Ana Cristina Aoun Tannuri

**Modelos de regeneração hepática em animais em crescimento:
estudos histológicos, moleculares e avaliação de efeitos de
imunossupressores.**

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

Área de concentração: Clínica Cirúrgica

Orientador: Prof. Dr. Uenis Tannuri

São Paulo

2007

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Cirurgia Pediátrica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (LIM – 30) e no Setor de Cirurgia Experimental do Instituto da Criança do Hospital das Clínicas, com a colaboração do Laboratório de Investigação em Patologia Hepática (LIM – 14).

O projeto da pesquisa foi aprovado na Comissão de Ética para Análise de Projetos – CAPPesq – da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 22/06/2005, sob número 455/05.

Os recursos financeiros foram obtidos da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) por meio do projeto número 05/02444-7 – São Paulo, Brasil.

O convívio diário com crianças submetidas a transplante de fígado nos sensibiliza e nos estimula a pesquisar, no laboratório, soluções para dúvidas e desafios que a prática clínica nos apresenta. A essas crianças, nossa homenagem e constante dedicação.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Uenis Tannuri, por ser meu maior mestre durante estes 31 anos. Por sua determinação e estímulo na orientação desta tese. Sua atuação profissional e contagiante espírito pesquisador são grandes exemplos em minha vida.

À Srta. Maria Cecília Mendonça Coelho, pelo preparo e análise molecular do material. Sua amizade, dedicação e competência foram essenciais para a realização desta tese.

Ao Dr. Evandro Sobroza de Mello, pelo convívio profícuo, estímulo, orientações e auxílio no preparo e avaliação histológica e imunoistoquímica do material.

À Sra. Neide Aparecida Rosendo dos Santos, pela dedicação e paciência no preparo histológico do material.

À Sra. Alda Wakamatsu, pelo preparo imunoistoquímico do material.

Às Sras. Ana Maria de Andrade, Pedrina Conceição de Faria, Margarida Maria Damásio, Adriana Vasconcelos de Lacerda e Dulcinéia Aparecida da Silva, pelo auxílio durante a manipulação dos animais no Laboratório de Cirurgia Experimental.

À Sra. Patrícia Lopes Pereira pelos trabalhos de secretaria.

RESUMO

Tannuri ACA. *Modelos de regeneração hepática em animais em crescimento. Estudos histológicos, moleculares e avaliação de efeitos de imunossuppressores*. [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007. 99p.

INTRODUÇÃO: Transplantes parciais de fígado em crianças têm sido realizados com maior frequência, enfatizando a importância do estudo da regeneração hepática, bem como dos efeitos de drogas imunossupressoras sobre a mesma. A regeneração do parênquima é o resultado do balanço entre multiplicação celular e apoptose, esta última definida como morte celular programada. Neste processo, estão envolvidas expressões de genes pró-apoptóticos (Bak e Bax) e anti-apoptóticos (Bcl-XL e Bcl-2). Dentre as proteínas relacionadas à proliferação hepatocitária, destaca-se a interleucina-6 (IL-6). Embora o modelo de ressecção de 70% da massa hepática de ratos adultos seja amplamente utilizado para estudos de regeneração, não há trabalhos com animais em crescimento. **MÉTODOS:** Na presente pesquisa, foi padronizado o modelo de hepatectomia parcial em ratos recém-nascidos e em recém-desmamados: realizou-se ligadura com fio de algodão do pedículo dos lobos esquerdo lateral, esquerdo medial e direito medial, seguida da ressecção do parênquima desses lobos. Os fígados remanescentes foram imediatamente pesados e comparados com os pesos dos fígados de animais controles. Para caracterização dos modelos de regeneração, 40 ratos recém-nascidos e 30 recém-desmamados foram submetidos à hepatectomia descrita e mortos nos dias subsequentes (1, 2, 3, 4 e 7), e o fígado residual submetido a análises de peso e histologia convencional. A seguir, 36 animais (18 recém-nascidos e 18 recém-desmamados) foram divididos nos seguintes grupos: controle, cirurgia simulada e hepatectomia. Um dia após, utilizando métodos moleculares (técnica do RT-PCR), estudou-se a expressão do gene da IL-6, dos genes pró-apoptóticos e anti-apoptóticos nos fígados desses animais e, por meio de métodos imunoistoquímicos, analisou-se a presença de antígenos relacionados à proliferação celular (PCNA) e apoptose (TUNEL) em lâminas preparadas pela técnica do “tissue microarray”. Em outros 36 ratos (18 recém-nascidos e 18 recém-desmamados), foram administradas drogas imunossupressoras (metilprednisolona, ciclosporina A ou tacrolimus, separadamente) no ato da hepatectomia, e o parênquima hepático remanescente submetido às mesmas análises moleculares e imunoistoquímicas, um dia após. **RESULTADOS:** A ressecção do parênquima hepático correspondeu a 70% da massa total do fígado. A mortalidade relacionada à hepatectomia nos animais recém-nascidos e recém-desmamados foi 30% e 0% respectivamente. Na análise histológica observou-se maior quantidade de mitoses em hepatócitos no terceiro dia nos recém-nascidos e no segundo dia nos recém-desmamados, com normalização da arquitetura do parênquima até o 7º dia e recuperação total do peso de ambos. No animal recém-nascido, notou-se intensa esteatose associada ao processo regenerativo. A hepatectomia provocou aumento na expressão do gene da IL-6 no fígado residual e diminuição da expressão dos genes pró-apoptóticos em ambos os modelos, além de aumento do anti-apoptótico Bcl-2 nos animais recém-desmamados. O estudo realizado sobre o efeito das drogas imunossupressoras mostrou resultados diferentes daqueles descritos em animais adultos, não havendo alteração no número de células em proliferação (PCNA positivas) ou apoptose (TUNEL positivas). As drogas não tiveram efeito sobre a expressão do gene da IL-6. Metilprednisolona e tacrolimus

ocasionaram aumento da expressão do gene anti-apoptótico Bcl-2 em ambos os modelos; metilprednisolona e ciclosporina provocaram aumento na expressão do gene pró-apoptótico Bak nos ratos recém-nascidos. **CONCLUSÕES:** os modelos de regeneração hepática em ratos recém-nascidos e recém-desmamados foram exeqüíveis e adequados para a pesquisa; a hepatectomia promoveu estímulo da proliferação de hepatócitos com inibição da apoptose; as drogas imunossupressoras utilizadas não exerceram efeito sobre a proliferação de hepatócitos porém provocaram aumento da expressão de genes relacionados a apoptose.

SUMMARY

Tannuri ACA. *Experimental models of liver regeneration in growing animals. Histological and molecular studies, and evaluation of the effects of immunosuppressants.* [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007. 99p.

INTRODUCTION: Partial liver transplantation has been performed in children with increasing frequency, and this emphasizes the importance of the studies of hepatic regeneration and the effects of immunosuppressive drugs on this phenomenon. Liver regeneration is controlled by the balance between cell proliferation and apoptosis (defined as a programmed cell death that results from the expression of pro-apoptotic genes - Bax and Bak - and anti-apoptotic genes - Bcl-2 and Bcl-XL). Among proteins related to hepatocyte proliferation, interleukin-6 is an important one. Although the adult rat model of 70% hepatectomy has been widely utilized for studies of liver regeneration, there are no studies using growing animals.

METHODS: In the current paper, two experimental models were created utilizing newborn and weaning rats: using a cotton thread, the vascular hilum and the hepatic vein were ligated and the left lateral, left medial and right medial lobes were resected. The remaining liver was immediately harvested and weighted to be compared to control livers. The animals were sacrificed on days 1, 2, 3, 4, and 7 after the operation, the remnant livers were weighted and harvested for histological examinations. Then, 36 animals (18 newborn and 18 weaning animals) were divided into the following groups: control, sham and hepatectomy. One day after, the expressions of IL-6 gene, pro-apoptotic and anti-apoptotic genes were studied in the remnant livers. Immunohistochemical stainings for cell antigens related to cell proliferation (PCNA) and apoptosis (TUNEL) were also performed utilizing tissue microarray sections. In another group of 36 animals (18 newborn and 18 weaning animals), immunosuppressive drugs were administered just after the hepatectomy (methylprednisolone, cyclosporine A or tacrolimus separately), and the remnant liver submitted to the same molecular and immunohistochemical studies.

RESULTS: The resected liver corresponded to 70% of the total liver weight. The mortality rates after hepatectomy were 30% and 0% for newborn and weaning rats, respectively. The histological examinations showed a great number of mitoses of hepatocytes on the third day in newborns and on the second day in weaning rats, and normalization of histological aspects by 7 days after hepatectomy and weight recuperation. In the newborn group liver regeneration was related to an intense steatosis. Hepatectomy promoted an increase in the expression of IL-6 gene of the remnant liver, a decreased expression of pro-apoptotic genes in both models, and an increased expression of anti-apoptotic Bcl-2 gene in weaning rats. The study of the effects of immunosuppressants showed different results from those described in adult animals, with no alterations in the number of cells in proliferation (PCNA positive) and apoptosis (TUNEL positive). Drugs had no effect in expression of IL-6 gene. Methylprednisolone and tacrolimus promoted an increased expression of anti-apoptotic gene Bcl-2. In addition, methylprednisolone and cyclosporine promoted an increase in the expression of the pro-apoptotic gene Bak in newborn rats.

CONCLUSIONS: The experimental models were feasible and adequate for the current investigations; hepatectomy stimulated hepatocyte proliferation and inhibited

hepatic cells apoptosis; the utilized immunosuppressant drugs did not affect hepatocyte proliferation although an increased expression of apoptosis-related genes was verified.

1. INTRODUÇÃO

O fenômeno da regeneração hepática é reconhecido desde o tempo da Grécia Antiga através do mito de Prometeu, o qual foi condenado a ter diariamente parte de seu fígado devorado por uma águia, após ter roubado o segredo do fogo dos deuses do Olimpo. O fígado regenerava durante a noite, mantendo a fonte de alimento da águia por toda eternidade, e Prometeu sob tortura perpétua.¹

A regeneração hepática é o resultado de respostas fisiológicas que ocorrem após perdas de parênquima, como consequência de agressão tóxico-medicamentosa, infecciosa, traumática ou após ressecções cirúrgicas do fígado.²

Nos últimos 15 anos, com a realização cada vez mais freqüente de transplantes de segmentos ou lobos hepáticos em crianças, como os transplantes intervivos e aqueles com partição do fígado (“split liver”), tem crescido o interesse pelo estudo da regeneração hepática. Condição típica que exemplifica a importância de tal estudo é o paciente que, por razões técnicas ou logísticas, recebe apenas pequeno volume de parênquima hepático, situação conhecida como transplante “small for size”, o que pode criar insuficiência hepática funcional relativa.³ Ainda, nos transplantes intervivos com receptores adultos utiliza-se geralmente todo o lobo direito do fígado do doador, restando neste o lobo esquerdo, por vezes diminuto, que em alguns meses readquire o volume original do fígado.⁴

Além do transplante hepático, existem afecções clínicas que podem gerar insuficiência hepática relativa, tal como necrose hepática medicamentosa ou decorrente da ação de agentes tóxicos ou infecciosos. Nestas situações, os hepatócitos restantes adquirem intensa atividade proliferativa, com o objetivo de recuperar a capacidade funcional do fígado.² No entanto, não estão completamente elucidados os mecanismos que, após essa agressão, conduzem o parênquima à regeneração arquitetural completa ou ao desenvolvimento de fibrose e cirrose.

O processo de regeneração pode ser dividido nas seguintes etapas: fase “priming”, fase de progressão, fase de ciclo celular e fase final com sinal de parada da proliferação.

A fase “priming” parece ser a associação da resposta geral à agressão ao fígado com alterações de citocinas que deflagram a proliferação celular. Em trabalhos recentes, existem evidências de que o fator de necrose tumoral alfa (*tumoral necrosing factor* - TNF-alfa) e a interleucina 6 (IL-6) são importantes citocinas relacionadas às vias de sinalização precoces que levam à regeneração hepática.^{1,2,5-8} A IL-6 é secretada pelas células de Kupffer, e essa secreção é estimulada pelo TNF-alfa.¹ A IL-6 é um importante estimulador da síntese de proteínas de fase aguda nos hepatócitos, como parte da resposta inflamatória geral.⁹ A concentração sérica de IL-6 eleva-se após hepatectomia parcial, atingindo pico em 24 horas.¹⁰ Estudo recente sugere que a síntese de ácido desoxirribonucleico (ADN) no hepatócito durante a regeneração é suprimida em ratos com deleção homozigótica do gene da IL-6.¹¹ Também, a IL-6 é responsável pela ativação de fatores de transcrição, como o STAT-3 (*Signal Transduction and Activator of Transcription* – 3), NFkappaB (*Nuclear Factor kappa B*) e AP-1 (*Activating Protein-1*), os quais estimulam a síntese de ADN.⁵

A fase de progressão é caracterizada pelo aparecimento dos fatores de crescimento envolvidos na continuidade do processo de proliferação celular,⁵ destacando-se fator de crescimento hepatotrófico (HGF), fator de crescimento tumoral-alfa (TGF-alfa), fator de crescimento epidérmico (EGF), fator do crescimento endotelial vascular (VEGF) e fator de crescimento do fibroblasto (FGF).¹

Quanto à fase do ciclo celular, sabe-se que normalmente os hepatócitos se encontram quiescentes, na fase denominada G_0 . Frente ao estímulo representado pelas citocinas da fase “priming”, ocorre ativação de genes que levam os hepatócitos da fase G_0 para a fase G_1 . Nesta, as células tornam-se responsivas aos fatores de crescimento e progridem pelo ciclo celular, passando para a fase S, em que há síntese do ADN. Segue-se a fase G_2 , em que são sintetizadas as proteínas necessárias para a divisão celular, e por fim a fase da mitose (M) propriamente dita.²

Após uma fase de intenso crescimento e reestruturação do parênquima hepático, o processo regenerativo cessa.¹ A síntese de ADN se completa em aproximadamente 72 horas, seguindo-se as alterações histológicas. Até o presente, o principal sinalizador da parada da multiplicação celular identificado é o TGF-beta1. Sabe-se que a regulação do crescimento hepático está relacionada com o peso corpóreo e não depende do volume do fígado residual.²

Embora exista uma pequena população de “stem cells” hepáticas (células ovais) que podem gerar todos os tipos de células presentes no fígado, nas condições usuais da hepatectomia parcial essa população celular parece não ter papel no processo regenerativo.⁵ Quando a multiplicação dos hepatócitos é impedida por lesões tóxicas, necrose maciça ou carcinogênese, ou em situações experimentais pela administração de galactosamina, dipina ou retorsina, as “stem cells” contribuem para a restauração da massa hepática funcional.⁵ No entanto, a regeneração do fígado após hepatectomia parcial envolve proliferação de todas as populações de células maduras que compõem o órgão intacto. Tais células incluem os hepatócitos (as principais células funcionais do órgão), células do epitélio biliar, células endoteliais fenestradas, células de Kupffer (macrófagos dos sinusóides hepáticos) e células de Ito (células estreladas específicas do fígado, localizadas sob os sinusóides, cercam os

hepatócitos com seus prolongamentos, armazenam vitamina A, sintetizam as proteínas do tecido conectivo e secretam vários fatores de crescimento). Todas essas células proliferam-se para restaurar o tecido hepático, sendo os hepatócitos os primeiros a se multiplicar. Tipicamente, observou-se que no rato o intervalo entre a ressecção hepática e o início da síntese de ADN nos hepatócitos é de 10 a 12 horas.¹ O primeiro pico de síntese de ADN ocorre em aproximadamente 24 horas, com um pico menor entre 36 e 48 horas.¹ Em humanos, o processo é algo mais lento, tendo início três dias após a agressão, vindo a se completar após 3 a 6 meses.^{12,13} Durante o processo de regeneração, as funções metabólicas do fígado não são prejudicadas e a complexa estrutura acinar é restabelecida ao final do processo.

Por outro lado, a regulação da massa hepática não se manifesta apenas por crescimento. Existem situações em que essa massa excede o que seria necessário para atender à demanda do organismo e o fígado é obrigado a diminuir sua massa funcionante para atingir a relação ideal com o peso corpóreo.^{5,14,15} Os exemplos são os casos de hiperplasia ou hipertrofia hepática induzida por drogas ou quando o paciente receptor de fígado recebe maior volume de parênquima hepático do que necessitaria, situação conhecida como transplante “large for size”. Nos últimos anos, com indicação mais freqüente de transplante em pacientes com menos de 10 kg de peso corpóreo, tal situação tem se tornado habitual.^{16,17} Durante a partição do fígado a ser transplantado, proveniente do doador adulto, o mínimo volume de parênquima hepático que se consegue, com pedículos suficientes para realização de anastomoses vasculares tecnicamente adequadas no paciente receptor, é o segmento lateral esquerdo (segmentos 2 e 3), volume este que pode ser excessivo para crianças com menos de 10 kg.

Durante a regeneração e remodelação do tecido hepático, verificou-se que o fenômeno da apoptose ocorre como resposta fisiológica, com a finalidade de eliminar células defeituosas que porventura se formem durante o rápido processo de divisão celular. Apoptose é a morte induzida por programa intracelular, segundo o qual células destinadas a serem eliminadas ativam enzimas que degradam seu próprio ADN nuclear, proteínas nucleares e citoplasmáticas. É um fenômeno normal que permite a destruição das células que não são mais necessárias (como por exemplo durante a embriogênese e o desenvolvimento fetal) e a manutenção da estabilidade do número de células nos diferentes tecidos. No fígado, a apoptose é também responsável pela perda de células em doenças virais, agressões tóxicas e necrose isquêmica¹⁸ o que, de certa forma, parece se contrapor ao clássico conceito de “morte celular programada”.

O processo da apoptose pode ser dividido em duas fases: iniciação e execução. Durante a primeira ocorre ativação do importante sistema enzimático das caspases (*cysteine asparagil specific proteases*). Tais enzimas são responsáveis, na fase de execução, pela clivagem de várias proteínas celulares vitais e pela ativação das endonucleases, o que culmina com a morte celular.¹⁸

A iniciação da apoptose, fenômeno amplo e complexo, ocorre por duas vias distintas: a extrínseca (ou mediada por receptores) e a intrínseca (ou mitocondrial). As duas vias convergem para a ativação das caspases, de acordo com o esquema mostrado na Figura 1.

Figura 1. Desenho esquemático das vias da apoptose.

A via extrínseca é iniciada pela união dos ligantes específicos, presentes no meio extracelular, com os chamados “receptores de morte” correspondentes, que se encontram na superfície da célula. Após tal união ocorre ativação do receptor que, por meio de sua porção intracelular denominada domínio de morte (DD - *death domain*), transmite um sinal de morte para o citoplasma. Os DDs dos receptores se ligam aos DDs de moléculas adaptadoras do tipo FADD (*Fas-associated death domain*) ou TRADD (*TNFR receptor adaptor with death domain*). Tais moléculas contêm também domínios efetores de morte (DED - *death effector domain*). Os DEDs interagem formando um complexo DED-DED que sequestra pró-caspases-8. Muitas moléculas de pró-caspase 8 se aglomeram e clivam umas as outras gerando caspase-8 ativada. A cascata de ativação das caspases é iniciada, o que leva à fase de

execução da apoptose. Os receptores de morte são representados principalmente pela superfamília de receptores do TNF (*tumoral necrosis factor*) (RTNF), incluindo RTNF-1, Fas (CD95) (*First apoptosis signal - cluster differentiation*), DR-4 e DR-5 (*death receptors*).¹⁹

A via intrínseca resulta de aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial e liberação de moléculas pró-apoptóticas para o citoplasma. Nas membranas mitocondriais e citoplasma encontram-se também as moléculas anti-apoptóticas, cuja produção é estimulada por fatores de crescimento. Essas proteínas reguladoras da apoptose fazem parte da família Bcl-2 (descobertas em *B-cell lymphoma*, como o segundo membro de uma série de proteínas descritas como resultado da translocação recíproca de genes entre os cromossomos 14 e 18, em pacientes com linfoma folicular).²⁰ Há mais de 20 proteínas nesta família, todas com função de regulação da apoptose. As duas principais proteínas anti-apoptóticas são Bcl-2 e Bcl-XL.²⁰ Quando as células são privadas dos sinais de sobrevivência ou sujeitas a estresse, Bcl-2 e Bcl-XL são substituídas por membros pró-apoptóticos da família, como Bak (*Bcl-2 associated killer*) e Bax (*Bcl-2 associated x protein*). Quando os níveis de Bcl-2 e Bcl-XL caem, a permeabilidade da membrana mitocondrial aumenta e muitas proteínas ativadoras da cadeia proteolítica passam da mitocôndria para o citoplasma. Dentre elas está o citocromo c, responsável pela ativação da caspase-9 que deflagra a cascata das caspases.

Na fase de execução da apoptose ocorre ativação das endonucleases, quebra da cromatina nuclear e do citoesqueleto. Há fragmentação da célula com a formação de corpos apoptóticos, constituídos de citoplasma, restos de organelas e fragmentos nucleares.¹⁸ (Figura 1)

Estudos recentes sugerem que o balanço entre a expressão de genes das proteínas pró-apoptóticas (Bak e Bax) e anti-apoptóticas (Bcl-2 e Bcl-XL) são de grande importância durante o processo da regeneração hepática.²¹⁻²⁴

Devido à relevância dos fenômenos regenerativos no fígado transplantado e a possibilidade de interferência de múltiplos fatores, quer endógenos quer exógenos, desperta-se o interesse pela possível ação das drogas imunossupressoras sobre a regeneração hepática, pois tais drogas constituem a base do tratamento após o transplante de órgãos sólidos.

Os corticosteróides foram os primeiros agentes imunossupressores utilizados em pacientes após transplante de órgãos sólidos, e permanecem como parte de muitos esquemas de imunossupressão.²⁵ Suas propriedades imunossupressoras estão relacionadas à capacidade de inibição da ligação de anticorpo e complemento, além da redução da síntese de citocinas imunomodulatórias chaves, como IL-2 e interferon-gama.²⁶ Adicionalmente, os esteróides inibem a secreção de IL-1 pelos macrófagos, um elemento importante na apresentação do antígeno e deflagração da rejeição aguda ao enxerto.²⁵ No entanto, a ação dos corticosteróides na regeneração hepática permanece controversa. Azzarone e cols. estudaram a ação da metilprednisolona na proliferação hepatocitária “in vivo” e “in vitro”, observando que o corticosteróide provoca melhora na regeneração do fígado do rato adulto submetido à hepatectomia, bem como aumento na proliferação hepatocitária em cultura. A ausência de insulina no meio reduziu drasticamente esse estímulo.²⁷ No entanto, esses resultados não puderam ser confirmados em trabalhos subsequentes. Kim e cols. constataram redução do índice mitótico nos hepatócitos de ratos submetidos à hepatectomia parcial, quando tratados com metilprednisolona.²⁸

Os inibidores da calcineurina, cujos representantes são a ciclosporina A e o tacrolimus (FK506), são os agentes imunossupressores mais utilizados atualmente em pacientes submetidos a transplante de fígado. A calcineurina é uma fosfatase cálcio-dependente responsável pela transcrição do IL-2, principal citocina envolvida na resposta imunológica mediada pelo linfócito T. As drogas agem, portanto, inibindo a produção de IL-2, e bloqueiam desta forma os mecanismos envolvidos na rejeição celular aguda.²⁵ Vários estudos têm demonstrado que esses agentes promovem regeneração hepática por uma via não imunológica.^{29,30} O tratamento com ciclosporina ou tacrolimus aumenta os índices mitóticos no fígado em regeneração de ratos adultos.³¹ Existe uma hipótese que as células NK (linfócitos “*natural killer*”) nos sinusóides hepáticos controlam a regeneração hepática, pois elas exibem citotoxicidade contra os hepatócitos em regeneração no modelo de hepatectomia parcial. Tamura e cols. sugerem que o FK506 promove regeneração hepática por diminuição do número e atividade das células NK e não por alterações em fatores de crescimento (HGF e TGF-beta).³² Escribano e cols. observaram que o tratamento com tacrolimus antes da ressecção de 70% do parênquima hepático em ratos adultos promove a regeneração por aumento da expressão dos receptores de insulina nos hepatócitos.³³

Considerando-se a importância do estudo dos efeitos das drogas imunossupressoras sobre a regeneração e remodelação do parênquima hepático em crianças submetidas a transplante de fígado, despertou-se o interesse pela pesquisa no animal de experimentação em crescimento, dadas as óbvias restrições éticas ao estudo em humanos. Por outro lado, do ponto de vista prático é inexecutável a realização de transplante de fígado em animais de pequeno porte em crescimento, o que impossibilita a pesquisa com este modelo. Desta forma, torna-se interessante a

utilização de outros modelos experimentais de regeneração hepática. Na literatura verifica-se que os dois modelos mais utilizados são aqueles “in vivo” com ratos jovens ou adultos e modelos de cultivo de hepatócitos “in vitro”. Há diferenças marcantes entre ambos os modelos, sendo a impossibilidade do estudo de fatores humorais a maior crítica à utilização dos modelos “in vitro”. Desta forma, os modelos “in vivo” são, certamente, os mais interessantes para pesquisas.³⁴

Desde o primeiro relato de ressecção de 70% da massa hepática em ratos adultos em 1931,³⁵ este tem sido o modelo mais universalmente utilizado para estudos de regeneração hepática, dada à facilidade técnica de execução do mesmo, à facilidade de obtenção do animal e ao baixo custo. Assim, a pesquisa na Internet revela que há 7667 publicações sobre o assunto utilizando diferentes modelos em animais de experimentação, desde 1950 até o presente (fevereiro/2007). Entretanto, não se encontrou nenhum trabalho com animais recém-nascidos ou em período de desmame, o que seria útil para melhor compreensão do processo de regeneração hepática nos organismos em crescimento, estabelecendo um paralelo com o que ocorre com crianças submetidas a transplantes parciais de fígado.

Provavelmente, à semelhança dos processos cicatriciais e regenerativos, existem diferenças quanto à intensidade e qualidade dos eventos biológicos da regeneração hepática com a evolução da idade. Assim, Biondo-Simões e cols. estudaram o efeito do envelhecimento na regeneração hepática, observando significativo retardo na recuperação do volume do fígado residual e redução na percentagem de hepatócitos em divisão celular em ratos velhos, quando comparados com ratos adultos jovens submetidos à hepatectomia parcial.³⁶

Supõe-se, portanto, que a seqüência e a intensidade dos eventos envolvidos na regeneração hepática em animais adultos não sejam completamente transponíveis aos

animais em crescimento. Assim, desenvolveram-se no Laboratório de Cirurgia Pediátrica da Faculdade de Medicina da USP (LIM-30) modelos de regeneração hepática em animais recém-nascidos e recém-desmamados, inéditos na literatura.³⁷

2. OBJETIVOS

Os objetivos da presente pesquisa foram:

1. Criar e padronizar modelos experimentais de regeneração hepática no animal recém-nascido (4 a 5 dias de vida) e no animal recém-desmamado (21 dias de vida), submetidos à ressecção parcial do parênquima hepático;
2. Estudar comparativamente os modelos de regeneração hepática no animal recém-nascido e no recém-desmamado;
3. Estudar os fenômenos de proliferação celular e apoptose envolvidos no processo da regeneração hepática, com a utilização de métodos histológicos, moleculares e imunoistoquímicos;
4. Estudar os efeitos de drogas imunossupressoras sobre a proliferação celular e a apoptose nos fígados em regeneração.

3. MATERIAIS e MÉTODOS

3.1. Animal de experimentação

Foram utilizados ratos Wistar de ambos os sexos. Os animais adultos e os recém-desmamados foram fornecidos pelo Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da USP e enviados ao Setor de Cirurgia Experimental do Instituto da Criança. Após a chegada na Instituição, os animais foram aclimatados por período de 24 horas, mantidos em gaiolas com água e ração “ad libitum”. A obtenção dos recém-nascidos foi feita por meio de acasalamento de animais adultos no próprio Setor de Cirurgia Experimental.

Os ratos recém-nascidos pesaram entre 5 e 8 gramas e os recém-desmamados entre 30 e 50 gramas.

Os animais foram submetidos a procedimentos cirúrgicos, sob anestesia, de acordo com as Normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA.³⁸

3.2. Plano piloto

3.2.1. Padronização da hepatectomia parcial

Todos os animais foram operados pelos mesmos dois cirurgiões. Os procedimentos cirúrgicos foram sempre realizados entre 9 e 10 horas da manhã, devido ao ritmo circadiano da regeneração hepática.³⁴ Para a padronização da hepatectomia parcial foram operadas três ninhadas de ratos com 5 e 21 dias de vida (total de 35 animais), com o objetivo de se obter experiência quanto à técnica anestésica e à padronização dos procedimentos cirúrgicos.

Inicialmente, foram operados dez ratos recém-desmamados, de uma ninhada de 15 filhotes. Após anestesia com éter em campânula, os animais foram pesados

individualmente em balança de precisão. A seguir, foram colocados e fixados com esparadrapo micropore nas quatro patas, em prancha adequada. Utilizando-se material de microcirurgia e lupa cirúrgica com aumento de três vezes, com técnica não asséptica, o acesso ao fígado foi feito por laparotomia mediana supra-umbilical. O ligamento triangular esquerdo do fígado foi seccionado para melhor exposição da víscera e procedeu-se à ligadura do pedículo de três dos cinco lobos hepáticos do rato (lobos esquerdo lateral, esquerdo medial e direito medial), com clipe metálico, imaginando-se que seria mais eficaz para hemostasia por não rasgar o parênquima. Os três lobos foram ressecados com tesoura acima desta ligadura, não sendo observada hemorragia local.

Desta forma, restaram apenas o lobo caudado e o direito. A incisão abdominal foi então fechada com sutura contínua, em plano único, utilizando-se fio inabsorvível monofilamentar de polipropileno 6-0, com agulha vascular.

Após a padronização da técnica da hepatectomia no animal de 21 dias de vida, passou-se ao animal em lactação, com 5 dias de vida. Nesta fase foram operados 20 animais.

Logo de início, percebeu-se que o simples contato da mão do cirurgião com o fígado foi suficiente para que ocorresse sangramento incontrollável do parênquima, seguido do óbito do animal. Concluiu-se que todo o procedimento cirúrgico deveria ser realizado sem qualquer manipulação direta no fígado. Para tanto, após a abertura da cavidade abdominal, não se procedeu à ligadura do ligamento triangular esquerdo. O fígado pôde ser quase completamente exteriorizado por meio de compressão exercida com os dedos indicadores do auxiliar sobre a face lateral e inferior de ambos os hemitorax. Com tal manobra, conseguiu-se exteriorização de quase todo fígado, estômago, baço e parte das alças intestinais, o que facilitou sobremaneira o

acesso ao hilo hepático e a via de drenagem venosa (Figura 2). Observou-se que a ligadura do pedículo com clipe metálico era inviável no rato recém-nascido, devido à impossibilidade de posicionamento do clipador no hilo tão pequeno. A ligadura do pedículo em sua base foi realizada com fio de algodão 3-0, obtendo-se a mesma eficácia para controle do sangramento do parênquima hepático. Seguiu-se a ressecção dos mesmos lobos esquerdo lateral, esquerdo medial e direito medial (Figura 3).

Devido a maior simplicidade técnica e menor custo, a técnica da ligadura com fio de algodão 3-0 passou a ser adotada em todas as hepatectomias subsequentes, inclusive nos animais de 21 dias.

Figura 2. Fotos mostrando fígado, estômago e alças intestinais exteriorizados por meio de compressão exercida com os dedos indicadores do auxiliar sobre a face lateral e inferior de ambos os hemitórax. No detalhe inferior, notar o fio de algodão que irá englobar o parênquima hepático e pedículos vasculares.

Figura 3. Desenho mostrando a ligadura do pedículo e parênquima hepático a ser ressecado (em cinza). No detalhe, visão em perfil - notar a inclusão do ramo da veia hepática na ligadura. 1 – veia cava inferior; 2 – veia porta; 3 – artéria hepática.

As duas primeiras ninhadas de animais recém-nascidos submetidos à experimentação foram mal sucedidas em consequência do alto índice de canibalismo das mães com os filhotes, logo após o procedimento cirúrgico. Seguindo orientação do Centro de Bioterismo da FMUSP, passou-se a lavar os animais com água morna após o procedimento cirúrgico para retirar o cheiro de éter anestésico e sangue. Em seguida, foram colocados envoltos na serragem e mantidos separados da mãe por período de 30 a 40 minutos. Após o cumprimento desta sequência de procedimentos, pôde-se obter bom índice de sobrevivência.

Os animais recém-nascidos foram mantidos em gaiolas com a mãe e os recém-desmamados com dieta habitual para ratos, e ao fim do experimento foram mortos com éter etílico em câmpula.

3.2.2. Análise da proporção entre massa do parênquima ressecado e massa hepática total

Em um grupo de animais recém nascidos e outro de recém-desmamados (seis em cada grupo) foi realizada a ressecção dos três lobos descrita anteriormente. Logo a seguir, os animais foram mortos e os fígados remanescentes foram pesados em balança de precisão (marca Sauter). Os pesos foram comparados com os pesos dos fígados de animais controles não operados.

3.3. Plano experimental

3.3.1. Caracterização do modelo experimental de regeneração hepática

3.3.1.1. Análise seqüencial do peso e da histologia do parênquima hepático remanescente

Nesta fase, 40 ratos recém-nascidos e 30 recém-desmamados foram submetidos à hepatectomia parcial. Após a cirurgia, os animais foram mantidos conforme anteriormente descrito.

Os ratos foram divididos em grupos, de acordo com o momento da morte: 1, 2, 3, 4 e 7 dias após a cirurgia. Para controle, foram incluídos animais não operados (recém-nascidos e recém-desmamados, seis de cada grupo).

Os ratos foram colocados em campânula de éter até a parada respiratória e, a seguir, foram pesados. Através de incisão mediana tóraco-abdominal colheram-se os lobos hepáticos remanescentes (ou fígados inteiros em animais controles), que foram pesados, fixados em solução tamponada de formaldeído a 10% por 24 a 48 horas, sendo então realizada inclusão em parafina. Foram colhidos cortes histológicos com

espessura de 4µm a partir dos blocos de parafina, corados com hematoxilina e eosina.

Foi realizada análise histológica qualitativa do parênquima hepático em microscópio Nikon Optiphot AFX-IIA, utilizando-se 300, 600 e 1500 aumentos, sendo necessária para este último imersão em óleo. Atentou-se para a presença dos seguintes aspectos: esteatose, figuras de mitose e corpos apoptóticos.

3.3.1.2. Estudo da proliferação celular e apoptose nos modelos de regeneração hepática

Os fenômenos de proliferação celular e apoptose após ressecção parcial do parênquima hepático foram estudados por meio de métodos moleculares e imunoistoquímicos.

Para tais avaliações, 36 animais foram divididos nos seguintes grupos:

-grupo controle: composto de 6 animais recém-nascidos e 6 recém-desmamados;

-grupo cirurgia simulada: 6 animais recém-nascidos e 6 recém-desmamados foram submetidos ao mesmo procedimento anestésico já descrito, seguido de laparotomia e fechamento da cavidade, sem ressecção de parênquima hepático;

-grupo hepatectomia: 6 animais recém-nascidos e 6 recém-desmamados foram submetidos a ressecção do parênquima hepático conforme a técnica descrita;

Os animais do grupo controle foram mortos em conjunto com os dos grupos cirurgia simulada e hepatectomia, 24 horas após o procedimento cirúrgico, e os fígados colhidos e divididos em dois fragmentos: um mergulhado em formaldeído tamponado a 10% para processamento histológico e análises imunoistoquímicas e outro congelado em nitrogênio líquido a -170°C para análises moleculares.

A. Estudos moleculares

Foram realizados estudos da expressão de genes relacionados à proliferação celular e apoptose, analisando-se amostras de 5 ou 6 animais de cada grupo.

Fragmentos de tecido hepático colhidos a fresco e imediatamente congelados em nitrogênio líquido foram mantidos a -170°C até seu processamento para estudo da expressão de genes de proliferação celular (IL-6) e de apoptose (Bcl-2, Bcl-XL, Bak e Bax).

Para avaliação da expressão dos genes descritos, quantificou-se o ARN, resultante da transcrição da sequência de nucleotídeos das moléculas de ADN. Utilizando-se a técnica do RT-PCR (*Reverse Transcriptase - Polimerase Chain Reaction*), o ARN em questão foi extraído do tecido e, pela ação da enzima transcriptase reversa, produzida uma fita de ADN complementar (cADN). Essa fita de cADN foi então amplificada pelo PCR. O produto amplificado foi submetido à eletroforese em gel de agarose, obtendo-se assim as bandas correspondentes aos genes. A magnitude da expressão de cada gene foi avaliada pela densitometria das bandas da eletroforese.

Os resultados dos níveis de expressão dos genes Bcl-2, Bcl-XL, Bak, Bax e IL-6 foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média.

A descrição detalhada da técnica de RT-PCR encontra-se em Anexos.

Os estudos moleculares especificados acima foram realizados nos animais dos grupos já descritos (controle, cirurgia simulada e hepatectomia) e nos animais dos grupos experimentais, que serão detalhados adiante.

B. Métodos imunoistoquímicos

Para determinação dos antígenos relacionados à proliferação celular e apoptose mais adequados, a serem pesquisados no tecido hepático, realizou-se seqüência de testes com os anticorpos que se ligam a antígenos classicamente pesquisados:

PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) - clone PC10, DAKO, código M 879, título 1/8000. Foi utilizado como complexo Envision mouse da DAKO, código K 4001.

Caspase – 3 clivada - Cell Signaling , código 96615, título 1/400.

Citoqueratina 18 clivada - M30, Cyto Death, Roche , código 2140349, título 1/100.

TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated digoxigenin uracil triphosphatase nick end labeling*)- Roche, Cat. No. 1 684 817.

O PCNA está relacionado à proliferação celular e os outros três (caspase-3 clivada, citoqueratina 18 clivada e TUNEL), à apoptose.

Os procedimentos técnicos dos métodos imunoistoquímicos foram testados em fragmentos hepáticos de animais do grupo hepatectomia. Os passos de tal metodologia são descritos detalhadamente em Anexos.

A análise ao microscópio óptico mostrou que o tecido preparado pelo método do PCNA evidenciou clara diferenciação entre os núcleos positivos (acastanhados) e negativos (azuis). O mesmo foi observado na lâmina preparada pelo método do TUNEL. Os resultados com a caspase-3 clivada e a citoqueratina-8 clivada não foram tão satisfatórios; desta forma o método escolhido para estudo da apoptose foi o TUNEL.

O antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) é uma proteína nuclear que atua como co-fator da enzima ADN - polimerase delta, sendo, portanto, essencial para a síntese de ADN e conseqüentemente para a replicação celular.

As quebras de cadeias de ADN “in situ” para detecção da apoptose foram evidenciadas pelo método de TUNEL (Roche, Cat. No. 1 684 817).

Durante a apoptose, ocorre fragmentação internucleossômica do ADN, sem especificidade de seqüência, porém mais intensa na cromatina em configuração aberta, em conseqüência da atividade de uma endonuclease. Essa fragmentação característica do genoma pode ser identificada “in situ” pela técnica do TUNEL.

C. Técnica de “tissue microarray” (TMA)

“Tissue microarray” constitui um método que redistribui numerosos cilindros teciduais de blocos de parafina convencionais (blocos doadores) em um novo bloco (bloco receptor). Este bloco compartimentalizado contém as várias amostras teciduais em uma disposição definida, permitindo assim análise histológica simultânea. Uma agulha oca é utilizada para remover fragmentos cilíndricos de tecidos previamente fixados em parafina de dimensões aproximadas de 1,0 X 1,0 X 4,0 mm. Estes fragmentos são então inseridos em bloco de parafina receptor precisamente compartimentalizado. São realizados cortes histológicos destes blocos para coloração e análise imunoistoquímica posterior.

No presente estudo foi realizado “tissue microarray” contendo amostras de tecido hepático de todos os animais dos grupos controle, hepatectomia e dos grupos experimentais, totalizando 88 amostras (Figura 4). Foram adicionados 10 fragmentos de tecido pulmonar para facilitar a identificação das amostras. Pelas técnicas

imunohistoquímicas já descritas, pesquisou-se em dois TMAs distintos a presença dos dois antígenos: PCNA e TUNEL.

Figura 4. Foto mostrando os fragmentos de tecido hepático dispostos em lâmina única (dimensões originais - 2,0 X 1,8 cm).

D. Análise histomorfométrica

Realizou-se a medida da porcentagem de núcleos de hepatócitos corados pelos métodos de PCNA e TUNEL separadamente nas 88 amostras teciduais de cada TMA. Para isso, foram observados de 3 a 5 campos aleatórios de cada amostra tecidual, utilizando-se 300 aumentos (ocular de 15 aumentos e objetiva de 20 aumentos). Com auxílio de graticulo quadrado (1 x 1cm) acoplado à ocular do microscópio (Nikon Optiphot AFX-IIA), foram contados, em cada campo, o número de núcleos de hepatócitos corados pelas técnicas imunoistoquímicas descritas e o número total de núcleos de hepatócitos dentro da área do graticulo.

3.3.2. Avaliação de efeitos das drogas imunossupressoras

Nesta fase, foram utilizados 18 animais recém-nascidos e 18 recém-desmamados, divididos em três grupos de seis. Foram administradas drogas imunossupressoras (metilprednisolona, tacrolimus ou ciclosporina, separadamente) concomitantes à realização da hepatectomia, para os grupos de animais recém-nascidos e recém-desmamados que foram assim distribuídos em grupos, de acordo com a droga que receberam:

Grupos metilprednisolona: logo após o término do fechamento da incisão, foi realizada punção da cavidade peritoneal com agulha e seringa de insulina para administração de 100 mg de metilprednisolona /kg de peso do animal.

Grupos ciclosporina: injeção intragástrica de 20mg/kg de ciclosporina.

Grupos tacrolimus: injeção intragástrica de 1mg/kg de tacrolimus.

A dose de metilprednisolona utilizada em crianças logo após a reperfusão do enxerto hepático é de 20mg/kg por via intravenosa; a dose inicial de ciclosporina por

via oral é de aproximadamente 5 mg/kg a cada 12 horas, e de tacrolimus por via oral 0,1 a 0,2 mg/kg a cada 12 horas. Sabe-se que o nível sérico adequado só é estabelecido após 36 horas do início do uso dessas drogas. Foram utilizadas doses mais elevadas no experimento pois os imunossupressores foram administrados em dose única, com a intenção de se atingir nível sérico adequado 24 horas após. Não foi possível a coleta de sangue para quantificação do nível sérico das drogas.

Todos os animais foram mortos 24 horas após a hepatectomia para colheita do fígado residual, que foi dividido em dois fragmentos: um congelado em nitrogênio líquido a -170°C para as análises moleculares e outro imerso em solução tamponada de formaldeído a 10% por período de 24 a 48 horas, para processamento histológico e análises imunoistoquímicas.

Os resultados obtidos nestes grupos experimentais referentes às análises moleculares foram comparados com o grupo hepatectomia. Os resultados das análises imunoistoquímicas foram também comparados com os animais do grupo controle.

Na Figura 5 está representado o resumo da metodologia.

Figura 5. Organograma demonstrando o resumo da metodologia.

3.4. Análise estatística

A comparação dos índices de óbito dos animais recém-nascidos e recém-desmamados foi feita utilizando-se o teste exato de Fisher. Os dados foram expressos sob forma de gráficos com os valores de médias $\pm$ erros padrões das médias. Para a comparação dos dados referentes à expressão dos genes, foi utilizada análise de variância (ANOVA – “one way”) e para comparação entre grupos, o teste de Bonferroni. Para a comparação dos dados de histomorfometria, foi utilizado teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, sendo que para a comparação entre os grupos foi utilizado o teste de Dunn. A hipótese de igualdade das médias foi rejeitada para $P < 0,05$.

4. RESULTADOS

Neste capítulo serão apresentados, em sequência, os resultados do plano piloto e do plano experimental. Para melhor compreensão, os resultados numéricos serão apresentados sob forma de gráficos, sendo que os valores individuais dos pesos dos fígados e dos animais, bem como das expressões dos genes e da análise imunoistoquímica constam em ANEXOS.

4.1. Plano Piloto

4.1.1. Proporção entre massa do parênquima ressecado e massa hepática total

As médias dos pesos dos fígados residuais logo após a hepatectomia e dos fígados de animais controles estão representadas no Gráfico 1. Observou-se que a ressecção realizada correspondeu, de fato, a aproximadamente 70% da massa hepática total.

Gráfico 1. Valores das médias $\pm$ erros padrões das médias dos pesos dos fígados de animais controles e dos fígados residuais logo após hepatectomia, em grupos de animais recém nascidos e recém-desmamados.

4.2. Plano Experimental

4.2.1. Caracterização do modelo experimental de regeneração hepática

4.2.1.1. Mortalidade dos animais

Durante a fase de análise sequencial do peso e histologia do parênquima hepático remanescente (item **3.3.1.1**), verificou-se que 30% dos animais recém-nascidos (12 em total de 40 animais) morreram durante o experimento, sendo que entre os animais recém-desmamados (total de 30) não houve mortes. A comparação entre esses grupos mostrou diferença significativa em relação à mortalidade ($P = 0,003$).

4.2.1.2. Relação entre peso do fígado remanescente e peso do animal

Para avaliar o crescimento do parênquima hepático remanescente, foram calculadas as relações entre o peso do fígado colhido à necropsia e o peso de cada animal, nos dias subsequentes à hepatectomia. Essas relações, expressas em porcentagens, são mostradas no Gráfico 2.

Gráfico 2. Relações percentuais entre peso do fígado e peso do animal, nos dias subsequentes à hepatectomia (médias $\pm$ erros padrões das médias; C = grupo controle; *P < 0,001 em relação ao grupo controle; **P > 0,05 em relação ao grupo controle).

Verificou-se que houve diminuição significativa na massa do fígado no 1º dia de pós-operatório (P < 0,001 para os animais recém-nascidos e recém-desmamados), havendo recuperação completa no 7º dia após hepatectomia (P > 0,05 em relação aos grupos controles).

4.2.1.3. Avaliação histológica

O fígado do animal recém-nascido controle apresentou estrutura sinusoidal típica, hepatócitos com citoplasma granuloso, refletindo intensa atividade das organelas (Figura 6-1). Observaram-se vários focos de hematopoese extramedular espalhados pelo parênquima hepático e, em geral, não foram vistas figuras de mitose nem corpos apoptóticos.

No primeiro dia após hepatectomia observou-se que os núcleos dos hepatócitos aumentaram de tamanho, tornando-se vesiculosos e seus nucléolos ficaram bem evidentes. A arquitetura esteve preservada, mantendo-se a celularidade das trabeculações hepáticas e os focos de hematopoese extramedular. Não foram detectadas figuras de mitose. No segundo dia, surgiu intensa esteatose macrogoticular, presente na totalidade do lóbulo. Foram observados corpos apoptóticos em pequena quantidade (Figura 9). Houve diminuição significativa da esteatose no terceiro dia, com o aparecimento de algumas figuras de mitose em hepatócitos. No quarto dia, observou-se persistência das mitoses e diminuição mais acentuada da esteatose, com regressão completa no sétimo pós-operatório. Nesse dia, o aspecto histológico do parênquima voltou a ser igual ao dos animais controle (Figura 6 - 2 a 6).

O fígado do animal recém-desmamado controle apresentou aspecto semelhante ao do recém-nascido, não sendo observados, no entanto, focos de hematopoese (Figura 7 - 1). No primeiro dia após hepatectomia, os núcleos também se tornaram vesiculosos com nucléolos evidentes; observaram-se figuras de mitose (em suas várias fases) em hepatócitos espalhadas pelo parênquima (Figura 8). No dia subsequente, verificou-se notável aumento no número de mitoses, e não se observou a intensa infiltração gordurosa ocorrida nos animais recém-nascidos. Surgiram poucos corpos apoptóticos (Figura 9). A partir do terceiro dia, a quantidade de figuras de mitose diminuiu progressivamente, não tendo sido mais encontradas no sétimo dia após hepatectomia (Figura 7 - 2 a 6).

Figura 6. Microfotografias mostrando os aspectos histológicos do fígado de animal recém-nascido controle e dos fígados residuais nos diferentes dias após hepatectomia (aumentos originais 150 e 300 vezes). 1 – controle; 2, 3, 4, 5, 6 – correspondem a 1, 2, 3, 4 e 7 dias após hepatectomia, respectivamente. Na foto 1, notar a estrutura sinusoidal típica, com vários focos de hematopoese extramedular (setas). Na foto 2, os núcleos dos hepatócitos mostram-se aumentados, com nucléolos evidentes. A arquitetura mantém-se preservada, com focos de hematopoese. Na foto 3, notar intensa esteatose macrogoticular. Na foto 4, verifica-se redução da esteatose. Na foto 5, observam-se figuras de mitose em hepatócitos (setas) e acentuada redução da esteatose. Na foto 6, regressão completa da esteatose com aspecto histológico semelhante ao controle.

Figura 7. Microfotografias mostrando os aspectos histológicos do fígado de animal recém-desmamado controle e dos fígados residuais, nos diferentes dias após hepatectomia (aumentos originais 300 e 600 vezes). 1 – controle; 2, 3, 4, 5, 6 – correspondem a 1, 2, 3, 4 e 7 dias após hepatectomia, respectivamente. Na foto 1, notar a estrutura hepática normal. Na foto 2, observam-se núcleos vesiculosos e nucléolos evidentes. Na foto 3, figuras de mitose em diferentes fases (setas) e ausência de esteatose. Notar que a partir do terceiro dia (foto 4) o aspecto histológico tende a se normalizar (fotos 5 e 6).

Para melhor ilustração, nas Figuras 8 e 9 são mostrados, em detalhe, figuras de mitose e o aspecto típico de hepatócito em apoptose.

Figura 8. Microfotografia de fígado de rato recém-desmamado dois dias após hepatectomia, mostrando hepatócitos em mitose (setas) (aumento de 1500 vezes, sob imersão em óleo). Notar a organização dos cromossomos para o processo de divisão celular.

Figura 9. Microfotografia de fígado de rato recém-desmamado 1 dia após hepatectomia, mostrando aspecto de hepatócito em apoptose (seta). Notar o aspecto eosinofílico e os restos nucleares na periferia (aumento de 1500 vezes sob imersão em óleo).

4.2.1.4. Estudo da proliferação celular e apoptose

A. Estudos moleculares

As expressões dos genes estudados estão apresentadas sob forma de gráficos mostrando as médias $\pm$ erros padrões das médias das densidades relativas das bandas dos genes amplificadas pelo RT-PCR dos grupos controle, cirurgia simulada e hepatectomia. Para as análises estatísticas, foi possível sempre utilizar método paramétrico, visto que os valores encontrados apresentaram distribuição normal e os grupos a mesma variância. No Gráfico 3 são mostradas as expressões do gene da IL-6 nos grupos de estudo bem como o aspecto das bandas.

Gráfico 3. Valores das densidades relativas das bandas do gene da IL-6 dos fígados dos animais dos grupos de estudo (médias $\pm$ erros padrões das médias; *significante em relação ao grupo controle; #significante em relação ao grupo simulado). Abaixo, observam-se as bandas correspondentes de RT-PCR, repetidas em triplicata, de acordo com a metodologia descrita.

Nos animais recém-nascidos controles, verificou-se que não houve expressão do gene da IL-6. Cirurgia simulada e hepatectomia promoveram aumento significativo nos níveis de expressão deste gene ($P = 0,02$ e $P = 0,001$ em relação aos controles, respectivamente). Além disso, a comparação entre estes dois grupos mostrou que a expressão de IL-6 foi significativamente maior no grupo hepatectomia do que no grupo cirurgia simulada ($P = 0,01$). Nos animais recém-desmamados controles, houve expressão do gene da IL-6, sem diferença significativa em relação aos animais do grupo cirurgia simulada. A hepatectomia promoveu aumento significativo da expressão da IL-6 em comparação aos grupos controle ($P = 0,001$) e cirurgia simulada ($P = 0,01$).

No Gráfico 4 são mostradas as expressões dos genes pró-apoptóticos nos grupos de estudo.

Gráfico 4. Valores das densidades relativas das bandas dos genes pró-apoptóticos dos fígados dos animais dos grupos de estudo (médias $\pm$ erros padrões das médias; *significante em relação ao grupo controle).

Verificou-se que não houve diferença na expressão do gene Bax nos animais do grupo cirurgia simulada em relação aos do grupo controle, tanto recém-nascidos quanto recém-desmamados. No entanto, a expressão do gene Bak foi significativamente maior nos animais recém-nascidos e recém-desmamados submetidos à cirurgia simulada do que nos controles ($P = 0,001$ e $P = 0,02$, respectivamente). A expressão dos dois genes pró-apoptóticos diminuiu após a hepatectomia, comparativamente aos animais controles (Bax- $P = 0,02$ e $P = 0,001$ para animais recém-nascidos e recém-desmamados, respectivamente; Bak – $P = 0,001$).

No Gráfico 5 são mostradas as expressões dos genes anti-apoptóticos.

Gráfico 5. Valores das densidades relativas das bandas dos genes anti-apoptóticos dos fígados dos animais dos grupos de estudo (médias $\pm$ erros padrões das médias; *significante em relação ao grupo controle; **não significante em relação ao grupo controle).

Verificou-se que nos animais recém-nascidos e recém-desmamados, a expressão dos genes Bcl-2 e Bcl-XL no grupo cirurgia simulada não mostrou diferença em relação ao grupo controle. A expressão de Bcl-2 aumentou após a hepatectomia nos animais recém-desmamados ($P = 0,01$) e mostrou tendência a aumento nos animais recém-nascidos, embora não significativa ($P > 0,05$). A expressão de Bcl-XL não se alterou com a ressecção hepática nos animais recém-nascidos e nos animais recém-desmamados houve tendência a aumento (diferença não significativa).

4.2.2. Avaliação dos efeitos das drogas imunossupressoras

A. Estudos moleculares

Para melhor ilustração, na Figura 9 são mostradas as bandas de RT-PCR de um dos genes estudados (Bcl-2), dos animais dos grupos experimentais.

Figura 10. Foto das bandas de RT-PCR do gene Bcl-2, repetidas em triplicata, de acordo com a metodologia descrita. Grupos: 1 - hepatectomia; 2 - hepatectomia + metilprednisolona; 3 - hepatectomia + ciclosporina; 4 - hepatectomia + tacrolimus. Verificar as diferentes intensidades das bandas nos grupos experimentais.

No Gráfico 6 são mostradas as expressões do gene da IL-6 nos grupos experimentais. Verificou-se que não houve diferença na expressão deste gene nos animais dos grupos que receberam drogas imunossupressoras em relação ao grupo hepatectomia, tanto nos animais recém-nascidos quanto nos recém-desmamados ($P > 0,05$).

Gráfico 6. Valores das densidades relativas das bandas do gene da IL-6 dos fígados dos animais dos grupos experimentais (médias $\pm$ erros padrões das médias).

No Gráfico 7 são mostradas as expressões do gene Bak nos grupos experimentais. Verificou-se que, nos grupos de animais recém-nascidos, houve aumento na expressão deste gene nos animais dos grupos que receberam metilprednisolona e ciclosporina em relação ao grupo hepatectomia ($P < 0,001$ e $P =$

0,02 respectivamente para os grupos metilprednisolona e ciclosporina). Nos animais recém-desmamados não houve alteração na expressão do gene.

Gráfico 7. Valores das densidades relativas das bandas do gene Bak dos fígados dos animais dos grupos experimentais (médias $\pm$ erros padrões das médias). (*significante em relação ao grupo hepatectomia, $P < 0,001$ e $P = 0,02$ respectivamente para os grupos metilprednisolona e ciclosporina).

Nos Gráficos 8 e 9 são mostradas as expressões dos genes Bax e Bcl-XL, respectivamente, nos grupos experimentais. Verificou-se que não houve diferença na expressão destes genes nos animais dos grupos que receberam drogas imunossupressoras em relação ao grupo hepatectomia, tanto recém-nascidos quanto recém-desmamados ($P > 0,05$).

Gráfico 8. Valores das densidades relativas das bandas do gene Bax dos fígados dos animais dos grupos experimentais (médias $\pm$ erros padrões das médias).

Gráfico 9. Valores das densidades relativas das bandas do gene Bcl-XL dos fígados dos animais dos grupos experimentais (médias $\pm$ erros padrões das médias).

No Gráfico 10 são mostradas as expressões do gene Bcl-2 nos grupos experimentais. Verificou-se que nos animais recém-nascidos e recém-desmamados houve, de modo uniforme, aumento da expressão deste gene nos que receberam metilprednisolona e tacrolimus em relação ao grupo hepatectomia (recém-nascidos - $P < 0,001$ e $P = 0,02$ e recém-desmamados - $P < 0,001$ e $P = 0,01$, respectivamente para os grupos metilprednisolona e tacrolimus).

Gráfico 10. Valores das densidades relativas das bandas do gene Bcl-2 dos fígados dos animais dos grupos experimentais (médias $\pm$ erros padrões das médias). (*significante em relação ao grupo hepatectomia; recém-nascidos - $P < 0,001$ e $P = 0,02$, recém-desmamados - $P < 0,001$ e $P = 0,01$, respectivamente para os grupos 2 e 4).

B. Análise imunoistoquímica

Verificou-se que os núcleos dos hepatócitos foram adequadamente corados, tanto pela técnica do PCNA quanto TUNEL. Os núcleos considerados positivos foram corados em cor castanho enquanto que os núcleos negativos apresentaram coloração azul, de acordo com as Figuras 11 e 12.

Figura 11. Microfotografia de lâmina corada pelo PCNA, de animal do grupo hepatectomia. Notar os núcleos positivos indicados pelas setas (aumento 1500X sob imersão).

Figura 12. Microfotografia de lâmina corada pelo TUNEL, de animal do grupo hepatectomia. Notar o núcleo positivo indicado pela seta (aumento 1500X sob imersão).

As quantidades de núcleos de hepatócitos corados por ambas as técnicas separadamente, em relação ao total de células por campo do microscópio, expressas sob forma de médias das porcentagens $\pm$ erros padrões das médias, estão mostradas nos Gráficos 11 a 14. Para as análises estatísticas, utilizou-se método não paramétrico, visto que os valores encontrados não apresentaram distribuição normal com grande desvio-padrão em cada grupo. As comparações dos grupos metilprednisolona, ciclosporina e tacrolimus com o grupo hepatectomia demonstraram que essas drogas não tiveram efeito significativamente estatístico na proliferação de hepatócitos e no índice de apoptose, tanto nos recém-nascidos quanto recém-desmamados ($P > 0,05$).

Gráfico 11. Valores dos percentuais dos núcleos de hepatócitos corados pelo PCNA nos grupos de animais recém-nascidos (médias $\pm$ erros padrões das médias).

Gráfico 12. Valores dos percentuais dos núcleos de hepatócitos corados pelo PCNA nos grupos de animais recém-desmamados (médias $\pm$ erros padrões das médias).

Gráfico 13. Valores dos percentuais dos núcleos de hepatócitos corados pelo TUNEL nos grupos de animais recém-nascidos (médias $\pm$ erros padrões das médias).

Gráfico 14. Valores dos percentuais dos núcleos de hepatócitos corados pelo TUNEL nos grupos de animais recém-desmamados (médias $\pm$ erros padrões das médias).

5. DISCUSSÃO

A criação de modelos vivos para o estudo dos fenômenos biológicos é de essencial importância para a compreensão da complexidade e da interação entre os vários elementos envolvidos nesses fenômenos. Em especial, os processos regenerativos do fígado resultam de uma rede de fatores humorais, celulares e moleculares que geram sinais iniciadores da divisão celular. Sabe-se, por exemplo, que não há replicação de ADN em hepatócitos em cultura a menos que fatores de crescimento sejam acrescentados ao meio. Mesmo assim, a capacidade de replicação de hepatócitos em cultura mantidos em condições convencionais é muito limitada,³⁴ diferente do que ocorre “in vivo”.

Os animais utilizados como modelo experimental de regeneração hepática variam de tamanho, desde camundongos a porcos. Animais grandes e pequenos têm suas próprias vantagens e desvantagens.

Animais de pequeno porte como ratos e camundongos são úteis por serem de fácil manuseio e apresentarem problemas logísticos e financeiros mínimos. Devido à disponibilidade de ótimas ferramentas imunológicas e animais geneticamente modificados (por exemplo, camundongos transgênicos e “knock-out”), existem amplas possibilidades metodológicas para a investigação de processos patogênicos especiais envolvidos na regeneração hepática.³⁴ Outra indiscutível vantagem desses animais refere-se ao pequeno espaço físico necessário para acomodá-los, fato que se reveste de importância em laboratórios localizados em áreas urbanas. Ao contrário, animais de grande porte apresentam desvantagens em relação ao alto custo e necessidade de grandes espaços para manutenção.

Embora a utilização de modelos vivos seja cada vez mais ampla, a pesquisa com animais em crescimento e em especial com recém-nascidos é relativamente restrita. Assim, são citados na literatura modelos de regeneração pancreática em ratos

recém-nascidos tratados com estreptozotocina³⁹ e estudos de cicatrização de feridas em animais recém-nascidos geneticamente modificados.⁴⁰

Quanto aos conhecimentos sobre regeneração hepática, estudos sugerem que hepatócitos de ratos adultos jovens e velhos parecem ter a mesma capacidade de repopulação. Aparentemente, tais células não entram em senescência, e o número de replicações de hepatócitos transplantados em experimentos com transplantes seriados excede aquele esperado para células de mamíferos.² No entanto, de modo geral, metabolismo, capacidade regenerativa e resposta ao trauma cirúrgico se alteram com a idade, de forma que não se pode inferir que o processo global de regeneração hepática em organismos em crescimento seja semelhante ao do adulto.

A criação de modelos vivos em animais de pequeno porte recém-nascidos requer aprimoramento técnico e habilidade microcirúrgica, pois desses fatores dependem o sucesso do procedimento operatório e a sobrevivência do animal. No Setor de Cirurgia Experimental do Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da FMUSP, foram previamente desenvolvidos modelos de hérnia diafragmática congênita e gastrosquise em fetos de coelhos, realizando-se, respectivamente, ressecção parcial do diafragma e parede abdominal, em fetos de 25 dias de idade gestacional, por meio de incisão no útero da fêmea prenhe.⁴¹⁻⁴⁴ A experiência e a destreza cirúrgica adquiridas com esses modelos tornaram exequível a ressecção hepática em animais recém-nascidos.

No presente trabalho, após fase inicial de treinamento técnico, os animais passaram a ser operados com mínima manipulação dos tecidos, em período de tempo entre 5 e 10 minutos, o que causou trauma cirúrgico de pequeno porte. Como consequência, pôde-se supor que a resposta inflamatória e as alterações metabólicas causadas pelo estresse cirúrgico em si foram reduzidas, atribuindo-se os resultados

obtidos ao fenômeno de regeneração do fígado e não à resposta metabólica ao trauma operatório. Tal fato pôde ser comprovado pelas comparações dos resultados dos grupos controle, hepatectomia e cirurgia simulada.

Além disso, a pequena manipulação e a rapidez do procedimento minimizaram as complicações intra-operatórias e anestésicas permitindo, portanto, alto índice de sobrevida. Os óbitos ocorridos nos animais recém-nascidos deveram-se à grande labilidade desses organismos, ao sangramento no local da secção do parênquima hepático ou ao canibalismo da mãe. Outrossim, os animais recém-desmamados demonstraram ser de manuseio mais fácil, com menor labilidade quando submetidos aos procedimentos anestésico-cirúrgicos. O fígado é menos friável e não se observaram hemorragias após a manipulação. Como consequência, o índice de sobrevida dos animais recém-desmamados foi consideravelmente maior do que o dos recém-nascidos.

A criação do modelo utilizado na presente pesquisa adquire importância por abrir perspectivas para investigações futuras. Também, o conhecimento detalhado da anatomia hepática do rato⁴⁵ em conjunto com a utilização de recursos de microcirurgia permitirá o desenvolvimento de outros modelos experimentais em ratos recém-nascidos para investigações sobre etiopatogenia e fisiopatologia de hepatopatias ainda não elucidadas, principalmente a atresia das vias biliares, maior causa de transplante hepático na criança (cerca de 60% dos casos).^{46,47}

Além da atresia biliar, verifica-se hoje que o transplante de fígado se consolidou como tratamento eficaz para grande parte de outras doenças hepáticas da criança.⁴⁸ Percebe-se daí a importância dos estudos em animais de experimentação com idade cronológica compatível com esses pacientes. Crianças com atresia das vias biliares apresentam progressiva obstrução da árvore biliar extra-hepática,

levando à cirrose e doença hepática terminal até o fim do primeiro ano de vida, por mecanismo ainda não esclarecido. Com o objetivo de retardar a evolução da cirrose, realiza-se a portoenterostomia à Kasai, que promove regressão da icterícia em apenas 25% dos casos.⁴⁹ Desta forma, as crianças portadoras de atresia de vias biliares não submetidas à cirurgia de Kasai ou aquelas operadas sem sucesso necessitarão de transplante de fígado em idade precoce, entre 6 e 12 meses de vida.⁴⁹

Na tentativa de tratamento de algumas doenças hepáticas graves com manifestação no período neonatal, e mesmo nos casos de atresia de vias biliares que promovem rápida deterioração da função hepática, o transplante tem sido indicado em crianças cada vez menores, havendo, no presente, publicações de casuísticas de transplantes em crianças com menos de 5 kg,¹⁷ o que reforça a importância de se criar um modelo de regeneração no animal recém-nascido.

Outrossim, os modelos de hepatectomia e regeneração em animais recém-nascidos e recém-desmamados permitem analogia com o transplante inter-vivos ou de fígado de cadáver compartilhado (“split liver”), em que apenas o segmento lateral esquerdo é implantado no receptor. Por vezes, a massa de parênquima transplantado é diminuta e insuficiente para todas as demandas metabólicas do receptor (chamado transplante “small for size”), sendo essencial a ocorrência dos fenômenos regenerativos para a retomada de todas as funções do órgão.

Na presente pesquisa, após a padronização do procedimento cirúrgico, avaliou-se a proporção entre a massa do parênquima ressecado e a massa hepática total. Comparando com o modelo de regeneração mais utilizado em animais adultos,³⁵ a ressecção em nosso modelo (lobos hepáticos esquerdo lateral, esquerdo medial e direito medial) também correspondeu à 70% da massa do parênquima, o que permite o estabelecimento de paralelos e comparações com os modelos de

animais adultos. Deve-se lembrar que as ressecções de 70% do parênquima hepático são as que deflagram os fenômenos regenerativos com maior intensidade. Por outro lado, foi demonstrado que ressecções de porcentagens menores ou maiores do que esta se associam a resposta regenerativa mais lenta.²

Devido à inexistência de descrições prévias de modelos em animais em crescimento, foi também necessária a verificação de que a hepatectomia parcial com ressecção de 70% do peso do fígado seria um bom modelo de regeneração em tais animais. Nesse sentido, foi realizada análise sequencial do peso e da histologia do órgão.

Quanto à evolução do peso do fígado nos dias subsequentes à hepatectomia, tanto dos animais recém-nascidos quanto recém-desmamados, pôde-se observar recuperação gradual da massa hepática a partir do primeiro dia de pós-operatório, chegando a níveis iguais ao do controle no sétimo dia. Tais resultados assemelham-se aos obtidos após hepatectomias em ratos e camundongos adultos.^{36,50} No entanto, no rato recém-nascido, observa-se aumento mais pronunciado da massa hepática do primeiro para o segundo dia após ressecção. A análise histológica evidencia acentuado grau de esteatose no parênquima, coincidindo com tal aumento de peso. As figuras de mitose, que refletem a atividade proliferativa, foram detectadas em maior frequência mais tardiamente, a partir do terceiro dia.

Embora tenha sido descrito o acúmulo de gordura no parênquima hepático nas fases iniciais da regeneração, não são conhecidos os mecanismos responsáveis nem o significado funcional de tal alteração. Foi demonstrado que o bloqueio desse acúmulo de gordura pela administração de leptina prejudica a proliferação hepatocitária durante a regeneração em camundongos adultos.⁵¹ No entanto, nos animais recém-desmamados não foi observada esteatose tão pronunciada como nos

recém-nascidos e não há descrições desse achado em tal intensidade em modelos em ratos adultos.

Na prática clínica, sabe-se que diferentes mecanismos levam ao acúmulo de triglicérides no fígado e o problema pode estar relacionado à ingestão de álcool ou toxinas, desnutrição protéica, diabetes mellitus, obesidade, jejum prolongado e hipóxia. Os ácidos graxos livres do tecido adiposo ou aqueles provenientes da dieta são normalmente transportados para dentro do hepatócito. São então esterificados a triglicerídeos, convertidos em colesterol ou fosfolídeos, ou oxidados a corpos cetônicos. A liberação dos triglicerídeos dos hepatócitos requer a associação com apoproteínas para formar lipoproteínas, que podem então passar para a circulação sanguínea. O acúmulo excessivo de triglicérides no fígado pode resultar de defeitos em qualquer etapa dessa seqüência de eventos.¹⁸

Possivelmente, a imaturidade dos sistemas enzimáticos dos hepatócitos dos animais recém-nascidos leva à insuficiência relativa do metabolismo lipídico, quando submetidos à situação de demanda metabólica aumentada do parênquima residual após a ressecção parcial da massa hepática, e isso levaria ao acúmulo excessivo de gordura no hepatócito.

A análise histológica seqüencial dos fígados dos ratos recém-desmamados revelou a presença de figuras de mitose em maior freqüência e mais precocemente que nos recém-nascidos, já a partir do primeiro dia após hepatectomia. Desta forma, o ganho inicial de peso do parênquima hepático nos animais recém-desmamados já se fez à custa de replicação celular, e não de acúmulo de gordura. Embora mais retardada, a atividade proliferativa nos animais recém-nascidos resultou, no entanto, na mesma restituição completa do parênquima ao final do sétimo dia.

Há crescente interesse pelo estudo da homeostase celular durante os processos regenerativos dos tecidos. A homeostase é resultado do balanço entre proliferação celular e apoptose.¹⁸ Desta forma, analisaram-se os níveis de expressão de genes conhecidamente reguladores da proliferação e da apoptose utilizando estudos moleculares.

A análise da literatura médica recente, tanto clínica quanto experimental, permite concluir que os métodos de biologia molecular são de uso cada vez mais corrente, sendo responsáveis por grandes avanços no entendimento dos mecanismos fisiológicos e patológicos em geral. A implementação de tais métodos nos laboratórios de pesquisa científica permite grande ampliação nas possibilidades investigativas e melhora da qualidade e consistência dos resultados dos estudos experimentais. A presente pesquisa foi responsável pela implantação, desenvolvimento e treinamento para a realização das técnicas de biologia molecular (em especial o RT-PCR) em todas as suas etapas, no Laboratório de Cirurgia Pediátrica da FMUSP (LIM-30), permitindo assim que a mesma metodologia seja empregada em pesquisas futuras. Abrem-se grandes perspectivas para inúmeras investigações em outras áreas da cirurgia pediátrica e cirurgia experimental.

Dentre os reguladores da proliferação celular, estudou-se a expressão do gene da interleucina-6, que é importante fator pró-regenerativo e uma proteína de fase aguda do fígado, conferindo também resistência à lesão hepática causada por toxinas, isquemia ou Fas (*First apoptosis signal*). Mais de 40% dos genes que são precocemente induzidos no processo de regeneração hepática são regulados pelo menos parcialmente pela IL-6.⁵²

Estudos prévios relataram aumento da expressão de RNA mensageiro de IL-6 e níveis séricos elevados de IL-6 em resposta a agressão cirúrgica ou inflamação,⁵³⁻⁵⁶

o que também foi observado no grupo cirurgia simulada do presente trabalho. Com a hepatectomia, houve um aumento ainda maior na expressão do RNA mensageiro, o que sugere que a IL-6 esteja realmente envolvida nos mecanismos de regeneração hepática do animal em crescimento.

Interessante notar que a expressão do gene da IL-6 no fígado do rato recém-nascido controle é praticamente nula. No entanto, o parênquima do animal recém-nascido, em condições normais, exibe atividade proliferativa, compatível com o próprio crescimento do animal. Assim, embora seja evidente a importância da IL-6 na regeneração hepática, conclui-se que devam existir outros mecanismos não relacionados a essa proteína na proliferação de hepatócitos nos organismos em crescimento.

Um estudo recente em ratos adultos visou esclarecer o real papel da IL-6 na regeneração hepática. Foi realizada ressecção de 70% do parênquima hepático em ratos selvagens, ratos com deleção do gene da IL-6 e ratos com a mesma deleção, mas submetidos previamente à injeção intravenosa (de curta duração) ou subcutânea (de longa duração) de IL-6 recombinante. A alta mortalidade pós-operatória dos ratos com deleção pôde ser completamente evitada pela administração subcutânea, mas não intravenosa, de IL-6, o que evidencia a necessidade da ação prolongada da mesma. No entanto, houve uma porcentagem de ratos com deleção que sobreviveu à hepatectomia mesmo sem a injeção de IL-6. Nestes animais a regeneração foi totalmente preservada. Concluiu-se que possivelmente o principal papel da IL-6 seja a indução de uma resposta adaptativa à hepatectomia parcial que assegura a homeostase corporal e, portanto, a sobrevivência do animal.⁵⁰

Conforme frisado, a apoptose é um importante componente da regeneração hepática e as proteínas da família Bcl-2 são os principais reguladores da morte celular programada. O envolvimento desses genes foi descrito em modelos de regeneração em animais adultos.²¹⁻²⁴ No presente trabalho investigou-se a expressão de genes relacionados à apoptose no parênquima dos animais submetidos à hepatectomia parcial e à cirurgia simulada, a fim de verificar também os efeitos do trauma cirúrgico isolado.

A análise molecular foi realizada nas fases precoces da regeneração (primeiro dia após hepatectomia). Observou-se no presente trabalho aumento na expressão do gene pró-apoptótico Bak em resposta ao trauma cirúrgico (cirurgia simulada), sem alteração na expressão do gene Bax. Por outro lado, ocorreu diminuição significativa da expressão desses genes após a realização da hepatectomia (Gráfico 4). Quanto aos genes anti-apoptóticos (Bcl-2 e Bcl-XL), não se verificou alteração no grupo cirurgia simulada. Nos animais recém-desmamados a expressão do Bcl-2 aumentou significativamente após a hepatectomia (Gráfico 5). Tais resultados são similares aos obtidos com estudos em ratos adultos^{23,24} e sugerem que a relação entre a expressão dos genes pró e anti-apoptóticos favoreceu os fenômenos proliferativos das células durante a regeneração, com inibição da morte celular programada.

A redução da expressão de genes pró-apoptóticos e o aumento de anti-apoptóticos podem estar relacionados ao efeito de alguns fatores de crescimento na regeneração de células hepáticas, como o fator de crescimento hepatocitário (HGF)⁵⁷ e a própria IL-6.

Takushi e cols. demonstraram que a super-expressão do gene da proteína Bcl-2 em ratos submetidos a hepatectomia a 70% tem um efeito pró-proliferativo nas fases iniciais da regeneração hepática, sem no entanto provocar aumento significativo na massa hepática no 14º dia pós ressecção.²⁴ Além disso, paradoxalmente foi observado que nesses animais houve diminuição dos níveis de HGF (“hepatocyte growth factor”), um importante agente mitogênico durante o processo regenerativo.

Jin e cols. estudaram os efeitos da administração do IL-6, em curto (1 a 2 dias) e longo prazo (5 a 7 dias), no fígado em regeneração.⁵⁸ No primeiro caso, verificaram que a massa hepática recuperou-se de forma mais acelerada com aumento da expressão das proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 e Bcl-XL, o que está de acordo com os achados de presente trabalho. No entanto, a administração de IL-6 em longo prazo levou ao aumento da expressão da proteína pró-apoptótica Bax, com prejuízo da regeneração e aumento do número de células em apoptose.

Desta forma, pode-se concluir que a inter-relação entre os fatores estimuladores da proliferação hepatocitária e a expressão das proteínas reguladoras da apoptose está envolvida não só nas fases iniciais da regeneração, mas também na determinação da parada dos fenômenos proliferativos quando a massa hepática já tiver sido restituída.

Finalmente, é importante lembrar que durante o processo regenerativo de qualquer tecido, em que fenômenos de proliferação celular e de apoptose encontram-se alterados, efeitos adversos destes desequilíbrios poderão ocorrer. Assim, a persistência de fatores indutores da proliferação celular em conjunto com o predomínio da expressão dos genes anti-apoptóticos por tempo prolongado podem

ser responsáveis pelo desenvolvimento de neoplasias, fato este verificado em fígados residuais de ratos submetidos à hepatectomia parcial.^{59,60}

Como já dito anteriormente, os fenômenos regenerativos são importantes após transplantes de segmentos ou lobos hepáticos, e as drogas imunossupressoras são a base do tratamento pós-operatório. O advento da ciclosporina no final da década de 70 aumentou significativamente a sobrevida de pacientes submetidos a transplantes de órgãos sólidos.²⁵ A partir de então, os esquemas básicos de imunossupressão após transplante hepático (inclusive em crianças) incluíam glicocorticóides e ciclosporina. A partir de 1989, esta última foi sendo paulatinamente substituída pelo tacrolimus (FK506), que possui mecanismos de ação semelhantes, proporcionando, no entanto, maior estabilidade na imunossupressão e melhor ação nos casos de rejeição crônica.⁶¹⁻⁶³ Atualmente, a maioria dos pacientes utiliza tacrolimus. No entanto, aqueles submetidos a transplante há mais de dez anos, com boa adaptação à ciclosporina, sem alterações significativas da função renal, continuam fazendo uso dessa droga.⁶⁴

Com o objetivo de melhorar a compreensão dos efeitos dos imunossupressores na regeneração do fígado de crianças submetidas a transplantes parciais, foi realizado estudo utilizando o modelo em animais em crescimento.

No presente trabalho, o efeito das drogas imunossupressoras tacrolimus, ciclosporina e metilprednisolona foi investigado por meio de técnicas de biologia molecular (RT-PCR) e análise imunoistoquímica, esta última em lâminas de “tissue microarray”, utilizando-se coloração de antígenos de proliferação celular e de apoptose.

A técnica do “tissue microarray” permite grande variedade de análises “in situ”, como “marcação” de antígenos por imunoistoquímica e hibridização “in situ”. De fato, qualquer estudo desenvolvido em lâminas de tecido inteiro pode ser efetuado em “tissue microarray”, de forma significativamente mais rápida, prática e econômica. Esta técnica, primeiramente descrita por Wan e cols em 1987,⁶⁵ tem sido extensivamente usada em vários estudos, principalmente em pesquisas oncológicas incluindo detecção de genes relacionados à carcinogênese, diagnósticos moleculares, avaliação de esquemas terapêuticos e prognóstico de neoplasias malignas.^{66,67}

A análise imunoistoquímica revelou que nem a hepatectomia nem as drogas provocaram alterações estatisticamente significantes no número de células em proliferação. Observou-se, no entanto, tendência a aumento na porcentagem de células PCNA positivas nos grupos hepatectomia de animais recém-nascidos e recém-desmamados. Deve-se lembrar que tais estudos foram realizados 24 horas após a cirurgia. Outrossim, a avaliação histológica seqüencial dos fígados remanescentes revelou que os fenômenos proliferativos (refletidos através das figuras de mitose) foram mais intensos a partir do segundo dia nos animais recém-desmamados e do terceiro dia nos recém-nascidos. É possível que no animal em crescimento a imaturidade dos sistemas enzimáticos dos hepatócitos residuais seja responsável por respostas mais tardias do que aquelas observadas em condições de função hepática normal, conforme se observa em animais adultos.

A importância da integridade da função hepática residual fica, inclusive, evidente diante da observação de que, no modelo de animal adulto com ressecção hepática maciça (90% do parênquima), com comprovada disfunção do fígado residual, há significativo retardo nos fenômenos regenerativos iniciais, não ocorrendo

síntese de ADN no primeiro dia após hepatectomia e sim apenas a partir do segundo dia.⁶⁸ Desta forma, é provável que, se a análise imunoistoquímica fosse realizada nas horas ou dias subseqüentes, um aumento significativo no número de hepatócitos em proliferação seria detectado.

Na presente pesquisa foi demonstrado que tanto tacrolimus quanto ciclosporina não alteraram significativamente o índice de proliferação dos hepatócitos durante a fase inicial da regeneração hepática do animal em crescimento. Tais drogas provocaram, inclusive, tendência à diminuição desse índice. No entanto, existem estudos sugerindo que os inibidores de calcineurina estimulam a regeneração hepática após hepatectomia parcial em ratos adultos.⁶⁹⁻⁷¹ Desta forma, pôde-se concluir que o presente modelo exibe resposta diferente em comparação com modelos adultos similares.

Durante o processo de regeneração hepática após ressecção extensa, não está claro qual fenômeno seria vantajoso para o organismo, se o estímulo ou a inibição da proliferação de hepatócitos. Pode-se postular que, nas primeiras horas após hepatectomia, o direcionamento para proliferação dos hepatócitos pode comprometer a função do já limitado número de células, quanto à função de suprir as necessidades metabólicas do organismo, possivelmente levando o animal ao óbito. Assim, a redução da capacidade de proliferação das células promovida pelos inibidores de calcineurina nos animais em crescimento poderia melhorar o desempenho metabólico dos hepatócitos remanescentes e, portanto, contribuir para melhor recuperação do parênquima hepático.

A despeito das evidências de que os inibidores de calcineurina promovem melhora da regeneração hepática em ratos adultos, um estudo prévio utilizando porcos está em acordo com os resultados da presente pesquisa, uma vez que os autores não demonstraram nenhum efeito positivo do uso da ciclosporina na regeneração hepática.⁷²

Embora vários mecanismos tenham sido descritos para explicar a ação pró-regenerativa dos inibidores de calcineurina após ressecções hepáticas em animais adultos, não existem relatos de aumento da produção de IL-6 promovido por tais drogas. Descreve-se, inclusive, que a ativação “in vitro” das células de Kupffer (produtoras da IL-6) é inibida pela ciclosporina e pelo FK506.⁷³ De fato, os níveis de expressão do gene da IL-6 não se elevaram com a administração das drogas imunossupressoras no presente estudo.

Gomez-Lechon e cols. analisaram os efeitos de imunossupressores na apoptose induzida em hepatócitos humanos, e constataram que o tacrolimus promoveu redução significativa na ativação das caspases relacionadas tanto com a via intrínseca quanto extrínseca da apoptose.⁷⁴ A ciclosporina, no entanto, parece ter um efeito pró-apoptótico: foi demonstrado previamente que esta droga altera a permeabilidade da membrana mitocondrial permitindo a saída de citocromo c da mitocôndria para o citoplasma, o que induz a apoptose.⁷⁵ Em cultura de hepatócitos de ratos, a ciclosporina teve uma ação dose-dependente, com ativação de caspases pelo citocromo c e aumento do número de células TUNEL positivas.⁷⁶

A avaliação imunoistoquímica realizada na presente pesquisa não detectou alteração no número de hepatócitos em apoptose relacionada à administração de

inibidores de calcineurina. No entanto, os estudos moleculares mostraram aumento na expressão do gene pró-apoptótico Bak nos ratos recém-nascidos que receberam ciclosporina.

Além disso, a administração de tacrolimus provocou aumento na expressão do gene anti-apoptótico Bcl-2, tanto nos animais recém-nascidos quanto recém-desmamados.

No fígado, a proteína Bcl-2 não é produzida nos hepatócitos, e sim nas células não-parenquimatosas, principalmente colangiócitos^{21,23}. Desta forma, o aumento da expressão desse gene não se refletiu como diminuição na quantidade de hepatócitos em apoptose.

Como já foi dito, o tacrolimus é droga utilizada no tratamento da rejeição crônica, com resultados melhores que os da ciclosporina, fato este comprovado pela experiência prática no tratamento pós-operatório de crianças submetidas a transplante hepático.⁴⁶ A rejeição crônica se caracteriza pelo desaparecimento progressivo dos ductos biliares, levando à colestase e ao desenvolvimento de cirrose. Parece haver relação com um processo de arteriopatia obliterativa, levando à isquemia das vias biliares, associado a uma agressão direta de linfócitos às células ductais²⁵. No entanto, a patogênese não está ainda completamente elucidada. Um estudo analisando biópsias hepáticas de pacientes transplantados sugere que a apoptose das células progenitoras dos colangiócitos deva ter um papel importante na gênese da rejeição crônica.⁷⁷ Possivelmente, um dos mecanismos de ação do tacrolimus na rejeição crônica seja o aumento da expressão do gene anti-apoptótico Bcl-2 nas células dos ductos biliares, verificado no presente trabalho.

Embora ainda haja controvérsia, a maioria dos estudos mostra que os glicocorticóides têm um efeito inibitório na regeneração hepática. Verificou-se que hidrocortisona e dexametasona bloqueiam o aumento da atividade das enzimas timidilato-sintetase e timidina-quinase, essenciais para a síntese de ADN, levando a concomitante declínio na quantidade de ADN no fígado em regeneração.⁷⁸ Nagy e cols. observaram que o pré-tratamento com dexametasona suprimiu a expressão de TNF e IL-6 após hepatectomia parcial em ratos, além de diminuir significativamente a resposta proliferativa dos hepatócitos.⁷⁹

Debonera e cols. estudaram a ação da dexametasona em modelo de transplante de fígado ortotópico após isquemia fria prolongada.⁸⁰ Como nos outros modelos, a resposta regenerativa foi prejudicada pela droga, e os enxertos exibiram mais lesões histológicas do que os controles. No entanto, tais lesões representavam necrose hepatocelular, e a quantidade de células em apoptose não se elevou com o uso do glicocorticóide.

No presente modelo experimental não se demonstrou nenhum efeito significativo do uso de corticosteróide no índice de proliferação. Ademais, não houve alteração nos níveis de expressão da IL-6, tanto nos animais recém-nascidos quanto recém-desmamados, diferentemente do que foi demonstrado no modelo animal adulto.⁸⁰

Embora a administração de metilprednisolona não alterasse significativamente a quantidade de células em apoptose (TUNEL-positivas), verificou-se tendência a aumento do número de tais células nos animais recém-nascidos. Em concordância, a análise molecular mostrou que houve aumento

significativo na expressão do gene pró-apoptótico Bak neste grupo. Considerando-se que as alterações na expressão gênica precedem as repercussões histológicas, a avaliação imunoistoquímica mais tardia poderia eventualmente detectar um aumento significativo na quantidade de hepatócitos em apoptose.

Além disso, a metilprednisolona provocou aumento na expressão do gene anti-apoptótico Bcl-2 nos dois modelos de animais em crescimento. Pode-se supor que este seja um dos mecanismos relacionados à eficácia dos corticosteróides no tratamento dos episódios de rejeição aguda, em que ocorre, dentre outras alterações, lesão das células dos ductos biliares.²⁵ De fato, Gapany e cols. constataram diminuição na expressão da proteína Bcl-2 nos colangiócitos dos fígados de pacientes submetidos a transplante com rejeição celular aguda, por meio de análise imunoistoquímica de biópsias hepáticas.⁸¹

Em resumo, verificou-se que as drogas imunossupressoras não interferiram significativamente na proliferação hepatocitária, embora tenha se notado uma tendência a diminuição na percentagem das células em replicação. As drogas não causaram alterações significativas na quantidade de hepatócitos em apoptose, tacrolimus e metilprednisolona provocaram aumento na expressão do gene anti-apoptótico Bcl-2 nos dois modelos; além disso, ciclosporina e metilprednisolona promoveram aumento na expressão do gene pró-apoptótico Bak nos animais recém-nascidos. Desta forma, os efeitos das drogas sobre a regeneração hepática nos animais em crescimento foram diferentes daqueles descritos em animais adultos. Evidencia-se assim, a importância do modelo experimental criado e padronizado, bem como da implementação dos métodos moleculares e imunoistoquímicos utilizados, os quais ensejam estudos futuros sobre outros mecanismos envolvidos e

sobre a ação de novas drogas no complexo e não completamente elucidado fenômeno da regeneração hepática.

6. CONCLUSÕES

Nas condições da presente pesquisa, pôde-se concluir que:

1. Os modelos de regeneração hepática em animais de pequeno porte, recém-nascidos e recém-desmamados, construídos por meio de ressecção de 70% do parênquima hepático, foram padronizados e puderam ser utilizados na pesquisa;
2. Os animais recém-nascidos apresentaram maior índice de mortalidade do que os recém-desmamados. A regeneração do parênquima hepático de ambos se fez de modo completo até o sétimo dia após hepatectomia, com intensa esteatose no fígado remanescente dos animais recém-nascidos até o terceiro dia;
3. Utilizando-se métodos moleculares e imunoistoquímicos, verificou-se que a hepatectomia promoveu estímulo da proliferação de hepatócitos com inibição do fenômeno de apoptose nos animais recém-nascidos e recém-desmamados;
4. As drogas imunossupressoras metilprednisolona, ciclosporina A e tacrolimus não exerceram efeitos sobre a proliferação de hepatócitos de animais recém-nascidos e recém-desmamados. No entanto, metilprednisolona e tacrolimus promoveram aumento da expressão do gene anti-apoptótico Bcl-2 nos fígados remanescentes de ambos; nos ratos recém-nascidos, ciclosporina e metilprednisolona provocaram aumento na expressão do gene pró-apoptótico Bak.

7. ANEXOS

Anexo A. Descrição da metodologia do RT-PCR.

Extração de ácido ribonucleico (ARN): porção de tecido hepático de aproximadamente 100 mg foi fragmentada em pulverizador de tecido (Mikro-Dismembrenator II, B.Braun, Melsungen, Germany) após adição de nitrogênio líquido. O pulverizado foi homogeneizado em 700µl da solução TRIZOL™ (INVITROGEN Life Technologies, USA).

A solução assim obtida foi incubada durante 5 minutos em temperatura ambiente para completa dissociação de nucleoproteínas, e em seguida foram adicionados 200µl de clorofórmio. Esta solução foi centrifugada na velocidade de 10.000 rotações por minuto (rpm) durante 15 minutos em temperatura ambiente. Ao término da centrifugação, foi obtida a separação da mistura em 3 fases: uma inferior de coloração avermelhada (fenol-clorofórmio), uma interfase (proteínas), e uma superior, incolor e aquosa. Esta última continha o ARN e foi transferida para um tubo limpo onde se adicionou álcool isopropílico. A solução permaneceu em repouso durante 15 minutos em temperatura ambiente e, em seguida, foi submetida a centrifugação na velocidade de 10.000 rpm por 15 minutos. O ARN estava precipitado no fundo do tubo ao término da centrifugação. Este foi re-suspenso em água bidestilada tratada com 0,01% de Dietilpirocarbonato (DEPC) e armazenado a –70°C para posterior avaliação.

A concentração de ARN foi determinada com a utilização de espectrofotômetro para análises qualitativas e quantitativas de ADN/ARN modelo Biofotômetro (Eppendorf AG, Alemanha), nos comprimentos de onda 260 e 280 nm.

Após a determinação da concentração, um micrograma do ARN foi submetido à eletroforese em gel de agarose para avaliação da sua integridade através da visualização dos fragmentos correspondentes ao ARN ribossômico 18S e 28S.

Um micrograma de ARN total foi utilizado na síntese de ácido desoxirribonucleico complementar (cADN) através da utilização da enzima Superscript III RnaseH transcriptase reversa (INVITROGEN Life Technologies, USA). A reação compreendeu os seguintes reagentes: 1µl de ARN total, 100pmoles de Oligo (dT) 12-18 primers, 5X tampão da enzima, 0,1M de dithiotreitol, 500µM de cada um dos deoxinucleotídeos, 200 unidades de SuperScript III, para volume total de 20µl que foi processada a 37° C durante 1 hora.

Descrição dos “primers” e análise semiquantitativa da PCR: os “amplímeros” utilizados para a amplificação dos genes foram:

Bcl-2 - 5'- CCT GGC ATC TTC TCC TTC – 3'

5'- TGC TGA CCT CAC TTG TGG – 3'

Bcl-XL - 5'- TCA ATG GCA ACC CTT CCT GG – 3'

5'- ATC CGA CTC ACC AAT ACC TG – 3'

Bax - 5'- ACG CAT CCA CCA AGA AGC – 3'

5'- GAA GTC CAG AGT CCA GCC – 3'

Bak - 5'- CCG GAA TTC CAG GAC ACA GAG GA – 3'

5'- CCA AGC TTG CCC AAC AGA ACC AC – 3'

Ciclofilina - 5'- GGG AAG GTG AAA GAA GGC AT - 3'

5'- GAG AGC AGA GAT TAC AGG GT – 3'

(A - adenina; G – guanina; C – citosina; T – timidina)

O gene ciclofilina foi amplificado como controle interno para a transcrição do ARN e também como fator de correção da quantidade de cADN sintetizado.

Em toda reação o controle negativo foi feito usando água bidestilada ao invés de cADN. O volume total da reação de PCR foi de 25µl e consistiu de: 3µl de cADN,

2 pmoles de cada um dos “primers” senso e antisenso, 200 μ M de cada um dos deoxinucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 2,5 μ l de tampão da enzima, 2 unidades de Taq-polimerase. As reações foram preparadas separadamente para cada um dos genes e amplificadas de acordo com seus parâmetros no mesmo termociclador (MJ Research, CA, USA).

O passo de desnaturação inicial foi de 94° C, seguidos por 18 (ciclofilina), 33 (Bcl-2), 37 (Bcl-XL), 28 (Bax), 29 (Bak) ciclos de:

- desnaturação a 94° C por 30 segundos,
- associação a 55° C (ciclofilina, Bcl-2, Bak) ou 52° C (Bcl-XL) ou 60° C (Bax) por 30 segundos e
- extensão a 72° C por 30 segundos.

Seguiu-se uma extensão final a 72°C por 10 minutos.

O produto amplificado (volume de 10 μ l) foi submetido a eletroforese em gel de agarose a 2%. Cada reação de PCR foi repetida 3 vezes. O gel foi documentado no Sistema Edas 120 (Electrophoresis Documentation and Analyses Systems, Digital Camera 120) Kodak Digital ScienceTM.

A magnitude de expressão de cada gene foi avaliada pela densitometria das bandas utilizando o ID Image Analysis Software, Kodak Digital ScienceTM.

Na presente pesquisa, o gene ciclofilina foi amplificado como controle interno para a transcrição do ARN e também como fator de correção da quantidade de cADN sintetizado.

Os resultados das expressões dos genes Bcl-2, Bcl-XL, Bak e Bax foram normalizados com o resultado da expressão do gene ciclofilina para cada amostra respectivamente.

Metodologia idêntica foi utilizada para pesquisa da expressão do gene da IL-6.

Anexo B. Descrição dos procedimentos imunoistoquímicos.

A primeira etapa constituiu de desparafinização dos cortes de 3 µm de espessura de tecido incluído em parafina. Os cortes foram então mantidos por 24 horas em estufa a 60°C:

1^a desparafinização (a quente): xilol a 60° C por 30 minutos.

2^a desparafinização (a frio): xilol à temperatura ambiente, por 20 minutos.

Os cortes foram hidratados em:

-etanol absoluto (3vezes) por 30 segundos cada;

-etanol a 95% por 30 segundos;

-etanol a 80% por 30 segundos;

-lavagens em água corrente e destilada.

Para a recuperação antigênica, as lâminas foram incubadas em solução de ácido cítrico 10 mM / pH6,0 , em panela de pressão, durante 3 minutos contados a partir da pressurização total. Realizou-se resfriamento por 10 minutos sob água corrente e por 10 minutos à temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas em água corrente e água destilada.

A seguir, procedeu-se ao bloqueio da peroxidase endógena com solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 6% (20 volumes) diluída volume a volume em

metanol, em três banhos de 10 minutos cada um; seguiram-se lavagens em água corrente e destilada e PBS (*Phosphate Buffered Saline*).

As lâminas foram incubadas com anticorpo específico para o antígeno, diluído em tampão PBS-diluente, contendo albumina bovina (BSA) 1% (Sigma, A9647) e azida sódica (NaN₃) 0,1% em PBS, em câmara úmida durante 30 minutos a 37°C e, em seguida, 18 horas a 4°C. Foram feitas três lavagens em tampão PBS.

Realizou-se incubação com anticorpo secundário, Link do LSAB+ System (Dako, K0690), durante 30 minutos a 37°C, em câmara úmida, seguida de lavagens (3 vezes) em tampão PBS. Logo após, procedeu-se a nova incubação com o Label do LSAB+ System (Dako, K0690), durante 30 minutos a 37°C, em câmara úmida, seguida de lavagens (3 vezes) em tampão PBS.

A revelação foi feita com substrato cromogênico (3, 3' Diaminobenzidina tetrahydroclorido – DAB (Sigma, D-5637) - 60 mg%); 1 ml de dimetilsulfóxido (DMSO); 1 ml de H₂O₂ a 20 vol, 100 ml de PBS; durante 3 a 5 minutos a 37°C, em câmara escura. Em seguida, foram observadas ao microscópio as lâminas controle-positivo, com o desenvolvimento de precipitado castanho-dourado, como produto final da reação.

Após lavagens em água corrente e água destilada por 3 minutos, foi realizada contracoloração com hematoxilina de Harris por 1 minuto.

Seguiu-se imersão por quatro vezes (rapidamente) em água amoniacal (solução aquosa de hidróxido de amônio a 0,5%) e lavagem em água corrente e destilada.

A desidratação dos cortes foi feita na seguinte seqüência:

- etanol 50%, por 30 segundos;
- etanol 80%, por 30 segundos;
- etanol 95%, por 30 segundos;
- etanol 100% 3 vezes, 30 segundos cada e
- xilol 4 vezes, 30 segundos cada.

As lâminas foram montadas em meio permanente Entellan (Merck, 1.07961).

Para a marcação imunoistoquímica com o anticorpo monoclonal anti-PCNA, foi utilizado o método Envision conjugado a HRP.

A recuperação antigênica foi obtida por aquecimento em panela de pressão com ácido cítrico 0,01M pH 6,0, bloqueio da peroxidase endógena com solução de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a 6% (20 volumes) diluída volume a volume em metanol e incubação com o anticorpo anti-PCNA clone PC10 (DAKO, código M879) título 1/8000, por 30 minutos a 37°C e durante 18 horas a 4°C. Após lavagens com PBS, foi feita incubação com o polímero Envision conjugado a HRP (DAKO, código K4001). Realizada então revelação com substância cromogênica 3, 3' diaminobenzidina tetrahydrochlorido – DAB, 60 mg%, 1 ml de peróxido de hidrogênio 6% e DMSO 1%, e contracoloração com hematoxilina de Harris.

Pela técnica do TUNEL, após desparafinização e hidratação, os cortes foram submetidos à digestão enzimática com 20 µg/ml de proteinase K por 15 minutos a 37°C e lavagens com PBS. Foi realizado bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio 3% (H_2O_2) em metanol por 10 minutos à temperatura ambiente e lavagens com PBS.

Os cortes foram imersos em solução de citrato de sódio 0,1% e Triton X-100 0,1% por 2 minutos a 4°C para permeabilização celular e então incubados com solução de enzima TdT (*terminal deoxynucleotidyl transferase*) e mistura de nucleotídeos em tampão de reação a 37°C por 30 minutos. Posteriormente os cortes foram lavados com PBS, incubados com Converter-POD em câmara úmida por 30 minutos a 37°C. A revelação foi feita com DAB por 1 minuto para a detecção das células em apoptose. Seguiu-se contra-coloração com Hematoxilina de Harris por 5 minutos e montagem dos cortes com Entellan e lamínula.

Anexo C. Valores das médias $\pm$ desvios padrões dos pesos corpóreos, dos fígados de animais controles e dos fígados residuais logo após hepatectomia, em grupos de animais recém nascidos e recém-desmamados (para cada grupo, n = 6 animais).

Grupos	Recém-nascido		Recém-desmamado	
	Peso corpóreo (g)	Peso do fígado (g)	Peso corpóreo (g)	Peso do fígado (g)
Controle	7,95 $\pm$ 0,80	0,58 $\pm$ 0,04	47,53 $\pm$ 4,29	2,57 $\pm$ 0,22
Hepatectomia	7,30 $\pm$ 0,31	0,17 $\pm$ 0,01	48,93 $\pm$ 5,19	0,80 $\pm$ 0,07

Anexo D. Valores das relações percentuais entre peso do fígado e peso do animal, nos dias subsequentes à hepatectomia (médias $\pm$ desvios padrões) (para cada grupo, n = 6 a 8 animais).

Grupos	Recém-nascido (%)	Recém-desmamado (%)
Controle	4,49 $\pm$ 0,56	5,18 $\pm$ 0,69
1º dia	1,65 $\pm$ 0,19	2,59 $\pm$ 0,22
2º dia	3,01 $\pm$ 0,36	3,35 $\pm$ 0,43
3º dia	3,38 $\pm$ 0,37	4,18 $\pm$ 0,49
4º dia	3,8 $\pm$ 0,60	4,34 $\pm$ 0,42
7º dia	4,02 $\pm$ 0,51	4,68 $\pm$ 0,51

Anexo E. Valores individuais das densidades relativas das bandas do gene IL-6 dos grupos dos animais recém-nascidos.

Grupos	Densidade relativa da banda					
Controle	0	0	0	0	0	
Cirurgia simulada	0	0,40	0,26	0,64	0,37	
Hepatectomia	0,65	0,66	0,71	0,50	0,70	
Hepatectomia + metilprednisolona	0,67	0,70	0,65	0,52	0,42	0,53
Hepatectomia + ciclosporina	0,56	0,65	0,48	0,55	0,51	0,66
Hepatectomia + tacrolimus	0,60	0,75	0,85	0,59	0,59	

Anexo F. Valores individuais das densidades relativas das bandas do gene IL-6 dos grupos dos animais recém-desmamados.

Grupos	Densidade relativa da banda					
Controle	0	0	0	0,45	0,32	0,37
Cirurgia simulada	0	0,38	0,38	0,37	0,42	
Hepatectomia	0,70	0,68	0,58	0,60	0,75	
Hepatectomia + metilprednisolona	0,73	0,63	1,08	0,53	0,47	0,84
Hepatectomia + ciclosporina	0,76	0,89	0,53	0,69	0,53	
Hepatectomia + tacrolimus	0,92	0,76	0,79	0,67	0,55	

Anexo G. Valores individuais das densidades relativas das bandas do gene Bak dos grupos dos animais recém-nascidos.

Grupos	Densidade relativa da banda				
Controle	0,90	0,95	1,00	0,96	0,97
Cirurgia simulada	1,12	1,04	1,08	1,15	1,12
Hepatectomia	0,85	0,84	0,82	0,83	0,85
Hepatectomia + metilprednisolona	1,07	1,01	0,94	0,94	0,99
Hepatectomia + ciclosporina	0,87	1,00	0,88	0,89	0,97
Hepatectomia + tacrolimus	0,81	0,93	0,91	0,89	0,91

Anexo H. Valores individuais das densidades relativas das bandas do gene Bak dos grupos dos animais recém-desmamados.

Grupos	Densidade relativa da banda					
Controle	0,96	0,99	0,90	1,12	1,02	1,02
Cirurgia simulada	1,10	1,21	1,05	1,17	1,05	
Hepatectomia	0,87	0,80	0,77	0,89	0,77	0,90
Hepatectomia + metilprednisolona	0,89	0,81	0,96	1,15	1,12	
Hepatectomia + ciclosporina	1,04	1,17	0,78	0,80	0,86	
Hepatectomia + tacrolimus	0,96	0,82	1,00	1,10	0,90	

Anexo I. Valores individuais das densidades relativas das bandas do gene Bax dos diferentes grupos dos animais recém-nascidos.

Grupos	Densidade relativa da banda					
Controle	1,05	1,08	1,07	0,99	1,02	
Cirurgia simulada	1,02	1,08	1,07	1,08	1,13	
Hepatectomia	0,94	0,94	0,93	0,95	0,94	
Hepatectomia + metilprednisolona	0,93	0,96	0,96	1,03	0,85	0,94
Hepatectomia + ciclosporina	0,95	0,95	0,86	0,83	0,92	0,91
Hepatectomia + tacrolimus	1,00	0,88	0,90	0,86	0,93	

Anexo J. Valores individuais das densidades relativas das bandas do gene Bax dos diferentes grupos dos animais recém-desmamados.

Grupos	Densidade relativa da banda					
Controle	1,00	1,00	0,97	1,05	1,12	1,03
Cirurgia simulada	0,92	1,06	1,03	1,39	0,98	
Hepatectomia	0,90	0,87	0,88	0,95	0,88	
Hepatectomia + metilprednisolona	0,90	0,89	0,94	0,89	0,89	
Hepatectomia + ciclosporina	0,89	0,93	0,84	0,91	0,95	0,98
Hepatectomia + tacrolimus	0,85	0,93	0,92	0,94	0,87	

Anexo K. Valores individuais das densidades relativas das bandas do gene Bcl-XL dos grupos dos animais recém-nascidos.

Grupos	Densidade relativa da banda				
Controle	0,65	0,62	0,72	0,76	0,62
Cirurgia simulada	0,94	1,02	1,12	1,12	1,14
Hepatectomia	1,01	0,97	1,06	1,03	1,06
Hepatectomia + metilprednisolona	1,08	1,27	1,27	1,16	1,17
Hepatectomia + ciclosporina	1,22	1,22	0,95	1,31	1,11
Hepatectomia + tacrolimus	1,32	1,04	1,02	0,98	0,93

Anexo L. Valores individuais das densidades relativas das bandas do gene Bcl-XL dos grupos dos animais recém-desmamados.

Grupos	Densidade relativa da banda					
Controle	1,01	1,04	0,97	0,97	0,95	0,84
Cirurgia simulada	1,00	0,88	1,08	0,84	1,11	
Hepatectomia	1,06	1,07	1,05	1,02	1,01	
Hepatectomia + metilprednisolona	1,13	1,06	1,18	1,11	1,13	
Hepatectomia + ciclosporina	1,05	1,07	1,16	1,20	1,10	
Hepatectomia + tacrolimus	0,95	0,91	1,08	1,06	0,91	

Anexo M. Valores individuais das densidades relativas das bandas do gene Bcl-2 dos grupos dos animais recém-nascidos.

Grupos	Densidade relativa da banda				
Controle	0,90	0,95	1,00	0,96	0,97
Cirurgia simulada	1,12	1,04	1,08	1,15	1,12
Hepatectomia	0,85	0,84	0,82	0,83	0,85
Hepatectomia + metilprednisolona	1,07	1,01	0,94	0,94	0,99
Hepatectomia + ciclosporina	0,87	1,00	0,88	0,89	0,97
Hepatectomia + tacrolimus	0,81	0,93	0,91	0,89	0,91

Anexo N. Valores individuais das densidades relativas das bandas do gene Bcl-2 dos grupos dos animais recém-desmamados.

Grupos	Densidade relativa da banda					
Controle	0,76	0,82	0,72	0,65	0,69	0,63
Cirurgia simulada	0,73	0,72	0,52	0,66	0,60	
Hepatectomia	0,79	0,87	0,80	0,88	0,83	
Hepatectomia + metilprednisolona	1,05	0,93	0,99	0,90	0,99	
Hepatectomia + ciclosporina	0,85	0,85	0,85	0,86	0,88	
Hepatectomia + tacrolimus	0,90	0,95	1,00	0,87	1,04	

Anexo O. Valores dos percentuais dos núcleos de hepatócitos corados pelo PCNA nos grupos de animais recém-nascidos e recém-desmamados (médias $\pm$ desvios-padrões).

Grupos	Recém-nascido (%)	Recém-desmamado (%)
Controle	4,52 $\pm$ 3,48	11,08 $\pm$ 9,44
Hepatectomia	20,70 $\pm$ 16,80	20,05 $\pm$ 15,14
Hepatectomia+ metilprednisolona	9,96 $\pm$ 7,90	12,50 $\pm$ 10,50
Hepatectomia+ ciclosporina	4,93 $\pm$ 2,60	2,81 $\pm$ 3,19
Hepatectomia+ tacrolimus	7,74 $\pm$ 6,03	5,16 $\pm$ 4,80

Anexo P. Valores dos percentuais dos núcleos de hepatócitos corados pelo TUNEL nos grupos de animais recém-nascidos e recém-desmamados (médias $\pm$ desvios-padrões).

Grupos	Recém-nascido (%)	Recém-desmamado (%)
Controle	0,17 $\pm$ 0,12	0,14 $\pm$ 0,18
Hepatectomia	0,35 $\pm$ 0,32	0,38 $\pm$ 0,17
Hepatectomia+ metilprednisolona	0,48 $\pm$ 0,32	0,36 $\pm$ 0,27
Hepatectomia+ ciclosporina	0,20 $\pm$ 0,06	0,19 $\pm$ 0,14
Hepatectomia+ tacrolimus	0,12 $\pm$ 0,17	0,28 $\pm$ 0,23

8. REFERÊNCIAS

1. Michalopoulos GK, DeFrances MC. Liver Regeneration. *Science*. 1997; 276:60-66.
2. Fausto N. Liver Regeneration. *J Hepatol*. 2000; 32(1 Suppl):19-31.
3. Dahm F, Georgiev P, Clavien PA. Small-for-size syndrome after partial liver transplantation: definition, mechanisms of disease and clinical implications. *Am J Transplant*. 2005; 5(11):2605-2610.
4. Marcos A, Fisher RA, Ham JM, Shiffman ML, Sanyal AJ, Luketic VA, Sterling RK, Fulcher AS, Posner MP. Liver regeneration and function in donor and recipient after right lobe adult to adult living donor liver transplantation. *Transplantation*. 2000; 69(7):1375-1379.
5. Mangnall D, Bird NC, Majeed AW. The molecular physiology of liver regeneration following partial hepatectomy. *Liver International*. 2003; 23:124-138.
6. Scotté M, Masson S, Lyoumi S, Hiron M, Ténière P, Lebreton JP, Daveau M. Cytokine gene expression in liver following minor or major hepatectomy in rat. *Cytokine*. 1997; 9:859-867.
7. Iwai M, Cui TX, Kitamura H, Saito M, Shimazu T. Increased secretion of Tumor Necrosis Factor and Interleukin 6 from isolated, perfused liver of rats after partial hepatectomy. *Cytokine*. 2001; 13:60-64.
8. Fukuhara Y, Hirasawa A, Li X, Kawasaki M, Fujino M, Funeshima N, Katsuma S, Shiojima S, Yamada M, Okuyama T, Suzuki S, Tsujimoto G. Gene expression profile in the regenerating rat liver after partial hepatectomy. *J Hepatol*. 2003; 38:784-792.
9. Gauldie J, Richards C, Baumann H. IL6 and the acute phase reaction. *Res Immunol*. 1992; 143(7):755-759.

10. Matsunami H, Kawasaki S, Ishizone S, Hashikura Y, Ikegami T, Makuuchi M, Kawarasaki H, Iwanaka T, Nose A, Takemura M. Serial changes of h-HGF and IL-6 in living-related donor liver transplantation with special reference to their relationship to intraoperative portal blood flow. *Transplant Proc.* 1992; 24(5):1971-1972.
11. Cressman DE, Diamond RH, Taub R. Liver failure and defective hepatocyte regeneration in interleukin-6-deficient mice. *Science.* 1996; 274(5291):1379-1383.
12. Nagasue N, Yukaya H, Ogawa Y, Kohono H, Nakamura T. Human liver regeneration after major hepatic resection. A study of normal liver and livers with chronic hepatitis and cirrhosis. *Ann Surg.* 1987; 206:30-39.
13. Canalese J, Gove CD, Gimson AE, Wilkinson SP, Wardle EN, Williams R. Reticuloendothelial system and hepatocytic function in fulminant hepatic failure. *Gut.* 1982; 23:265-269.
14. Schulte-Hermann R, Grasl-Kraupp, Bursch W. Apoptosis and hepatocarcinogenesis. In Jirtle RL, editor. Liver regeneration and carcinogenesis. Molecular and cellular mechanisms. San Diego: Academic Press; 1995: p.141-178.
15. Higashiyama H, Yamagushi T, Mori K, Nakano Y, Yokoyama T, Takeuchi T et al. Graft size assessment by preoperative computed tomography in living related partial liver transplantation. *Br J Surg.* 1993; 80:489-492.
16. Tiao GM, Alonso M, Bezerra J, et al: Liver transplantation in children younger than 1 year-the Cincinnati experience. *J Pediatr Surg.* 2005; 40:268-273.
17. Mekeel KL, Langham Jr MR, Gonzalez-Peralta RP, Hemming AW. Liver transplantation in very small infants. *Pediatric Transplantation.* 2007; 11:66-72.

18. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, editors. *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease*. 7th ed. Philadelphia: Elsevier; 2005.
19. Ashkenazi A. Targeting death and decoy receptors of the tumor –necrosis factor superfamily. *Nat Rev Cancer* 2002; 2(6): 420-430.
20. Hua C, Zom S, Jensen JP, Coupland RW, Ko HS, Wright JJ, Bakhshi A. Consequences of the t(14;18) chromosomal translocation in follicular lymphoma: deregulated expression of a chimeric and mutated BCL-2 gene. *Oncogene Res*. 1988; 2(3):263-275.
21. Masson S, Scotté M, Garnier S, François A, Hiron M, Ténrière P, Fallu J, Salier JP, Daveau M. Differential expression of apoptosis-associated genes post-hepatectomy in cirrhotic vs. normal rats. *Apoptosis*. 2000; 5(2):173-179.
22. Karavias DD, Tsamandas AC, Tepetes K, Kritikos N, Kourelis T, Ravazoula P, Vagenas K, Siasos N, Mirra N, Bonikos DS. Bcl-2 and Bax expression and cell proliferation, after partial hepatectomy with and without ischemia, on cholestatic liver in rats: an experimental study. *J Surg Res*. 2003; 110:399-408.
23. Akcali KC, Dalgic A, Ucar A, Haj KB, Guvenc D. Expression of bcl-2 gene family during resection induced liver regeneration: comparison between hepatectomized and sham groups. *World J Gastroenterol*. 2004; 10(2):279-283.
24. Takushi Y, Shiraishi M, Nozato E, Toyoda A, Nishimaki T. Expression of anti-apoptotic protein, Bcl-2, in liver regeneration after a partial hepatectomy. *J Surg Res*. 2006; 134:93-101.
25. Busuttil RW, Klintmalm GB. *Transplantation of the liver*. Philadelphia: W.B.Saunders; 1996.
26. Hayes JM. The immunobiology and clinical use of current immunosuppressive therapy for renal transplantation. *J Urol*. 1993; 149: 437-443.

27. Azzarone A, Francavilla A, Carrieri G, Gasbarrini A, Scotti-Foglieni C, Fagiuoli S, Cillo U, Zeng QH, Starzl TE. Effects on *in vivo* and *in vitro* hepatocyte proliferation of methylprednisolone, azathioprine, mycophenolic acid, mizoribine and prostaglandin E₁. *Transplant Proc.* 1992; 24(6):2868-2871.
28. Kim YI, Salvini P, Auxilia F, Calne RY. Effect of cyclosporin A on hepatocyte proliferation after partial hepatectomy in rats: comparison with standard immunosuppressive agents. *Am J Surg.* 1988; 155(2):245-249.
29. Francavilla A, Starzl TE, Barone M, Zeng QH, Porter KA, Zeevi A, Markus PM, Van der Brink MR, Todo S. Studies on mechanisms of augmentation of liver regeneration by cyclosporine and FK 506. *Hepatology.* 1991; 14(1):140-143.
30. Kahn D, Makowka L, Lai H. Cyclosporine augments hepatic regenerative response in rats. *Dig Dis Sci.* 1990; 35:392-395.
31. Kirimlioglu H, Kirimlioglu V, Yilmaz S, Coban S, Turkmen E, Ara C. Liver pathology and cell proliferation after calcineurin inhibitors and antiproliferative drugs following partial hepatectomy in rats. *Transplant Proc.* 2006; 38:622-626.
32. Tamura F, Masuhara A, Sakaida I, Fukumoto E, Nakamura T, Okita K. FK506 promotes liver regeneration by suppressing natural killer cell activity. *J Gastroenterol Hepatol.* 1998; 13(7):703-708.
33. Escribano O, Fernández-Moreno MD, Pina MJ, Fueyo J, Menor C, Román ID, Guijarro LG. Pretreatment with FK506 up-regulates insulin receptors in regenerating rat liver. *Hepatology.* 2002; 36(3):555-561.
34. Palmes D, Spiegel HU. Animal models of liver regeneration. *Biomaterials.* 2004; 25:1601-1611.

35. Higgins GM, Anderson RM. Experimental pathology of the liver – Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch Pathol.* 1931; 12:186-202.
36. Biondo-Simões MLP, Matias JEF, Montibeller GR, Siqueira LCD, Nunes ES, Grassi CA. Efeitos do envelhecimento na regeneração hepática em ratos. *Acta Cir Bras.* 2006; 21(4):197-202.
37. Coelho MCM, Tannuri U, Tannuri ACA, Mello ES, Santos NASR. Expression of interleukin-6 and apoptosis-related genes in suckling and weaning rat models of hepatectomy and liver regeneration. *J Pediatr Surg.* em publicação.
38. COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal); Animais de Laboratório – Ética e Legislação. Disponível em <http://www.cobea.org.br/etica.htm>.
39. Li L, Yi Z, Seno M, Kojima I. Activin A and betacellulin: effect on regeneration of pancreatic beta-cells in neonatal streptozotocin-treated rats. *Diabetes.* 2004; 53(3):608-615.
40. Liu W, Mehrara BJ, Chin GS, Hsu M, Peled Z, Longaker MT. The use of newborn rats and an adenoviral gene delivery vector as a model system for wound-healing research. *Ann Plast Surg.* 2000; 44(5):543-551.
41. Tannuri U, Maksoud-Filho JG, Santos MM, Tannuri AC, Rodrigues CJ, Rodrigues AJ Jr. The effects of prenatal intraamniotic surfactant or dexamethasone administration on lung development are comparable to changes induced by tracheal ligation in an animal model of congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg.* 1998; 33(8):1198-1205.
42. Tannuri U, Rodrigues CJ, Maksoud-Filho JG, Santos MM, Tannuri AC, Rodrigues AJ Jr. The effects of prenatal intraamniotic surfactant or dexamethasone administration on lung development are comparable to changes

- induced by tracheal ligation in an animal model of congenital diaphragmatic hernia: studies of lung glycogen content, elastic fiber density, and collagen content. *J Pediatr Surg.* 1998; 33(12):1776-1783.
43. Rodrigues CJ, Tannuri U, Tannuri AC, Maksoud-Filho JG, Rodrigues AJ Jr. Prenatal tracheal ligation or intra-amniotic administration of surfactant or dexamethasone prevents some structural changes in the pulmonary arteries of surgically created diaphragmatic hernia in rabbits. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo.* 2002; 57(1):1-8.
44. Santos MM, Tannuri U, Maksoud JG. Alterations of enteric nerve plexus in experimental gastroschisis: is there a delay in the maturation? *J Pediatr Surg.* 2003; 38(10):1506-1511.
45. Martins PNA, Neuhaus P. Surgical anatomy of the liver, hepatic vasculature and bile ducts in the rat. *Liver Internat.* 2007; disponível em internet <http://www.blackwell-synergy.com/doi/abs/10.1111/j.1478-3231.2006.01414.x>
46. Tannuri U, Velhote MC, Santos MM, Gibelli NE, Ayoub AA, Maksoud-Filho JG, Silva MM, Pinho ML, Miyatani HT, Maksoud JG. Pediatric liver transplantation: fourteen years of experience at the children institute in Sao Paulo, Brazil. *Transplant Proc.* 2004; 36(4):941-942.
47. Tannuri U, Mello ES, Carnevale FC, Santos MM, Gibelli NE, Ayoub AA, Maksoud-Filho JG, Silva MM, Pinho ML, Miyatani HT, Maksoud JG. Hepatic venous reconstruction in pediatric living-related donor liver transplantation--experience of a single center. *Pediatr Transplant.* 2005; 9(3):293-298.
48. Tan N, Dhawan A. Pediatric liver transplantation: review of literature 2003-2005. *Pediatr Transplant.* 2006; 10(5):549-557.

49. Silva MM, Maksoud JG. Atresia das vias biliares. In: Maksoud JG. *Cirurgia Pediátrica*. 2a ed. Rio de Janeiro: Revinter; 2003. p.904-922.
50. Blindendacher A, Wang X, Langer I, Savino R, Terracciano L, Heim MH. Interleukin-6 is important for survival after partial hepatectomy in mice. *Hepatology*. 2003; 38(3): 674-682.
51. Shteyer E, Liao Y, Muglia LJ, Hruz PW, Rudnick DA. Disruption of hepatic adipogenesis is associated with impaired liver regeneration in mice. *Hepatology*. 2004; 40(6):1322-1332.
52. Taub R. Hepatoprotection via the IL-6/Stat3 pathway. *J Clin Invest*. 2003; 112(7):978-980.
53. Scotte M, Masson S, Lyoumi SL. Cytokine gene expression in liver following minor or major hepatectomy in rat. *Cytokine*. 1997; 9:859-867.
54. Higashitsuji H, Arii S, Furutani M. Expression of cytokine genes during liver regeneration after partial hepatectomy in rats. *J Surg Res*. 1995; 58:267-274.
55. Cirino LMI. Resposta inflamatória produzida pelo colapso pulmonar provocado por oclusão do brônquio esquerdo: estudo experimental em ratos. [tese de livre-docência]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2003.
56. Fausto N, Laird AD, Weber EM: Role of growth factors and cytokines in hepatic regeneration. *FASEB J*. 1995; 9:1527-1536.
57. Kosai K, Matsumoto K, Funakoshi H. Hepatocyte growth factor prevents endotoxin-induced lethal hepatic failure in mice. *Hepatology*. 1999; 30; 151-162.
58. Jin X, Zimmers TA, Perez EA, Pierce RH, Zhang Z, Koniaris LG. Paradoxical effects of short- and long-term interleukin-6 exposure on liver injury and repair. *Hepatology*. 2006; 43(3): 474-484.

59. Picardo A, Karpoff HM, Ng B, Lee J, Brennam MF, Fong Y. Partial hepatectomy accelerates local tumor growth: potential roles of local cytokine activation. *Surgery*. 1998; 124(1):57-64.
60. Harun N, Nikfarjam M, Muralidharan V, Christophi C. Liver regeneration stimulates tumour metastases. *J Surg Res*. 2007, em publicação (disponível em internet).
61. Selzner N, Durand F, Berniau J, Heneghan MA, Tuttle-Newhall JE, Belghiti J, Clavien PA. Conversion from cyclosporine to FK506 in adult liver transplant recipients: a combined North American and European experience. *Transplantation*. 2001; 72(6):1061-1065.
62. Mazariegos GV, Salzedas AA, Jain A, Reyes J. Conversion from cyclosporin to tacrolimus in paediatric liver transplant recipients. *Paediatr Drugs*. 2001; 3(9):661-672.
63. Jain A, Mazariegos G, Kashyap R, Kosmach-Park B, Starzl TE, Fung J, Reyes J. Pediatric liver transplantation. A single center experience spanning 20 years. *Transplantation*. 2002; 73(6):941-947.
64. Tannuri U, Gibelli NE, Maksoud-Filho JG, Santos MM, Pinho-Apezato ML, Velhote MCP, Ayoub AA, Silva MM, Maksoud JG. Mycophenolate mofetil promotes prolonged improvement of renal dysfunction after pediatric liver transplantation: Experience of a single center. *Pediatr Transplant*. 2007; 11(1):82-86.
65. Wan WH, Fortuna MB, Furmanski P. A rapid and efficient method for testing immunohistochemical reactivity of monoclonal antibodies against multiple tissue samples simultaneously. *J Immunol Methods*. 1987; 103:121-129.

66. Chan KL, Guan XY, Ng IO. High-throughput tissue microarray analysis of *c-myc* activation in chronic liver diseases and hepatocellular carcinoma. *Hum Pathol* 2004; 35:1324-1331.
67. Zheng H, Tsuneyama K, Cheng C. An immunohistochemical study of P53 and Ki-67 in gastrointestinal adenoma and adenocarcinoma using tissue microarray. *Anticancer Res.* 2006; 26:2353-2360.
68. Dahmen U, Gu YL, Shen K, Dirsch O, Li F, Fan L, Broelsch C. Onset of liver regeneration after subtotal resection is inhibited by the use of new immunosuppressive drugs. *Transplant Proc.* 2002; 34:2312-2313.
69. Housain MA, Wakabayashi H, Goda F, Kobayashi S, Maeba T, Maeta H.. Effect of the immunosuppressants FK506 and D-allose on allogenic orthotopic liver transplantation in rats. *Transplant Proc.* 2000; 32:2021-2023.
70. Sakr MF, Zetti GM, Hassanein TI, Farghali H, Nalesnik MA, Gavalier JS, Starzl TE, Van Thiel DH.. FK506 ameliorates hepatic injury associated with ischemia and reperfusion in rats. *Hepatology.* 1991; 13:947-951.
71. Kirimlioglu H, Kirimlioglu V, Yilmaz S, Coban S, Turkmen E, Ara C. Liver pathology and cell proliferation after calcineurin inhibitors and antiproliferative drugs following partial hepatectomy in rats. *Transplant Proc.* 2006; 38:622-626.
72. Alvira LG, Herrera N, salas C, et al. Influence of cyclosporine on graft regeneration and function after liver transplantation: trial in pigs. *Transplant Proc.* 2002; 34:315-316.
73. Tojimbara T, Bermudez LE, Egawa H, Hayashi M, So SK, Esquivel CO. Cyclosporine and tacrolimus both suppress activation of Kupffer cells in vitro. *Transplant Proc.* 1996; 28(3):1381-1382.

74. Gomez-Lechon MJ, Serralta A, Donato MT, Jimenez N, O'connor E, Castell JV, Mir J. The immunosuppressant drug FK506 prevents Fas-induced apoptosis in human hepatocytes. *Biochem Pharmacol.* 2004; 68(12):2427-2433.
75. Kanno T, Fujita H, Muranaka S, Yano H. Mitochondrial swelling and cytochrome c release : sensitivity to cyclosporine A and calcium. *Physiol Chan Phys Med NMR.* 2002; 34(2): 91-102.
76. Grub S, Persohn E, Trommer WE, Wolf A. Mechanisms of cyclosporine A-induced apoptosis in rat hepatocyte primary cultures. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2000; 163(3): 209-220.
77. Koukoulis GK, Shen J, Karademir S, Jensen D, Williams J. Cholangiocytic apoptosis in chronic ductopenic rejection. *Hum Pathol.* 2001;32(8):823-827.
78. Tsukamoto I, Kojo S. Effect of glucocorticoid on liver regeneration after partial hepatectomy in the rat. *Gut.* 1989; 30(3):387-390.
79. Nagy P, Kiss A, Schnur J, Thorgeirsson SS. Dexamethasone inhibits the proliferation of hepatocytes and oval cells but not bile duct cells in rat liver. *Hepatology.* 1998; 28(2); 423-429.
80. Debonera F, Krasinkas AM, Gelman AE, Aldeguer X, Que X, Shaked A, Olthoff KM. Dexamethasone inhibits early regenerative response of rat liver after cold preservation and transplantation. *Hepatology.* 2003; 38(6):1563-1572.
81. Gapany C, Zhao M, Zimmermann A. The apoptosis protector, bcl-2 protein, is downregulated in bile duct epithelial cells of human liver allografts. *J Hepatol.* 1997; 26: 535-542.