, T.; RUBALCAVA, B. Hormonal control of rat liver regeneration. **Gastroenterology**, v. 76, p. 1470-1482, 1979.
LEFFERT, H. L.; KOCH, K. S.; LAD, P. J.; SHAPIRO, I. P.; SKELLY, H.;

HEMPTINNE, B. Hepatocyte regeneration, replication, and differentiation. IN: ARIAS, I. M.; JAKOBY, W. B.; POPPER, H.; SCHACHTER, D.; SHAFRITZ, D. A. **The liver: biology and pathobiology**. 2. ed. New York: Raven Press, 1988, p. 833-850.

LEFFERT, H. L.; KOCH, K. S.; MORAN, T. R. Hormonal control of rat liver regeneration. **Gastroenterology**, v. 76, p. 1470-1482, 1979.

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

LINDROOS, P. M.; ZARNEGAR, R.; MICHALOPOULOS, G. K. Hepatic growth factor (hepatopoietin A) rapidly increases in plasma before DNA synthesis and liver regeneration stimulated by partial hepatectomy and carbon tetrachloride administration. **Hepatology**, v. 13, p. 743-750, 1991.

LUETTEKE, N. C.; MICHALOPOULOS, G. K.; TEIXIDO, J.; GILMORE, R.; MASSAGUÉ, J.; LEE, D. C. Characterization of high molecular weight transforming growth factor- α produced by rat hepatocellular carcinoma cells. **Biochemistry**, v. 27, p. 6487-6494, 1988.

MACMANUS, J. P.; BRACELAND, B. M.; YOUNDALE, T.; WHITFIELD, J. F. Adrenergic antagonists, and a possible link between the increase in cyclic adenosine 3', 5' – monophosphate and DNA synthesis during liver regeneration. **Journal of Cellular Physiology**, v. 82, p. 157-164, 1973.

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

MANNING, D. S.; AFDHAL, N. H. Diagnosis and quantification of fibrosis. **Gastroenterology**, v. 134, n. 6, p. 1670-1681, 2008.

MARCHESINI, G.; ZOLI, M.; DONDI, C.; BIANCHI, G.; CIRULLI, M.; PISI, E. Anticatabolic effect of branched-chain amino acid-enriched solutions in patients with liver cirrhosis. **Hepatology**, v. 2, p. 420-425, 1982.

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**, v. 157, p. 231-240, 1997.

MARSDEN, E. R.; HU, Z.; FUJIO, K.; NAKATSUKASA, H.; THORGEIRSSON, S. S.; EVARTS, R. P. Expression of acidic fibroblast growth factor in regeneration liver and during hepatic differentiation. **Laboratory Investigation**, v. 67, p. 427-433, 1992.

MARTELLI-JUNIOR, H.; COTRIM, P.; GRANER E.; SAUK, J. J.; COLETTA, R. D. Effect of transforming growth factor-beta 1, interleukin-6, and interferon-gamma on the expression of type 1 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**, 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**, v. 291, Pt. 2, p. 441-446, 1993.

MARTI, V.; BURWEN, S. J.; JONES, A. L. Biological effects of epidermal growth factor with emphasis on the gastrointestinal tract and liver: An update. **Hepatology**, v. 9, p. 126-138, 1989.

MARTINEZ-HERNANDEZ, A.; AMENTA, P. S. The hepatic extracellular matrix. I. Components and distribution in normal liver. **Virchows Archiv – A: Pathological Anatomy and Histopathology**, v. 423, p. 1-11, 1993a.

MARTINEZ-HERNANDEZ, A.; AMENTA, P. S. The hepatic extracellular matrix. II. Ontogenesis, regeneration and cirrhosis. **Virchows Archiv – A: Pathological Anatomy and Histopathology**, v. 423, p. 77-84, 1993b.

MCGOWAN, J. A.; STRAIN, A. J.; BUCHER, N. L. R. DNA synthesis in primary cultures of adult rat hepatocytes in a defined medium: effects of epidermal growth factor, insulin, glucagon, and cyclin-AMP. **Journal of Cellular Physiology**, v. 180, p. 353-363, 1981.

MEAD, J. E.; BRAUN, L.; MARTIN, D. A.; FAUSTO, N. Induction of replicative competence ("priming") in normal liver. **Cancer Research**, v. 50, p. 7023-7030, 1990.

MEAD, J. E.; FAUSTO, N. Transforming growth factor TGF α may be a physiological regulator of liver regeneration by means of an autocrine mechanism. **Proceedings of the National Academy Sciences**, v. 86, p. 1558-1562, 1989.

MICHALOPOULOS, G. K.; HOUCK, K. A.; DOLAN, M. L.; LUETTEKE, N. C. Control of hepatocyte replication by two serum factor. **Cancer Research**, v. 44, p. 4414-4419, 1984.

MICHALOPOULOS, G. Liver regeneration: molecular mechanisms of growth control. **Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 4, p. 176-187, 1990.

MICHALOPOULOS, G.; ZARNEGAR, R. Hepatocyte growth factor. **Hepatology**, v. 15, p. 149-155, 1992.

MICHALOPOULUS, G. K.; DEFRANCES, M. C. Liver regeneration. **Science**, v. 276, p. 60-66, 1997.

MILNE, L. S. The histology of liver tissue regeneration. **Journal of Pathology and Bacteriology**, v. 13, p. 127-160, 1909.

MIRANDA, G. P.; GUERRA, R. R.; PARRA, O. M.; DA SILVA, J. R. M. C.; HERNANDEZ-BLAZQUEZ, F. J. Proliferação celular e aporte vascular na regeneração hepática estimulada por fatores hepatotróficos após hepatectomia parcial em ratos. In: **Simpósio Internacional de Iniciação Científica**, 13., 2005. Disponível em: <<http://www.usp.br/siicusp/13osiicusp/aprovados/ficha440.htm>>. Acesso em 15 mar. 2007.

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**, v. 110, p. 161-168, 2001.

MURIEL, P.; ESCOBAR, Y. Kupffer cells are responsible for liver cirrhosis induced by carbon tetrachloride. **Journal of Applied Toxicology**, v. 23, n. 2, p. 103-108, 2003.

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

NAKAMURA, T.; ARAKAKI, R.; ICHIHARA, A. Interleukin-1 is a potent growth inhibitor of adult rat hepatocytes in primary culture. **Experimental Cell Research**, v. 179, p. 488-497, 1988.

NOMPLEGGI, D. J.; BONKOVSKY, H. L. Nutritional supplementation in chronic liver disease: An analytical review. **Hepatology**, v. 19, p. 518-533, 1994.

OLSEN, P. S.; BOESBY, S.; KIRKEGAARD, P.; THERKEL-SEN, K.; ALMDAL, T.; POULSEN, S. S.; NEXO, E. Influence of epidermal growth factor on liver regeneration after partial hepatectomy in rats. **Hepatology**, v. 8, p. 992-996, 1988.

OPLETA, K.; O'LOUGHLIN, E. V.; SHAFFER, E. A.; HAYDEN, J.; HOLLENBERG, M.; GALL, D. G. Effect of epidermal growth factor on growth and postnatal development of the rabbit liver. **American Journal of Physiology**, v. 253, p. G622-G626, 1987.

PANDIELLA, A.; MASSAGNE, J. Transforming growth factor- α . **Biochemical Society Transactions**, v. 19, p. 1991-1994, 1991.

PAROLIN, M. B.; ZAINA, F. E.; LOPES, R. W. Terapia nutricional no transplante hepático. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 39, n. 2, p. 114-122, 2002.

PARRA, O. M. **Métodos de estímulo da regeneração do fígado e perspectivas no tratamento da cirrose hepática**. Revisão, comentários e contribuição. 1982. 219 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1982.

PARRA, O. M.; HERNANDEZ-BLAZQUEZ, F. J.; CUNHA DA SILVA, J. R. M.; SOUSA SILVA, R. A. P.; 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**, v. 33, n. 4, p. 212-216, 1996.

PARRA, O. M.; SAAD, W. A.; FERRAZ-NETO, J. B-H. H.; FERRI, S.; SILVA, R. A. P. S.; COLLETO, G. M. D. D.; SAAD, J. W. A. Additional growth of an intact liver induced by exogenous hepatotrophic factors. A study in a rats. **Arquivo Brasileiro de Cirurgia e Diagnóstico**, v. 7, n. 4, p. 64-68, 1992.

PARRA, O. M.; SAAD, W. A.; SOUSA SILVA, R. A. P.; HERNANDEZ-BLASQUEZ, F. J.; PEDUTO, L.; NETO, B. F.; JUNIOR, S. W. A. Stimulation of intact rat liver by exogenous hepatotrophic factors with additional growth of its mass. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 9, n. 1, p. 7-11, 1994.

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**, v. 113, n. 4, p. 941-947, 1995b.

PELLIZAS, C. G.; COLEONI, A. H.; COSTAMAGNA, M. E.; DI FULVIO, M.; MASINI REPISO, A. M. Insulin-like growth factor I reduces thyroid hormone receptors in the rat liver. Evidence for a feed-back loop regulating the peripheral thyroid hormone action. **Journal of Endocrinology**, v. 158 1, p. 87-95, 1998.

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. **Arquivo de Ciência Veterinária e Zoologia da UNIPAR**, v. 6, p. 196-217, 2003.

PREEDY, V. R.; PASKA, L.; SUGDEN, P. H. Protein synthesis in liver and extra-hepatic tissues after partial hepatectomy. **Biochemical Journal**, v. 267, p. 325-330, 1990.

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**, v. 265, n. 26, p. 15560-15563, 1990.

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

RAMALHO, S. F.; RAMALHO, L. N. Z.; ZUCOLOTO, S.; SILVA, J. R. O. C. Regeneração hepática. In: SILVA, J. R. O. C.; ZUCOLOTO, S.; JÚNIOR, A. B.

Modelos experimentais de pesquisa em cirurgia. São Paulo: Robe Editorial, 1998, cap. 21, p. 244-258.

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 plasmin-generating enzymes by transforming growth factor-beta 1. **Hepatology**, v. 18, n. 4, p. 937-944, 1993.

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

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

ROMBEAU, J. L.; ROLANDELLI, R. H. **Nutrição clínica: nutrição parenteral.** 3. ed. São Paulo: Ed. Roca, 2004, p. 576.

ROUILLER, C. **The liver.** London: Academic Press, 1964. v. 2, p. 674.
ROUS, P.; LARIMORE, L. D. Relation of the portal blood to liver maintenance: a demonstration of liver atrophy conditional on compensation. **Journal of Experimental Medicine**, v. 31, p. 609-632, 1920.

RUDOLPH, K. L.; TRAUTWEIN, C.; KUBICKA, S.; RAKEMANN, T.; BAHR, M. J.; SEDLACZEK, N.; SCHUPPAN, D.; MANNS, M. P. Differential regulation of extracellular matrix synthesis during liver regeneration after partial hepatectomy in rats. **Hepatology**, v. 30, p. 1159-1166, 1999.

RUSSEL, W. E.; COFFEY, R. J.; QUELLETTE, A. J.; MOSES, H. L. Type beta transforming growth factor reversibly inhibits the early proliferate response to partial hepatectomy in the rat. **Proceedings of the National Academy Sciences**, v. 85, p. 5126-5130, 1988.

RUSSELL, W. E.; BUCHER, N. L. R. Vasopressin modulates liver regeneration in the Brattleboro rat. **American Journal of Physiology**, v. 245, p. G321-324, 1983.

SAAD, W. A. **Observações morfológicas, autoradiográficas, histoquímicas, e bioquímicas sobre a regeneração do fígado cirrótico de rato, induzida pela hepatectomia parcial.** 1972. 75 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1972.

SANTOS, J. A. **Patologia especial dos animais domésticos**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1986, p. 576.

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**, v. 162, n. 6, p. 1771-1780, 2003.

SCHERLE, W. A simple method for volumetry of organs in quantitative stereology. **Mikroskopie**, v. 26, p. 57-63, 1970.

SCHINDHELM, R. K.; DIAMANT, M.; DEKKER, J. M.; TUSHUIZEN, M. E.; TEERLINK, T.; HEINE, R. J. Alanine aminotransferase as a marker of non-alcoholic fatty liver disease in relation to type 2 diabetes mellitus and cardiovascular disease. **Diabetes/Metabolism Research and Reviews**, v. 22, n. 6, p. 437-443, 2006.

SCHUPPAN, D.; AFDHAL, N. H. **Liver Cirrhosis**, v. 371, n. 9615, p. 838-851, 2008.

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. **Trombosis and Haemostasis**, v. 75, n. 5, p. 801-807, 1996.

SHI, Y. E.; YAGER, J. D. Effects of the liver tumor promoter ethinyl estradiol on epidermal growth factor-induced DNA synthesis and epidermal growth factor receptor levels in cultured rat hepatocytes. **Cancer Research**, v. 49, p. 3574-3580, 1989.

SHORT, J.; BROWN, R. F.; HUSAKOVA, A.; GILBERTSON, J. R.; ZEMEL, R.; LIEBERMAN, I. Induction of deoxyribonucleic acid synthesis in the liver of intact animal. **Journal Biological Chemistry**, v. 247, p. 1757-1765, 1972.

SIMPSON, G. E. C.; FINCKH, E. S. Pattern of regeneration of rat liver after repeated partial hepatectomies, **Journal of Pathology and Bacteriology**, v. 86, p. 361-370, 1963.

SPORN, M. B.; ROBERTS, A. B. Transforming growth factor b: new chemical forms and new biological roles. **Biofactors**, v. 1, p. 89-93, 1988.

STARZL, T. E.; PORTER, K. A.; FRANCAVILLA, J. A.; BENICHO, J.; PUTNAM, C. W. A hundred years of the hepatotrophic controversy. **Ciba Foundation Symposium**, v. 55, p.111-129, 1977.

STARZL, T. E.; FRANCAVILLA, A.; PORTER, K. A.; BENICHO, J.; JONES, A. F. The effect of splanchnic viscera removal upon canine liver regeneration. **Surgery, Gynecology and Obstetrics**, v. 147, p. 193-207, 1978.

STERNHEIMER, R. The effect of a single injection of thyroxine on carbohydrates, protein and growth in the rat liver. **Endocrinology**, v. 25, p. 899-908, 1939.

STEVENS, A.; LOWE, J. S. **Histologia humana**. 2. ed. São Paulo: Manole, 2001. p. 408.

SVANAS, G. W.; FAGON, P. K.; ELM, M.; MAKOWKA, L.; PODESTA, L.; CHAPCHAP, P.; KAHN, D.; STARZL, T. E.; VAN THIEL, D. H. Effect of antiandrogen flutamide on measures of hepatic regeneration in rats. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 34, p. 1916-1923, 1989.

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**, v. 21, n. 3, p. 787-795, 1995.

TAUB, R. A. Hepatology. In: ZAKIM, D.; BOYER, T. D. **A textbook of liver disease**. 4. ed. Philadelphia: Saunders Company, 2002. v. 2, p. 31-48.

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

TORRES, S.; DÍAZ, B. P.; CABRERA, J. J.; DÍAZ CHICO, J. C.; DÍAZ CHICO, B. N.; LÓPEZ, G. Thyroid hormone regulation of rat hepatocyte proliferation and polyploidization. **American Journal of Physiology**, v. 276, p. 155-163, 1999.

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

URAKAWA, T.; AZUMI, Y.; NAGAHATA, Y.; MATSUI, S.; NAKAMOTO, M.; TAKEDA, K.; ITOH, A.; ICHIHARA, T.; MORITOMO, H.; KURODA, H.; SAITOH, Y. Study of 16,6-dimethyl prostaglandin E₂ for prevention of stress ulcer after hepatectomy of experimental cirrhotic liver and its influence on hepatic regeneration. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 25, p. 647-655, 1990.

VAN THIEL, D. H.; GAVALER, J. S.; KAM, I.; FRANCAVILA, A.; POLIMENO, L.; SCHADE, 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**, v. 93, p. 1414-1419, 1987.

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

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

WALLINGTON, E. A. **Histology methods for bone**. London: Butterworths, 1972.

WATSON, P. J. Chronic hepatitis in dogs: a review of current understanding of the aetiology, progression, and treatment. **The Veterinary Journal**, v. 167, p. 228-241, 2004.

WHITTEMORE, A.D.; KASUYA, M.; VOORHEES, A. B. JR.; PRICE, J.B. Jr. Hepatic regeneration in the absence of portal viscera. **Surgery**, v. 77, n. 33, p.419-426, 1975.

WRIGHT, N.; ALISON, M. The liver. In: **The biology of the epithelial cell population**. Oxford: Clarendon Press, 1984. v. 2, p. 880-1229.

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

ZAKI, K.; SIGAL, K. Matrix metalloproteinases and the thyroid. **Gastroenetrology**, v. 10, n. 12, p. 1061-1069, 2000.

ZAKKO, W. F.; GREEN, R. M.; GOLLAN, J. L.; BERG, C. L. Hepatic regeneration is associated with preservation of microsome glucuronidation. **Hepatology**, v. 24, n. 5, p. 1250-1255, 1996.

ZARNEGAR, R.; MICHALOPOULOS, G. K. Purification and biological characterization of human hepatopoietin A, a polypeptide growth factor for hepatocytes. **Cancer Research**, v. 49, p. 3314-3320, 1989.

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 fibrogenesis of rats: role of stellate cells. **Journal of Hepatology**, v. 31, n. 4, p. 703-711, 1999.

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**, v. 11, n. 12, p. 1753-1758, 2005.

ZHONG-TAO, Z.; PENG, J.; YU, W.; JIAN-SHE, L.; JIAN-GUO, X.; YAN-ZHONG, Z.; ZHU, Y. Effects of hepatotrophic factors on the liver after portocaval shunt in rats with portal hypertension. **Chinese Medical Journal**, v. 119, n. 20, p. 1727-1733, 2006.

ZIMMERMANN, A. Regulation of liver regeneration. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 10, p. iv6-iv10, 2004. Supplement , 4.