ROSÂNGELA PASSOS DE JESUS MAZZA

Influência da infusão parenteral de aminoácidos sobre a expressão gênica de fatores de crescimento e timidina quinase no remanescente hepático de ratos desnutridos

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.
Área de concentração: Fisiopatologia Experimental

Orientador: Prof. Dr. Dan Linetzky Waitzberg
Co-Orientadora: Prof[a] Dr[a] Maria Aparecida Nagai

São Paulo
2004

FICHA CATALOGRÁFICA

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

©reprodução autorizada pelo autor

Mazza, Rosângela Passos de Jesus
Influência da infusão parenteral de aminoácidos sobre a expressão gênica de fatores de crescimento e timidina quinase no remanescente hepático de ratos desnutridos / Rosângela Passos de Jesus Mazza. -- São Paulo, 2004.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.
Área de concentração: Fisiopatologia Experimental.
Orientador: Dan Linetzky Waitzberg.
Co-orientadora: Maria Aparecida Nagai.
Descritores: 1.RATOS WISTAR/cirurgia 2.GLUTAMINA/uso terapêutico 3.REGENERAÇÃO HEPÁTICA/efeitos de drogas 4.RNA/análise 5.REAÇÃO EM CADEIA POR POLIMERASE VIA TRASNSCRIPTASE REVERSA/métodos 6.EXPRESSÃO GÊNICA 7.SUBSTÂNCIAS DE CRESCIMENTO/análise 8.FATOR DE CRESCIMENTO TRANSFORMADOR ALFA/análise

USP/FM/SBD-197/04

DEDICATÓRIA

A Meu marido MARCELO MIRANDA MAZZA, amigo, companheiro e acima de tudo o grande amor da minha vida, que soube ser compreensivo e solidário, me acompanhando até São Paulo para compartilhar comigo esta difícil mas compensadora etapa da minha vida.

A nosso filho CAIO MARCELO PASSOS MAZZA, estrela guia que veio no momento oportuno indicar o melhor caminho a seguir para a conquista da verdadeira felicidade.

A minha Mãe, DEUSELINA PASSOS DE JESUS, exemplo de dedicação, perseverança e amor incondicional! Sem sua valiosa colaboração e apoio, talvez esta jornada não teria sido concluída com êxito.

DEDICATÓRIA

"In Memorian"

A meu Pai ALOÍSIO ALENCAR DE JESUS, que em vida muito me estimulou e incentivou na constante busca da realização profissional, entendendo e aceitando a distância necessária para realização deste trabalho e acima de tudo, com sabedoria, me ensinou a transformar SONHOS em REALIDADE.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Profª Drª MARIA MITZI BRENTANI, Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências: Fisiopatologia Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), pela acolhida, receptividade e acima de tudo pela generosidade em compartilhar comigo, um pouco do seu grande conhecimento.

Dr. DAN LINETZKY WAITZBERG, por me orientar com sabedoria, respeito e paciência na difícil e árdua tarefa da iniciação à pesquisa científica. Mais que um Orientador, foi um grande Mestre que me incentivou a buscar novos desafios e trilhar caminhos inovadores.

DRª MARIA APARECIDA NAGAI, por aceitar me orientar, me introduzindo na área da Biologia Molecular, mostrando sempre as alternativas e indicando as possíveis soluções dos problemas.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

RAQUEL SUSANA M. DE MIRANDA TORRINHAS, Bióloga Coordenadora do Laboratório de Metabologia e Nutrição em Cirurgia – METANUTRI da FMUSP, pelo apoio incondicional, amizade e carinho demonstrados ao longo desta jornada.

MARIANA LOPES DOS SANTOS, Doutoranda do Laboratório de Genética Molecular do Câncer da FMUSP, pelo apoio logístico, amizade, companheirismo e alegria contagiante.

NANCY DA RÓS, Doutora do Laboratório de Genética Molecular do Câncer da FMUSP, por compartilhar comigo seu conhecimento na área, pelo incentivo e solidariedade constantes.

SIBELI SALAORNI, Biomédica do Laboratório de Genética Molecular do Câncer da FMUSP, pelo apoio e colaboração fundamental para a realização deste trabalho.

SIMONE APARECIDA BESSA, Mestranda do Laboratório de Genética Molecular do Câncer da FMUSP, pela colaboração e disponibilidade sempre presente.

AGRADECIMENTOS

Aos colegas e amigos do Laboratório de Genética Molecular do Câncer:

MARCILEI BUIM, Doutoranda e amiga querida pelo apoio, disponibilidade e acolhida familiar que me proporcionou.

CLAUDIA COUTINHO CAMILLO, Doutora e grande entusiasta da pesquisa básica, pela amizade, carinho e incentivo demonstrados, durante nossa convivência.

TATIANA AUADA, Mestranda e amiga, pelo companheirismo, solidariedade e apoio direcionado.

ANTONIA NUNES DE LIMA, pela cordialidade e eterno bom humor com o qual desempenha suas atividades no Laboratório.

AGRADECIMENTOS

Aos colegas do METANUTRI:

Nutricionistas CLAUDIA CRISTINA ALVES PEREIRA, SANDRA JUSTINO DA SILVA, CAMILA GARCIA MARQUES, GRAZIELA ROSA RAVACCI, MARIANA RASLAN, LETÍCIA De NARDI CAMPOS, Biólogos THIAGO MANZONI JACINTHO, pela convivência, companheirismo e integração existentes no Laboratório.

Drª. ANGELA FLÁVIA LOGULLO, pelas valiosas sugestões, receptividade e incentivo. Sua colaboração foi fundamental. Muito obrigada!

Drs. FÁBIO G. CAMPOS, PEDRO LUIZ BERTEVELLO, pelas aulas práticas de técnica cirúrgica experimental, sugestões valiosas durante a execução deste trabalho e permanente disponibilidade em colaborar.

ELAÍNE APARECIDA MUNIZ DA SILVA, Secretária do METANUTRI, pela eficiência, dedicação e disponibilidade com que desenvolve suas funções no Laboratório.

Bióloga ADRIANA R. DE OLIVEIRA, estagiárias de biologia ÉRICA MIDORI TAMANAHA e JULIANA C. PARISE GOBBO, acadêmicos da FMUSP WILLIAM G. JACOBSEN TEIXEIRA e DANIEL C. ARAÚJO, pela convivência enriquecedora, apoio constante durante a execução prática deste trabalho.

Funcionário GENIVALDO SILVA (ZU), pela responsabilidade com que desenvolveu suas atividades e carinho demonstrado com os animais do Laboratório.

AGRADECIMENTOS

Ao Laboratório FRESENIUS KABI DO BRASIL, pelo fornecimento do dipeptidio L-alanil-L-glutamina e apoio técnico-científico da Equipe de NPT.

Ao Laboratório FARMOTERÁPICA, nas pessoas do Dr. MICHAEL KFOURI FILHO e Drª. DIRCE AKAMINE pelo projeto e confecção da solução neutra de alanina mais prolina utilizada nos grupos experimentais deste trabalho científico.

À Divisão de Farmácia do Hospital das Clínicas, em especial ao Dr. VICTOR HUGO T. ROSA, Diretor pela contribuição no preparo e acondicionamento da solução de nutrição parenteral total com absoluto controle de qualidade.

Aos colegas do Laboratório de Oncologia da FMUSP – LIM 24:

À Dra MARIA LÚCIA HIRATA KATAYAMA, pela disponibilidade e interesse em colaborar durante a fase de investigação de novas substâncias envolvidas na regeneração hepática.

À FLÁVIA REGINA ROTEA MANGONE, Doutoranda do Laboratório de oncologia, pela disponibilidade em colaborar durante analise e apresentação final dos resultados.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. PAULO CÉSAR ANDRIGUETO, Professor da Universidade de Curitiba e sua orientanda Sônia, pela importante contribuição, ensinando-me a técnica cirúrgica da hepatectomia parcial.

Ao Dr. CELSO CUKIER pelo auxílio durante a realização do Projeto Piloto desta pesquisa e fácil didática em ensinar a técnica cirúrgica da NPT experimental.

Ao Dr. FLÁVIO H. FERREIRA GALVÃO, pelas aulas de cirurgia experimental, acompanhamento e ajuda durante o delineamento do trabalho experimental.

Ao Prof. Dr. NEIL FERREIRA NOVO e à Profª. Drª YARA JULIANO do Departamento de Medicina Preventiva da UNIFESP-EPM, pela competência e carinho demonstrados durante a assessoria estatística.

A WILSON R. CAVALHEIRO pela ajuda fundamental na aplicação dos testes estatísticos.

AGRADECIMENTOS

Aos funcionários da Pós-Graduação em Ciências, área de Concentração em Fisiopatologia Experimental:

SONIA FERNANDES e THANIA REGINA DE SOUZA pela competência, cordialidade e presteza demonstradas durante o desenvolvimento de suas atividades. A colaboração de vocês foi muito valiosa. Obrigada!

A todos os colegas do Curso de Pós-Graduação sempre dispostos a colaborar e trocar experiências.

AGRADECIMENTOS

Ao Corpo Docente do Departamento Ciências da Nutrição da ESCOLA DE NUTRIÇÃO DA UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA (ENUFBA), por assumir meus encargos e permitir a minha ausência para tão importante capacitação docente.

À NILZE BARRETO VILLELA, Profª da ENUFBA, amiga e grande incentivadora para que eu seguisse a carreira docente. Obrigada por acreditar no meu potencial e me estimular sempre!

À Drª. ROSEANNE DANTAS MAZZA, Profª da ENUFBA, pela orientação e delineamento da Linha de Pesquisa inicial. Obrigada por me indicar caminhos e possibilidades.

Ao Dr. ANDRÉ NEY MENEZES FREIRE, Professor da Escola de Medicina da UFBA, amigo e grande incentivador, pelo carinho, apoio e idealização inicial deste projeto.

Ao Plano Institucional de Bolsas do CNPQ e FAPESB pelo apoio financeiro, na concessão de bolsa de estudo no ano de 2002 e 2003, respectivamente.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Aos meus familiares, ALOINA e FRANCISCO, CELSO e LENE, RAIMUNDO e CLEIDE, TEREZINHA e as "crianças" CELSO JÚNIOR, ÍGOR, DANIELE, TAÍS, TIAGO, VÍTOR, ANAJARA, ISABEL, NINO, MARINA e GABRIEL, por compreenderem a minha ausência nas comemorações e reuniões de família.

Aos meus sogros MARIA AUXILIADORA (LILIA) e RAIMUNDO MAZZA JUNIOR, meus cunhados MARTHA, MATHEUS, MAURÍCIO e KIKA, pelo apoio, amizade e enorme carinho com o qual receberam o mais novo membro da família, CAIO MARCELO PASSOS MAZZA.

A ZENILDA DE JESUS (Zeni), pela eficiência, carinho e boa vontade com que me ajuda nos cuidados diários do pequeno CAIO MARCELO PASSOS MAZZA.

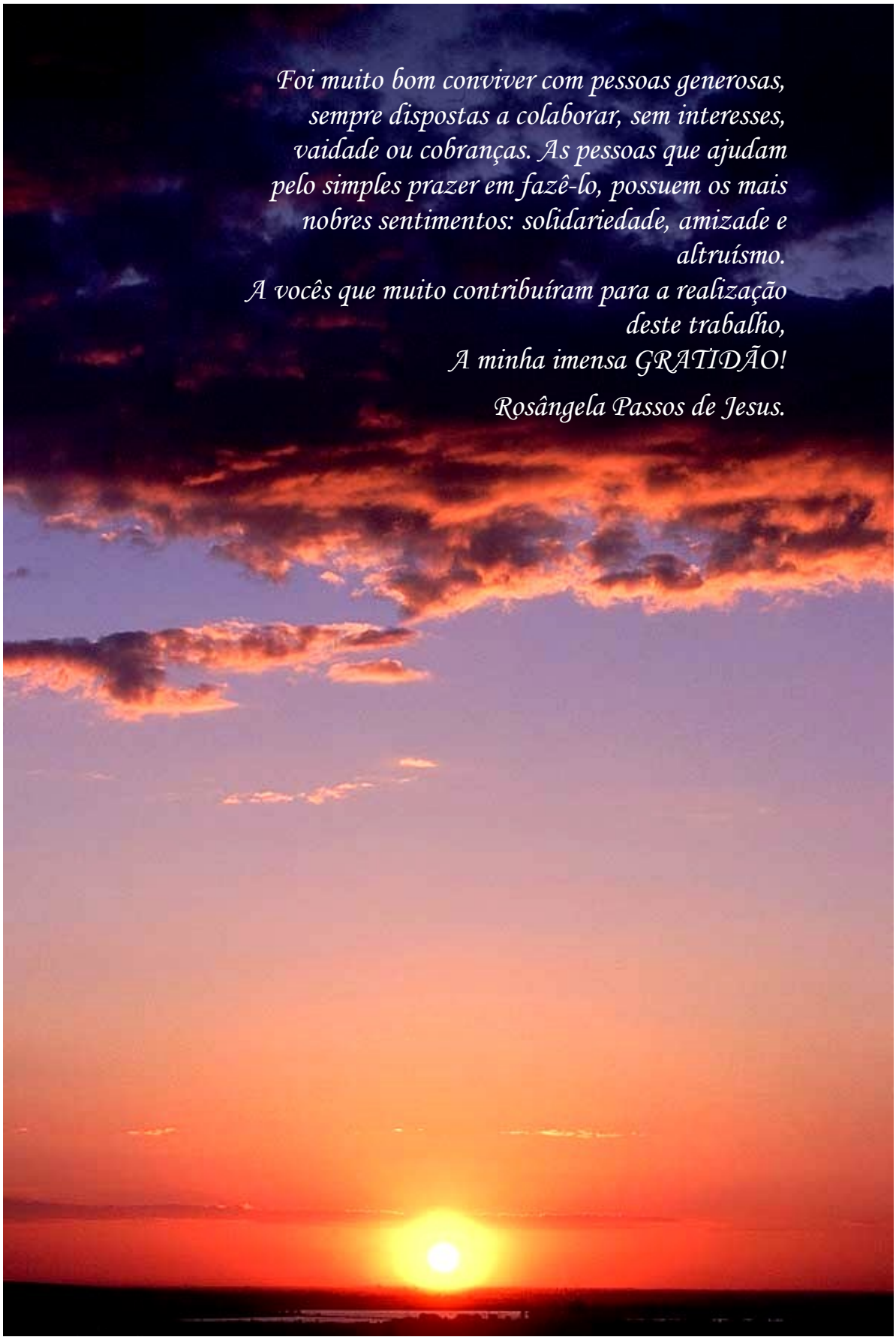
Aos meus novos amigos e vizinhos queridos do "The Ambassador", CHRISTIAN, MARCOS, ISABELA e CLARINHA, LUCIANA e SANDRO, ROSIMEIRE e GIBRAN, LUCIANA e MILTON, ÉRIKA e NARUITO, LUCILENE e CLÁUDIO, JANAINA e MANOEL, CRISTINA e NAVARRO, EDMUNDO, MICHELE e DAVISON, pelo apoio, carinho, atenção e companheirismo demonstrados em várias ocasiões.

Aos meus queridos amigos ALEXANDRA (Alê), FERNANDA (Fê) e LUIZ FELIPE (Lipe) pelo carinho, atenção e solidariedade demonstrados em vários momentos desta jornada.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Agradecimentos especiais a ALCIRLENE CRUZ DA FONSECA e CELSO LUIZ PASSOS DE JESUS JÚNIOR, pela valiosa colaboração e dedicação, durante a impressão e editoração desta tese.

E finalmente, gostaria de agradecer a DEUS por ter permitido estar aqui, hoje, agradecendo a todas estas pessoas!



Foi muito bom conviver com pessoas generosas, sempre dispostas a colaborar, sem interesses, vaidade ou cobranças. As pessoas que ajudam pelo simples prazer em fazê-lo, possuem os mais nobres sentimentos: solidariedade, amizade e altruísmo.

A vocês que muito contribuíram para a realização deste trabalho,

A minha imensa GRATIDÃO!

Rosângela Passos de Jesus.

APOIO FINANCEIRO

Este trabalho contou com apoio financeiro da Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Processo Nº 98/11856-1).

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta tese foi elaborada de acordo com:

Referências Bibliográficas: adaptado de *Internacional Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina. Serviço de biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Júlia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely campos Cardoso, Valéria Vilhena. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2004.

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

SUMÁRIO

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas

Resumo

Abstract

1.	**Introdução.....**	01
1.1.	**Considerações Iniciais.....**	01
1.2.	**Revisão da Literatura.....**	04
2.	**Objetivos.....**	11
3.	**Método.....**	12
3.1.	**Local de Execução das atividades.....**	12
3.2.	**Animais.....**	12
3.3.	**Estudo Experimental.....**	13
3.3.1.	**Classificação e Requerimentos nutricionais dos animais.....**	13
3.3.2.	**Procedimentos cirúrgicos.....**	13
3.3.2.1.	**Anestesia.....**	13
3.3.2.2.	**Cateterização da veia jugular direita.....**	14
3.3.2.3.	**Hepatectomia Parcial (HP).....**	16
3.3.3.	**Grupos Experimentais e Controles.....**	21
3.3.4.	**Nutrição pós-operatória.....**	23
3.3.4.1.	**Regime de nutrição parenteral.....**	23
3.3.5.	**Sacrifício.....**	26
3.4.	**Biologia molecular.....**	27
3.4.1.	**Extração de RNA total.....**	27
3.4.2.	**Tratamento das amostras de RNA.....**	30
3.4.3.	**Reação em Cadeia por Polimerase via Transcriptase Reversa (RT PCR).....**	31
3.5.	**Análise Estatística.....**	36
4.	**Resultados.....**	38
4.1.	**Concentração de RNA total do remanescente hepático.....**	38
4.2.	**Reações de RT-PCR.....**	43
5.	**Discussão.....**	57
5.1.	**Do modelo apresentado.....**	57
5.2.	**Do teor de RNA total do remanescente hepático.....**	58
5.3.	**Do Processo de Regeneração Hepática.....**	62
5.4.	**Da Expressão gênica do HGF, TGF, IL-6 e timidina quinase.....**	65
5.5.	**Considerações Finais.....**	72
6.	**Conclusões.....**	74
7.	**Referências.....**	75

LISTA DE ABREVIATURAS

AIN-93	–	*American Institute of Nutrition* - 93
Ala+Pro	–	Solução de alanina mais prolina
Ala-Gln	–	L-alanil-L-glutamina
cDNA	–	DNA complementar
D-Controle	–	Grupo controle desnutrido
D-Experimental	–	Grupo desnutrido experimental
D-Gln	–	Grupo desnutrido com glutamina
dL	–	Decilitro
DNA	–	Ácido Desoxirribunucléico
DP	–	Desvio-padrão
D-Pro	–	Grupo desnutrido com prolina
EGF	–	*Epidermal growth factor*
et al.	–	E outros colaboradores
Fase “S”	–	Fase de divisão de DNA
G	–	Grama
g/L	–	Gramas por litro
G-0	–	*Gap* ou intervalo 0
G-1	–	*Gap* ou intervalo 1
HCC	–	Carcinoma hepatocelular
HGF	–	*Hepatocyte growth factor*
HP	–	Hepatectomia parcial
IGF-1	–	*Insulin-like growth factor -1*
IL-6	–	Interleucina-6
Kcal/Kg/dia	–	Quilocalorias por quilograma por dia
Kcal/mL	–	Quilocalorias por mL
LIM	–	Laboratório de Investigação Médica
MG	–	Beta microglobulina
μg	–	Microgramas
mg	–	Miligrama
mg/kg	–	Miligramas por quilograma
μL	–	Microlitros
m-RNA	–	RNA mensageiro
N/Kg/dia	–	Nitrogênio por quilograma por dia
N-Controle	–	Grupo controle nutrido
N-Experimental	–	Grupo nutrido experimental
NF-kappa B	–	*Nuclear transcription factor–kappa B*
N-Gln	–	Grupo nutrido com glutamina
$NH4^+$	–	Íons de amônia
NP	–	Nutrição Parenteral
N-Pro	–	Grupo nutrido com prolina

LISTA DE ABREVIATURAS

NS	–	Não significante
Pb	–	Pares de base
PCR	–	Reação em cadeia por polimerase
pH	–	Potencial de hidrogênio
RNA	–	Ácido Ribonucleíco
RPM	–	Rotações por minuto
rRNA	–	RNA ribossômico
RT-PCR	–	Reação em cadeia por polimerase via transcriptase reversa
S	–	Significante
STAT3	–	*Signal transduction and activator of transcription*
TGF-α	–	*Transforming growth factor alpha*
TK	–	Timidina quinase
TNF-α	–	*Tumor necrosis factor*
UA	–	Unidades arbitrárias

RESUMO

RESUMO

Mazza RPJ. *Influencia da infusão parenteral de aminoácidos sobre a expressão gênica de fatores de crescimento e timidina quinase no remanescente hepático de ratos desnutridos* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2004. 85p.

Introdução: Nutrição parenteral (NP) enriquecida com L-alanil-L-glutamina (Ala-Gln) aumenta a síntese de DNA, favorecendo a regeneração hepática em ratos nutridos. Nós demonstramos anteriormente que Ala-Gln via parenteral aumenta o crescimento do remanescente hepático em ratos desnutridos. **Objetivos:** Avaliar o efeito da NP enriquecida com aminoácidos e do estado nutricional sobre a expressão gênica dos fatores de crescimento (HGF,TGF-α), interleucina-6 (IL-6) e timidina kinase (TK) no remanescente hepático. **Método:** 52 ratos *Wistar* machos adultos pesando aproximadamente 270 g foram randomizados em seis grupos. Três grupos Nutridos (N) foram alimentados com dieta padrão normocalórica (100 kcal/kg/dia) e normoprotéica (14% de caseína) por 10 dias. Após esse período, dois destes grupos foram submetidos a hepatectomia parcial (HP) e NP enriquecida com Ala-Gln (N-Gln=10) ou com solução de prolina mais alanina (N-Pro=10). O terceiro grupo nutrido foi usado como controle fisiológico sem HP e sem NP (N-Controle=06); Três grupos Desnutridos (D) foram alimentados com dieta hipocalórica (60kcal/kg/dia) e hipoprotéica (4% de caseína) por igual período e submetidos aos mesmos procedimentos e NP descritos anteriormente (D-Gln=10; D-Pro=10 e D-Controle=06). Todos os grupos experimentais receberam imediatamente após a cirurgia, NPT isocalórica (188 Kcal/Kg/dia) e isonitrogenada (1,12 g N/kg/dia) por 96 horas. Posteriormente, amostras do RH foram armazenadas em nitrogênio líquido e processadas para extração de RNA hepáticos. A expressão gênica dos fatores de crescimento (HGF,TGF-α), IL-6 e timidina kinase (TK) foram avaliados semi-quantitativamente por reação em cadeia da polimerase com transcriptase reversa (RT-PCR). **Resultados:** 1. O RNA total hepático foi menor nos grupos N-Gln e N-Pro

em relação ao grupo controle nutrido sem hepatectomia ($p<0,05$); 2. No grupo D-Pro o teor de RNA total hepático foi maior em relação aos grupos N-Pro, D-Gln e D-Controle ($p<0,05$); 3. A expressão gênica do HGF foi maior no grupo D-Gln em relação ao D-Controle e no D-Pro em relação aos grupos D-Gln, N-Pro e D-Controle ($p<0,05$); 4. A expressão gênica do HGF foi maior no grupo D-Experimental em relação ao grupo N-Experimental e D-Controle ($p<0,05$); 5. Não houve diferença na expressão gênica de TGF-α e TK entre os grupos experimentais e controles descritos. **Conclusões.** Nas condições da presente pesquisa concluímos que: 1.O RNA total hepático foi menor nos ratos nutridos submetidos a HP independente da administração de glutamina ou prolina; 2. No grupo desnutrido submetido a HP a prolina aumentou o teor de RNA total; 3. Ocorreu relação inversa entre desnutrição e teor de RNA total no remanescente hepático (RH) dos animais com prolina; 4. A administração de aminoácidos aumentou a expressão gênica do HGF após hepatectomia parcial em ratos desnutridos, sendo que a prolina teve efeito mais expressivo que a glutamina; 5. Ratos desnutridos submetidos a HP tiveram maior expressão gênica de HGF do que aqueles sem hepatectomia ou nutridos com hepatectomia; 6. A oferta de aminoácidos não se associou a modificação da expressão gênica de TGF-α e TK no (RH).

Descritores: Regeneração hepática; glutamina; expressão gênica; substancias de crescimento; ratos Wistar; reação em cadeia por polimerase via transcriptase reversa.

ABSTRACT

Mazza RPJ. *Influence of parenteral infusion of amino acids on the gene expression of growth factors and timidin kinase on the hepatic remnant of malnourished rats.* [Thesis] São Paulo: University of São Paulo Medical School; 2004. 85p.

Introduction: Parenteral nutrition (PN) enriched with L-alanyl-L-glutamine (Ala-Gln) increases the synthesis of DNA, favoring hepatic regeneration in nourished mice. We demonstrated previously that parenteral Ala-Gln increases the growth of the hepatic remnant in undernourished mice. **Objective**: To evaluate the effect of PN enriched with amino acids and of the nutritional state on the gene expression of growth factors (HGF, TGF-α) and timidin kinase (TK) in the hepatic remnant. **Methods**: Fifty-two adult male Wistar rats weighing approximately 270 g each, were divided at random into six groups. Three nourished groups (N) were fed with a standard normocaloric (100 kcal/kg/day) and normoproteic (14% casein) diet for 10 days. After that period, two of these groups were submitted to partial hepatectomy (PH) and PN enriched with Ala-Gln (N-Gln = 10) or with proline/alanine solution (N-Pro = 10). The third nourished group was used as a physiologic control (N-Control = 06); Three undernourished groups (D) were fed with hypocaloric (60 kcal/kg/day) and hypoproteic (4% casein) diet for an equal period and submitted to the same procedures and PN as described previously (D-Gln = 10; D-Pro = 10 and D-Control = 06). Immediately after the surgery, all of the experimental groups received isocaloric (188 Kcal/Kg/day) and isonitrogenated (1.12 g N/kg/day) total PN for 96 hours. Later, samples of hepatic remnant were stored in liquid nitrogen and processed for extraction of hepatic RNA. The gene expression of the growth factors (HGF, TGF-α) and TK were evaluated semi-quantitatively by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results:** 1) Total hepatic RNA was less in the N-Gln and N-Pro groups in relation to the control group that was nourished and not subjected to hepatectomy ($p < 0.05$); 2) The D-Pro group presented a higher content of hepatic total RNA than groups N-Pro, D-Gln and D-Control ($p < 0.05$); 3) The gene expression

of HGF was higher in group D-Gln compared to the D-Control and also for D-Pro in relation to groups D-Gln, N-Pro and D-Control ($p < 0.05$); 4) The gene expression of HGF was greater in the D-Experimental group in relation to the N-Experimental and D-Control groups ($p < 0.05$); and 5) There was no difference in the gene expression of TGF-α and TK between the experimental and control groups. **Conclusions**: We concluded that under the conditions of the present research: 1) hepatic total RNA was less in the nourished rats submitted to PH, irrespective of the administration of glutamine or proline; 2) The malnourished group submitted to PH and proline presented an increased content of total RNA; 3) There was an inverse relationship between malnutrition and total RNA content in the hepatic remnant of animals with proline; 4) The administration of amino acids increased the gene expression of HGF after PH in undernourished rats and proline had a more marked effect than glutamine; 5) There was a greater gene expression of HGF among malnourished rats submitted to PH compared to those without hepatectomy or nourished with hepatectomy; and 6) The provision of amino acids was not associated to a modification in the gene expression of TGF-α and TK in the hepatic remnant.

Key-words: Hepatic regeneration; glutamine; gene expression; growth factor; Wistar rats; reverse transcriptase polymerase chain reaction / RT-PCR.

INTRODUÇÃO

1. 1. Introdução.

1.1. Considerações Iniciais.

O lóbulo hepático é formado por células parenquimatosas (hepatócitos) e não parenquimatosas. Os sinusóides hepáticos são formados por três tipos de células não parenquimatosas: células endoteliais, células de Kupffer e células estreladas do fígado (Kmiec, 2001; Svensson et al., 1992). As células estreladas abrangem as células que estocam lipídios: células de Ito, lipócitos, células peri-sinusoidais ou células ricas em vitamina A (Kmiec, 2001). Adicionalmente, no lúmen dos sinusóides encontram-se localizados linfócitos hepáticos denominados de células de pit ou células natural “killer” específicas do fígado (Williams e Iatropoulos**,** 2002).

A ressecção hepática geralmente está indicada como tratamento curativo em pacientes portadores de carcinoma hepatocelular principalmente decorrente de cirrose por hepatite C. No entanto, o pós-operatório da hepatectomia extensa requer cuidados adicionais, pois o risco de insuficiência hepática é significativo e a recuperação funcional do órgão depende da capacidade regenerativa do remanescente hepático (Franco et al., 1990).

Após a ressecção hepática para tratamento de carcinoma hepatocelular (HCC), observa-se taxa de complicações em torno de 21%, taxa de mortalidade pós-operatória de 7,5% (Khuhaprema, 1999) e sobrevida após cinco anos da

ressecção cirúrgica de aproximadamente 12% (Khuhaprema, 1999; Lai et al., 1990).

A regeneração hepática pode ser induzida experimentalmente utilizando-se procedimentos agudos cirúrgicos ou químicos, que removam ou destruam significativamente o parênquima hepático (Masson et al., 1999b). Imediatamente após a perda de tecido hepático ocorrem alterações celulares, bioquímicas e moleculares como a super expressão de vários genes que regulam a restauração hepatocelular (Fukuhara et al., 2003).

O processo regenerativo induzido pela ressecção hepática ocorre por hiperplasia e hipertrofia compensadora dos lobos remanescentes, com conseqüente aumento das dimensões hepáticas e restauração do peso inicial do órgão (Arias et al., 1994). Este processo é controlado e mediado por fatores intra e extra-hepáticos como hormônios, neurotransmissores, nutrientes, oncogenes e fatores de crescimento que regulam a síntese de glicolipídios e proteínas (Jesus et al., 2000; Michalopoulos e DeFrances 1997).

Imediatamente após hepatectomia parcial ocorre formação de grupos contendo 10 a 14 hepatócitos, inicialmente desprovidos de sinusóides e matriz extracelular. Posteriormente, duas a três células são removidas para inclusão do espaço vascular, então células de Ito e células endoteliais fenestradas se posicionam entre os hepatócitos para restaurar a estrutura vascular do tecido hepático recém formado. Assim que a vascularização é restabelecida, ocorre a ativação nas células de Ito, de genes relacionados com a síntese de laminina,

entactina e outras proteínas que compõe a matriz extracelular, dando fixação ao novo tecido hepático (Martinez-Hernandez e Amenta 1995).

As células endoteliais próximas aos hepatócitos remanescentes atuam em sinergia com as células do parênquima hepático para promover o crescimento e desenvolvimento do órgão (Matsumoto et al., 2001).

Em condições tanto fisiológicas como patológicas várias funções exercidas pelos hepatócitos, são reguladas por substâncias liberadas pelas células não parenquimatosas adjacentes. As células que compõe o endotélio sinusoidal possuem pequenas fenestrações, as quais permitem difusão de substâncias entre o sangue e a superfície dos hepatócitos, constituindo assim a função de filtração do fluxo sangüíneo (Kmiec Z, 2001). Desta forma, as células fenestradas que compõem o tecido endotelial ou sinusóide, possibilitam a irrigação do parênquima hepático com oxigênio, nutrientes e fatores de crescimento que estimulam a regeneração hepática.

Na prática clínica a sobrevida dos pacientes submetidos à ressecção hepática depende do processo regenerativo do fígado vinculado à extensão da ressecção, as alterações do estado nutricional e terapia nutricional introduzida no intra-operatório (Plauth et al., 1997).

Os pacientes submetidos a hepatectomia parcial geralmente apresentam distúrbios nutricionais importantes (Capacci, 1996; MacCullough et al., 1989). Portanto é de interesse estudar em animais desnutridos o efeito da infusão de

glutamina ou prolina via parenteral sobre a expressão de genes envolvidos na regeneração hepática.

1.2. Revisão da Literatura.

A Regeneração hepática é um processo altamente orquestrado induzido por estímulo químico, viral ou cirúrgico que envolve diversas alterações seqüenciais na expressão gênica (Fausto et al., 1995; Michalopoulos e DeFrances 1997). O perfil da expressão gênica identificado experimentalmente no remanescente hepático de ratos submetidos a hepatectomia parcial, demonstrou que dentre os 116 genes estudados, 41 estavam envolvidos na regeneração hepática, 65 estavam super-expressos e 51 possuíam baixa expressão durante processo de proliferação celular (Fukuhara et al., 2003).

Sabe-se que após a hepatectomia parcial alguns fatores de crescimento e citocinas, como fator de crescimento hepático (*hepatocyte growth factor* - HGF) (Nakamura et al., 1984), fator transformador de crescimento alfa (*transforming growth factor alpha* - TGF-α) (Scotte et al., 1997), interleucina 6 (*interleukin* IL-6) e fator de necrose tumoral (*tumor necrosis factor* - TNF-α) (Michalopoulos e DeFrances 1997), são expressos e liberados no sangue periférico por hepatócitos e células não parenquimatosas, desempenhando importante função durante o processo de proliferação celular e regeneração hepática (Fausto 1996; Mullhaupt, 1994, LaBrecque, 1994).

O HGF foi descrito inicialmente como fator com ação específica para o fígado (Fleig, 1988). Atualmente sabe-se que o HGF atua como mitógeno em vários tipos celulares, como melanócitos e células dos túbulos renais (Arias et al., 1994). HGF é sintetizado por células mesenquimais intra ou extrahepáticas, mas não por hepatócitos ou outras células epiteliais do corpo. (Ankoma-Sey, 1999). No fígado, as células de Kupffer, células endoteliais e de Ito produzem HGF, principalmente quando o fígado é submetido à agressão química, tóxica ou cirúrgica (D'Errico et al., 1996).

O HGF foi o primeiro agente mitogênico identificado no sangue em altas concentrações durante o processo regenerativo hepático (Arias et al., 1994). Ao induzir até dez vezes mais a proliferação celular em relação ao TGF-α (Masson et al., 1999a), o HGF é considerado o mais potente estimulador da proliferação de hepatócitos, vindo a exercer seu efeito mitogênico por mecanismos parácrino e endócrino (Michalopoulos e DeFrances, 1997; Shiota et al., 1994).

Durante a regeneração hepática, ocorre expressão gênica do HGF no fígado, baço e pulmões, associado ao aumento do nível de HGF no fígado e corrente sangüínea, antes mesmo do início da síntese de DNA hepático (Gohda, 2002).

Em ratos a concentração plasmática de HGF aumenta mais do que 20 vezes no período de um a três horas após a hepatectomia, vindo a normalizar lentamente até alcançar 72 horas do pós-operatório (Arias et al., 1994). Os

níveis plasmáticos do HGF persistem elevados acima do nível basal, durante todo o processo regenerativo do fígado (Michalopoulos e DeFrances, 1997).

O fator de crescimento TGF-α atua sobre o mesmo receptor que o fator de crescimento epidérmico (*epidermal growth factor* - EGF), sendo eqüipotente na capacidade de estimular a proliferação de hepatócitos *in vitro* (Mullhaupt et al., 1994). O TGF-α é sintetizado por hepatócitos em regeneração, mas não por células não parenquimatosas e estimula a proliferação celular por mecanismo autócrino (Mead e Fausto, 1989). A cinética da elevação dos níveis hepáticos do RNA mensageiro (m-RNA) para o TGF-α após hepatectomia é conhecido. Seus níveis sobem 10 vezes acima do normal, durante as primeiras quatro a cinco horas após a HP, com pico máximo 24 h após a cirurgia. Já os níveis plasmáticos do TGF-α, se elevam 8 h após a HP, com picos máximos 24 e 72 h após a cirurgia (LaBrecque, 1994).

Experimentalmente os níveis plasmáticos e hepáticos de TGF-α aumentam em consonância com o pico mitótico dos hepatócitos em modelos de regeneração hepática após HP e intoxicação química. (Tomiya et al., 1998). Isto sugere que a super-expressão do mRNA para TGF-α ocorre simultaneamente com o pico de divisão de DNA característico da fase “S” do ciclo celular (Scotte et al., 1997).

Devido a expressão gênica do TGF-α estar intimamente relacionada com a síntese de DNA, sugere-se que um dos principais mecanismos de ação do

TGF-α durante o processo de regeneração hepática envolve controle da duração da resposta proliferativa induzida após HP (Nagy et al., 2000).

Existe relação entre citocinas pró-inflamatórias e a via de sinalização imediata que induz a regeneração hepática após HP. No fígado as citocinas são produzidas por monócitos, macrófagos e células endoteliais em resposta à lesão tecidual (Michaloupoulos e DeFrances, 1997; Wadamori et al., 1996; Arias et al., 1994; LaBrecque, 1994).

Após a HP, as células de Kupffer (macrófagos hepáticos) e células endoteliais secretam interleucina-6 (IL-6) sob estímulo da lesão tecidual e fator de necrose tumoral alfa (TNF-α). Provavelmente, uma das funções do TNF-α é regular a secreção de IL-6, citocina que possui ação co-mitogênica restrita ao fígado e estimula a síntese de proteína de fase aguda pelos hepatócitos caracterizando a resposta inflamatória global. (Nagy et al., 2000; Michaloupoulos e DeFrances, 1997).

A Timidina quinase (TK), enzima essencial para divisão celular, está relacionada diretamente com a incorporação de H^3timidina no núcleo celular e mitose. Alterações na expressão do gene que codifica a TK podem estar relacionadas com crescimento e proliferação celular (Beyer et al., 1991).

A atividade da TK no tecido hepático em condições fisiológicas é muito baixa. No entanto, 12 a 24 horas após a HP ocorre aumento significativo desta enzima que permanece em níveis elevados por três a quatro dias. Isto coincide

com a maior atividade da divisão celular e síntese de DNA observadas durante a regeneração hepática (Zieve et al., 1985; Kahn et al., 1980).

Fatores de transcrição como STAT3 (*signal transduction and activator of transcription*) e NF-kappa B (*Nuclear transcription factor–kappaB*), ativam a resposta de crescimento primário com ativação de genes imediatos (*immediate-early genes*), os quais regulam as fases mais tardias do ciclo celular no remanescente hepático. Desta forma, o fígado mantém a homeostase metabólica, por meio da sua capacidade de restabelecer a massa hepática simultaneamente com a manutenção da capacidade funcional do órgão durante a regeneração (Taub, 1996).

A resposta orgânica observada imediatamente após a hepatectomia parcial, é um fator crítico que induz os hepatócitos a transitarem da fase de quiescência para o ciclo celular, iniciando a seqüência de mitoses e proliferação dos hepatócitos. A identificação da cascata de eventos decorrentes da resposta imediata a hepatectomia pode colaborar para compreensão dos mecanismos moleculares que envolvem a regeneração hepática (Xu et al., 2000).

Para estimular a proliferação celular em modelos experimentais, diversos estudos testaram nutrientes especiais, os quais são ofertados aos animais imediatamente após a hepatectomia para identificar se os mesmos são capazes de estimular o processo de regeneração hepática. Dentre esses nutrientes, destaca-se a glutamina, que é um aminoácido condicionalmente essencial para indivíduos gravemente enfermos, poli-traumatizados ou pacientes cirúrgicos críticos (Buchman, 2003; Ziegler et al., 1998). A glutamina

é o substrato preferencial para células de rápida proliferação como enterócitos, colonócitos, fibroblastos, macrófagos e linfócitos (Wischmeyer, 2003; Morlion et al., 1998; Haque et al., 1996).

Experimentalmente em ratos nutridos, a suplementação da nutrição parenteral com dipeptídio L-alanil-L-glutamina (Ala-Gln), aumenta a taxa de regeneração hepática por estimular a síntese de DNA nos hepatócitos remanescentes (Yamaguchi et al., 1997; Yoshida et al., 1995).

A administração intravenosa de glutamina em cães nutridos submetidos a hepatectomia parcial, aumenta o suprimento de energia para proliferação e a síntese de fatores de crescimento que estimulam a regeneração hepática (Ito e Higashiguchi, 1999).

Nutrição Parenteral (NP) suplementada com glutamina e glucagon-insulina oferecida a ratos submetidos a hepatectomia parcial de 70% promove aumento do DNA hepático, indicando estímulo precoce da regeneração hepática (Yamaguchi et al., 1997).

Nós demonstramos previamente que ratos desnutridos submetidos a hepatectomia parcial de 70% e recebendo NP enriquecida com Ala-Gln apresentam maior crescimento do remanescente hepático com manutenção da morfologia durante a regeneração hepática (Passos de Jesus Mazza et al., 2003).

Diante das evidências existentes na literatura a respeito do papel da glutamina na regeneração hepática de animais eutróficos e possibilidade da aplicação de técnicas sensíveis para avaliar o remanescente hepático, surge o

interesse em identificar se a suplementação da NP com o dipeptídio L-alanil-L-glutamina ou com solução de alanina mais prolina, pode alterar o teor de RNA total, a expressão gênica do HGF, TGF-α, IL-6 e timidina quinase no remanescente hepático de ratos desnutridos.

Os resultados deste trabalho científico poderão colaborar com questões ainda não elucidadas, no que diz respeito à influência da glutamina e prolina sobre determinados aspectos da regeneração hepática em condição de desnutrição e grandes ressecções hepáticas.

OBJETIVOS

2. Objetivos.

Geral.

Verificar a influência da administração via parenteral do dipeptídio L-alanil-L-glutamina ou da solução de alanina mais prolina sobre o teor de RNA total e da expressão gênica de fatores de crescimento e enzima envolvida na regeneração hepática, após hepatectomia parcial em ratos desnutridos.

Específicos.

Em animais nutridos e desnutridos submetidos a hepatectomia parcial e infusão endovenosa do dipeptídio L-alanil-L-glutamina ou da solução de alanina mais prolina, determinar:

1. Concentração do RNA total do remanescente hepático dos animais dos diversos grupos estudados;
2. Expressão gênica dos fatores de crescimento HGF, TGF$-\alpha$, Interleucina-6 (IL-6), e enzima timidina quinase, nos diversos grupos experimentais.
3. Influência da desnutrição e ressecção hepática na expressão dos genes estudados.

MÉTODO

3. Método.

3.1. Local de Execução das atividades.

As atividades práticas deste trabalho científico foram desenvolvidas no Laboratório de Fisiologia e Distúrbios Esfincterianos (LIM 35), Grupo de Metabologia e Nutrição em Cirurgia do Departamento de Gastroenterologia, em parceria com o Laboratório de Genética Molecular do Câncer da Disciplina de Oncologia do Departamento de Radiologia (LIM-24) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP).

3.2. Animais.

Foram utilizados 52 ratos (*Rattus Norvegicus Albinus, Rodentia Mammalia*) Wistar, machos, adultos, com peso entre 240 e 300 gramas, provenientes do Centro de Bioterismo da FMUSP, mantidos à temperatura ambiente sob ciclos diurnos de luz. Dez dias antes do experimento, os animais foram adaptados em gaiolas metabólicas individuais, com livre acesso à ingestão de água.

Este experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Todos os animais receberam cuidado adequado e uso de anestésicos em todos os procedimentos experimentais.

3.3. Estudo Experimental.

3.3.1. Classificação e Requerimentos nutricionais dos animais.

Inicialmente 52 animais foram distribuídos de forma randomizada em dois grupos: experimental e controle, subdivididos em nutridos e desnutridos. Os grupos nutridos foram alimentados com dieta equilibrada, normocalórica (100 kcal/dia) e normoprotéica (14% de caseína) por dez dias, até atingir peso corpóreo em torno de 270 gramas. (Reeves et al., 1993). Os grupos desnutridos receberam dieta hipocalórica (60 kcal/dia) e hipoprotéica (4% de caseína) por igual período, quando alcançaram perda de peso corpóreo entre 10 a 15% (Passos de Jesus Mazza et al.,2003; Rozovsky e Temkin, 1984).

3.3.2. Procedimentos cirúrgicos.

3.3.2.1. Anestesia.

Após o período de adaptação e preparo nutricional todos os animais dos grupos experimentais foram pesados em balança de alta precisão (Petit Balance Chyo), com o auxílio de um recipiente apropriado de peso previamente conhecido.

Realizou-se administração intraperitoneal de 0,011 mL/kg de Ketamine (Ketalar/Parke-Davis, uk) utilizando-se seringa de 1,0 mL. Após a sedação, os

animais foram tricotomizados nas regiões ventral do pescoço, supraclavicular direita, dorsal e abdominal utilizando álcool iodado para assepsia.

Em seguida, os animais foram contidos em tábua de cortiça coberta por campo cirúrgico estéril para início dos procedimentos cirúrgicos.

3.3.2.2. Cateterização da veia jugular direita.

Realizou-se conforme técnica desenvolvida por Lima-Gonçalves et al., (1990), em que a extremidade distal do cateter é posicionada na veia cava superior e a extremidade proximal acoplada a uma peça de metal é fixada no dorso do animal.

Com o animal em decúbito dorsal, realizou-se incisão transversa de aproximadamente um centímetro na região supraclavicular direita. A seguir, o animal foi posicionado em decúbito ventral e com auxílio de uma agulha de "Intracath®" (Biotecno Produtos Plásticos e Médicos Ltda. – São Paulo) confeccionou-se um túnel pelo tecido sub-cutâneo a partir da borda distal da incisão até a região dorsal, exteriorizando sua extremidade entre a região retroauricular. Pelo interior desta agulha passou-se o cateter de silicone "silastic" nº 602-175 (D'Altomare Química Ltda. – São Paulo), de aproximadamente 1 mm de diâmetro e 70 mm de comprimento, o qual foi tracionado pelo túnel em direção a incisão ventral. A peça intermediária para infusão foi representada por uma agulha dotada de curvatura de aproximadamente 80º, soldada a uma peça metálica, com duas asas laterais

tipo “borboleta” contendo dois orifícios paralelos em cada extremidade. Esta peça foi fixada ao dorso do animal, por meio de pontos separados de fio de algodão 4.0, atravessando a pele, tecido subcutâneo e musculatura dorsal, passando pelos orifícios paralelos das asas da peça metálica.

Posteriormente, procedeu-se à identificação, dissecção e reparo da veia jugular direita com fio de algodão 4.0. A veia jugular interna foi então ligada distalmente e cateterizada na sua porção proximal pelo tubo de silicone “silastic” posicionado anteriormente. Em seguida a incisão foi suturada de forma contínua utilizando-se fio *mononylon* 3.0 e realizada assepsia com álcool iodado. Figuras 2(a), 2(b), 2(c), 2(d).

Ao cateter de silicone foi adaptado um intermediário de livre rotação acoplado a um cateter de polietileno de aproximadamente 120 mm, formando uma via preenchida por solução fisiológica heparinizada, que foi inserida a bomba de infusão, segundo método descrito em nosso meio por Yamaguchi et al., em 1989. Figura 3.

3.3.2.3. Hepatectomia Parcial (HP):

Foi realizada com o animal em posição de decúbito dorsal e remoção dos lobos mediano e lateral esquerdo conforme técnica desenvolvida por Higgins e Anderson (1931). Inicialmente realizou-se incisão subcostal bilateral com cerca de 4,5 cm margeando o rebordo costal e apêndice xifóide e remoção dos ligamentos gastro-hepáticos e diafragmáticos. Figuras 4(a) e 4(b). Os lobos hepáticos foram removidos com instrumental de microcirurgia apropriado, efetuando-se previamente ligadura do pedículo hepático com fio de algodão 3.0, perfazendo HP de aproximadamente 68 a 70% (Eguchi et al., 1996). Figuras 4(c) e 4(d).

Após esses procedimentos, realizou-se revisão hemostática da cavidade abdominal, sutura da parede abdominal em dois planos: tecido muscular e pele.

Posteriormente os animais foram hidratados com administração de 3,0 mL de soro glicosado a 10% e 1,0 mL de bicarbonato de sódio a 10% por via endovenosa para corrigir eventual hipovolemia e acidose metabólica (Passos de Jesus Mazza et al., 2003).

Ao término dos procedimentos cirúrgicos, os animais foram aquecidos com auxílio de almofada térmica por duas horas, para combater a hipotermia e recolocados em gaiolas metabólicas individualizadas, com livre acesso a água e regime de NP, segundo Lima-Gonçalves et al., (1990) e acompanhados clinicamente até o momento do sacrifício.

A partir do pós-operatório imediato, todos os animais dos grupos experimentais receberam solução de nutrição parenteral (NP) isocalórica e isonitrogenada durante 96 horas, por via venosa. Nas primeiras 24 horas após os procedimentos cirúrgicos, os animais receberam apenas 50% da fórmula prescrita.

A figura 1 ilustra o planejamento do experimento desde a fase de adaptação até o sacrifício.

Figura 1: Esquema ilustrativo da seqüência de procedimentos realizados na presente pesquisa:

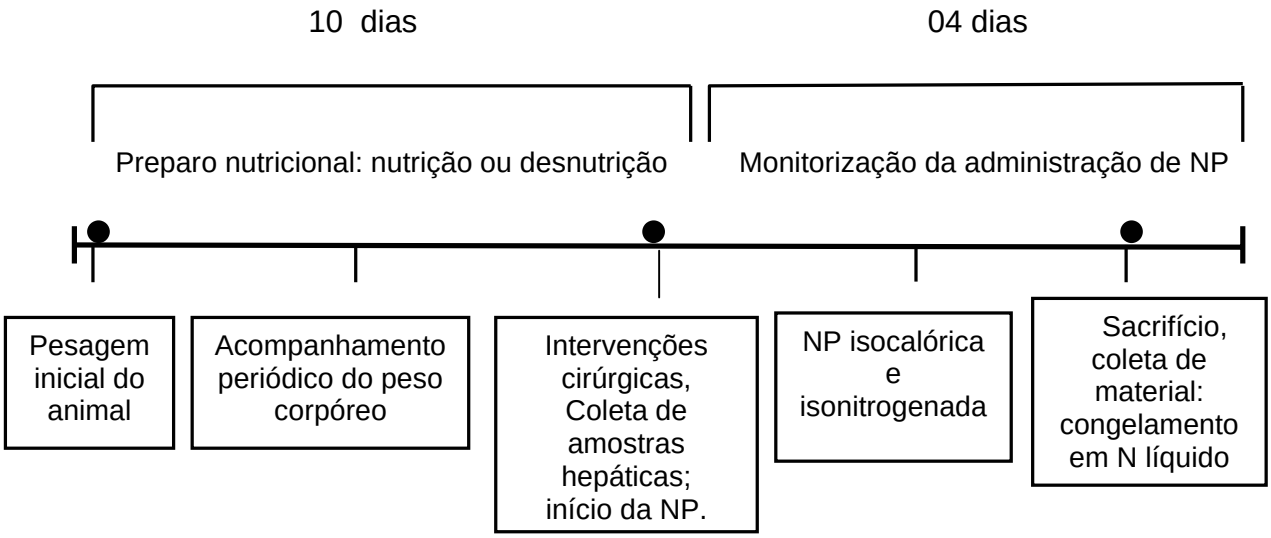
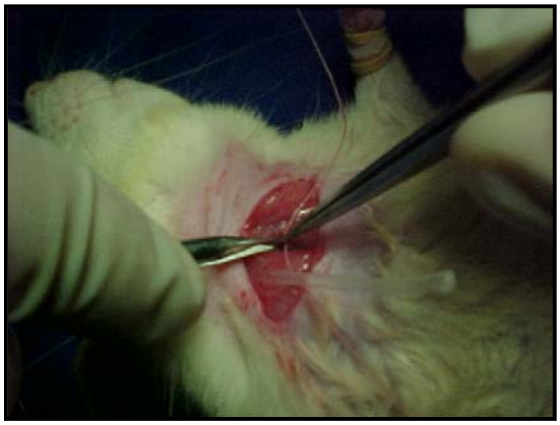


Figura 2: Cateterização da jugular.

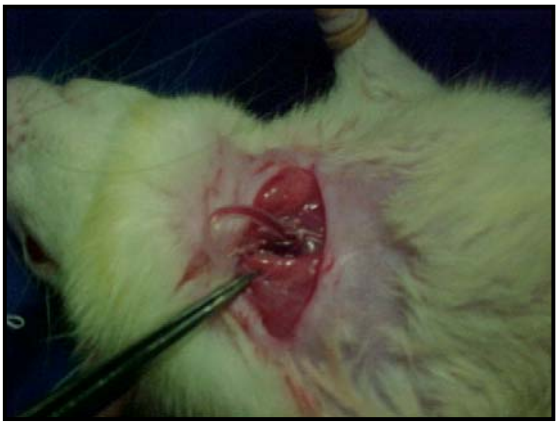
(a) Identificação e dissecção da veia jugular direita;
(b) Visualização da veia jugular direita;
(c) Introdução do cateter de silicone no interior da veia;
(d) Fixação da extremidade externa.

a.

b.



c.



d.

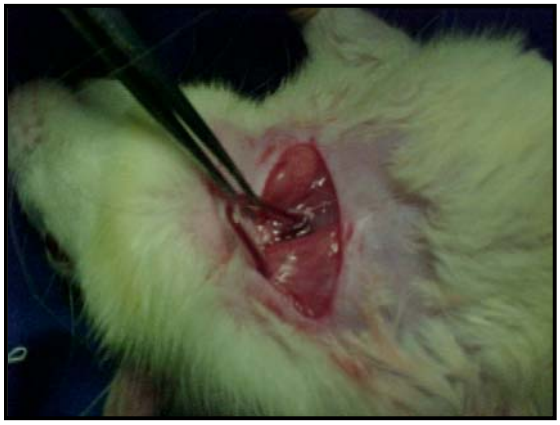
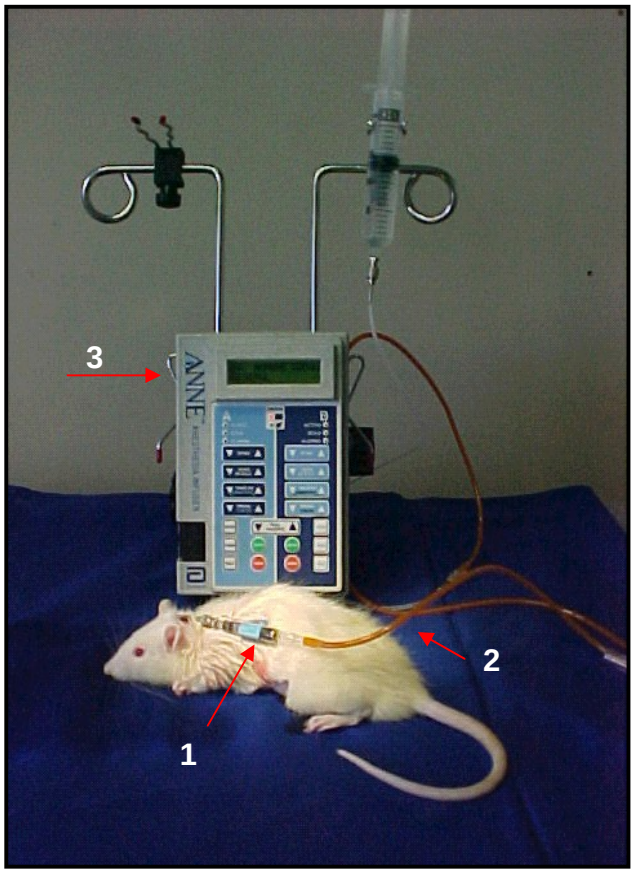


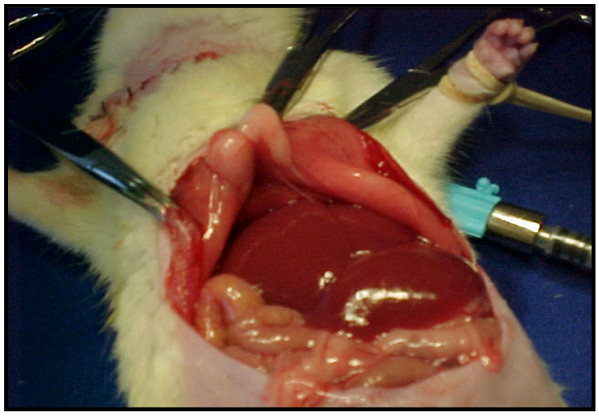
Figura 3. Animal após recuperação do procedimento cirúrgico, com esquema de NP para ratos montado.



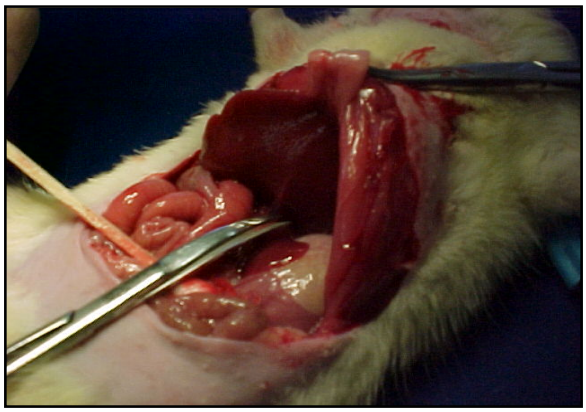
(1) dispositivo para livre rotação *swivel*;
(2) Esquema de NP = cateter de polietileno;
(3) Bomba de infusão.

Figura 4: Hepatectomia Parcial

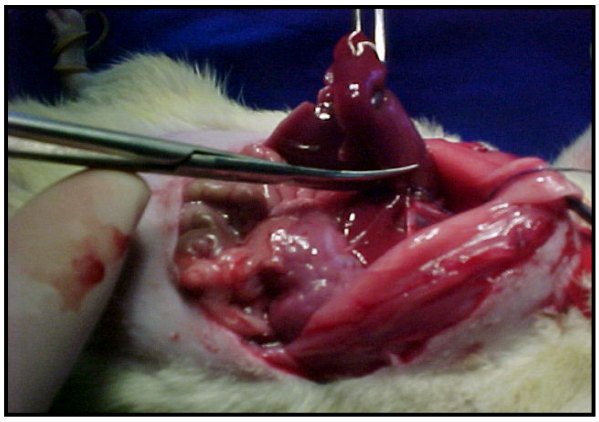
a.



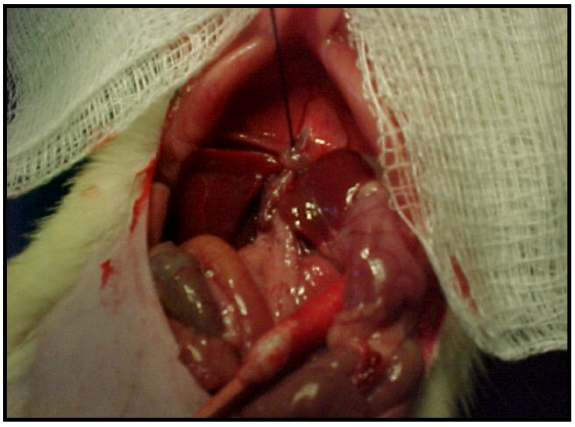
b.



c.



d



(a). Incisão subcostal bilateral com visualização dos lobos hepáticos;
(b). Remoção dos ligamentos gastro-hepáticos;
(c). Ressecção dos lobos mediano e lateral esquerdo;
(d). Ligamento do pedículo hepático com visualização dos lobos lateral direito e apêndice.

3.3.3. Grupos Experimentais e Controles

Para compor os grupos experimentais, 40 ratos previamente classificados como nutridos ou desnutridos, foram distribuídos de forma randomizada, logo após os procedimentos cirúrgicos para receber solução de NP administrada durante o período de tratamento, suplementada com dipeptídio L-alanil-L-glutamina (Ala-Gln) ou com solução de alanina mais prolina (Ala+Pro), conforme quadro 1.

Outros 12 ratos foram classificados de forma randomizada para compor os grupos controles. Os animais dos grupos controle nutrido (N-Controle) e desnutrido (D-Controle), não foram submetidos ao estresse cirúrgico decorrente da hepatectomia e cateterização venosa para serem utilizados como padrão fisiológico.

Quadro 1: Denominação dos grupos de acordo com o estado nutricional, dieta via oral ou solução de NP administrada.

Grupos Experimentais	Estado Nutricional	Número de Animais	Nutrição
N-Gln	Nutrido	10	Solução de NP padrão + dipeptídio **L-alanil-L-glutamina**
D-Gln	Desnutrido	10	Solução de NP padrão + dipeptídio **L-alanil-L-glutamina**
N-Pro	Nutrido	10	Solução padrão + solução neutra à base de **alanina mais prolina**
D-Pro	Desnutrido	10	Solução padrão + solução neutra à base de **alanina mais prolina**
N-Controle	Nutrido	06	Dieta **normocalórica e normoprotéica** via oral
D-Controle	Desnutrido	06	Dieta **hipocalórica e hipoprotéica** via oral
TOTAL	_	**52**	_

3.3.4. Nutrição pós-operatória.

3.3.4.1. Regime de nutrição parenteral

Os animais que compõe os grupos experimentais foram submetidos imediatamente após os procedimentos cirúrgicos, à Nutrição Parenteral (NP), regime glicídico 188 Kcal/Kg/dia e 1,12 g N/Kg/dia, durante 96 horas (Yamaguchi et al., 1997). Os grupos experimentais N-Gln e D-Gln receberam solução de NP suplementada com o dipeptídio L-Alanil-L-Glutamina, enquanto os outros grupos experimentais N-Pro e D-Pro receberam solução de NP isocalórica e isonitrogenada suplementada com solução neutra de alanina mais prolina especialmente produzida para este fim. Os grupos controles N-Controle e D-Controle não foram submetidos a hepatectomia parcial nem a infusão parenteral de aminoácidos. Os quadros 02 e 03 demonstram composição da solução parenteral total enriquecida com o dipeptídio L-Alanil-L-Glutamina ou com a solução neutra de alanina mais prolina.

Quadro 2: Composição da fórmula de NP, dipeptídio de glutamina (Ala-Gln) e solução de alanina mais prolina (Ala+Pro) utilizados. Concentrações expressas em g/L.

COMPOSIÇÃO	**kcal/ 1000 mL**	**volume (mL)**	**gramas/ 1000 mL**
Soro glicosado a 50%	968	484	242
Soro glicosado a 75%	324	108	81
Solução padrão de aminoácidos a 10% Aminosteril*	_	385	38,5
Solução de dipeptídio Ala-Gln** a 20% *ou*	_	48,0	9,6
Solução de Ala+Prl*** 20%	_	40,0	8,0
Gluconato de Cálcio a 10%	_	6,5	0,65
KCl a 19,1%	_	2,0	0,38
NaCl a 30%	_	6,0	1,8
Solução B – K_2HPO_4 a 25%	_	8,5	2,04
Total da NP	**1292**	**1000**	**366,37**

Nota: Concentração final da solução - 1,29 kcal/mL

***** B. Braun; ****** Fresenius-Kabi do Brasil; ******* Farmoterápica

Quadro 3: Composição da solução de aminoácidos e dipeptídios utilizados nos grupos experimentais e controles. Concentrações expressas em g/L da solução de nutrição parenteral (NP).

PRODUTO	**COMPOSIÇÃO**	
Aminosteril 10% - Fresenius ®	**Grupo Ala-Gln**	**Grupo Ala-Pro**
Aminoácidos essenciais		
L-Isoleucina	3,85	3,85
L-Leucina	5,70	5,70
L-Lisina	5,08	5,08
L-metionina	3,31	3,31
L-Fenilalanina	3,93	3,93
L-Treonina	3,39	3,39
L-Triptófano	1,54	1,54
L-Valina	4,77	4,77
Aminoácidos semi-essenciais		
L-Arginina	9,24	9,24
L-Histidina	2,31	2,31
Aminoácidos não-essenciais		
Glicina	10,78	10,78
L-Alanina	11,55	11,55
L-Prolina	11,55	11,55
Carboidratos		
Ácido acético	6,17	6,17
Dipeptiven 20% - Fresenius® Aminoácidos		
L-Alanina	3,94	-
L-Glutamina	6,46	-
Alanil+Prolina 20% - Farmoterápica Aminoácidos		
L-Alanina	-	4,88
L-Prolina	-	6,32
Total de aminoácidos	**110,4**	**111,2**
Concentração total de nitrogênio	**18,22**	**18,35**
Total de calorias (kcal/L)	**441,6**	**444,80**

3.3.5. Sacrifício.

No quarto dia do pós-operatório todos os animais dos grupos experimentais foram anestesiados por meio de injeção intraperitoneal de 100 mg/kg de peso corpóreo de cloridrato de ketamina (Ketalar® - Parke-Davis, uk).

Em seguida realizou-se laparotomia mediana para inspeção da cavidade abdominal e averiguação de possíveis alterações hepáticas macroscópicas como áreas necrosadas ou fibrosadas. Após ligadura das veias porta, cava inferior e superior, procedeu-se ressecção do fígado remanescente utilizando-se instrumentos, campo cirúrgico e equipamentos estéreis. Com auxílio de um bisturi amostras do tecido hepático foram colhidas e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido, acondicionadas em frascos criogênicos devidamente etiquetados e armazenadas em freezer a – 70ºC. Posteriormente realizou-se extração de RNA total e identificação da expressão gênica do HGF, TGF-α, IL-6, e enzima timidina quinase por RT-PCR.

Após período de adaptação e alimentação com dieta oral específica para cada grupo durante 10 dias, os animais foram anestesiados e submetidos a laparotomia para obtenção de amostras hepáticas em condições fisiológicas.

3.4. Biologia molecular.

3.4.1. Extração de RNA total

A extração do RNA total do remanescente hepático de todos animais que compuseram o experimento foi realizada seguindo-se método descrito por Chomczynski e Sacchi (1987). Inicialmente pesou-se aproximadamente 0,15 g de cada amostra do remanescente hepático, sempre utilizando nitrogênio liquido para proceder a extração de acordo com o protocolo descrito no item 3.4.1.1. Posteriormente, realizou-se a transformação dos valores de RNA obtidos com auxílio do espectofotometro e expressos em μg/mL para μg/mg de tecido hepático, por meio da equação:

$$\text{Teor de RNA hepático} = \frac{\text{Cc da amostra RNA x volume final}}{\text{mg de tecido analisado}}$$

Onde:

Cc = concentração da amostra de RNA total (μg/μL).

3.4.1.1. Protocolo para extração do RNA total

1. Separar o tecido hepático reservado no Freezer –70ºC e pesar uma amostra de aproximadamente 0,15 g.
2. Pulverizar o tecido utilizando Termovax e Nitrogênio líquido;
3. Colocar o pó nos tubos contendo 200μl de solução D e homogeneizar por inversão;
4. Acrescentar 200 μl de Acetato de Na 2,0M (pH: 4,0 – 4,6);
5. Acrescentar 200 μl de fenol saturado (pH:5-6);
6. Acrescentar 500 μl de Clorofórmio isoamílico (49:1);
7. Manter no gelo picado por 15 minutos;
8. Centrifugar por 20 minutos a 10.000 RPM;
9. Retirar o sobrenadante e transferir a fase aquosa para novos tubos;
10. Acrescentar 2ml de Álcool isopropílico;
11. Colocar por 60 minutos no freezer -20ºC;
12. Centrifugar 20 minutos a 10.000 RPM;
13. Desprezar o sobrenadante, preservando o *pellet*;
14. Adicionar 300μl de solução D e 300μl de álcool isopropílico;
15. Deixar “overnight” no freezer à – 20ºC;
16. Transferir o conteúdo para “eppendorfs”;
17. Centrifugar 10 minutos a 10.000 RPM;
18. Desprezar o sobrenadante;

19. Acrescentar 300μl de etanol a 75%;
20. Centrifugar 10 minutos à 10.000 RPM;
21. Desprezar o sobrenadante;
22. Ressuspender o *pellet* no próprio “eppendorf” com H_2O Q autoclavada acrescida de SDS (0,1%);
23. Realizar leitura da concentração de RNA total com auxílio do espectofotometro e realizar corrida eletroforética em gel de agarose, para visualização da integridade do RNA;
24. Reservar no freezer –70ºC;
25. Tabulação e análise dos dados.

3.4.2. Tratamento das amostras de RNA.

Em seguida, procedeu-se ao tratamento enzimático para purificação de todas as amostras de RNA, seguindo-se o protocolo esquematizado no quadro 4 (Maniatis et al.,1989).

Quadro 4: Protocolo para tratamento de RNA

Reagentes e amostras	Quantidades
Tris HCL 1M	2,0 μl
$MgCl_2$ α100	3,0 μl
DNAse pura I	1,0 μl
Água	Suficiente para alcançar 50 μl
Amostra de RNA	1,0 μl

1. Adicionar em tubos “eppendorfs” os reagentes e amostra de RNA a ser tratado, obedecendo-se à ordem dos componentes dispostos no quadro 4.
2. Permanecer uma hora no banho Maria à 37ºC;
3. Adicionar 5,0 μl de acetato de sódio 2M e 125 μl de etanol absoluto;
4. Permanecer “overnight” para precipitar a – 20ºC;

5. Centrifugar as amostras por 30 minutos a 10.000 RPM em centrífuga refrigerada;
6. Desprezar o sobrenadante e acrescentar 200 μl de etanol 75% e centrifugar por 20 minutos à 10.000 RPM;
7. Desprezar o sobrenadante, secar o excesso de álcool na Sarvant (à vácuo);
8. Ressuspender as amostras em 20 μl de água deidonizada e autoclavada;
9. Reservar no Freezer – 70ºC.

3.4.3. Reação em Cadeia por Polimerase via Transcriptase Reversa (RT-PCR)

Para desenvolver as reações de RT-PCR utilizou-se o "kit Superscript one-step RT-PCR with Platinum® *Taq*", desenvolvido pela Life TECHNOLOGIES. O protocolo encontra-se esquematizado no quadro 5. Este kit permitiu realizar de uma só vez as reações de síntese de DNA complementar (cDNA) utilizando-se a enzima transcriptase reversa (RT) e amplificação das seqüências estudadas por meio da enzima DNA polimerase (PCR), com a utilização de oligonucleotídios ou *primers*, previamente elaborados.

Quadro 5: Protocolo Padrão de RT-PCR, com utilização do ”Superscript one-step”

Reagentes	Volume (μl)
Tampão de reação (“2xreact”)	25 μl
“Sense Primer”	0,5 μl
“Anti-sense Primer”	0,5 μl
Enzima RT-Taq	1,0 μl
Amostra de RNA estudada	1 μg em relação a concentração da amostra
H_2O livre de RNA	Até atingir volume de 50 μl

O referido protocolo foi elaborado em “eppendorfs” previamente identificados, como “mixs” individuais correspondentes aos oligonucleotídios estudados. Tomou-se o cuidado de administrar as enzimas Transcriptase Reversa e *Taq*-Polimerase por último, para evitar denaturação das mesmas. Em seguida distribuiu-se individualmente as amostras analisadas e os “mixs” contendo os reagentes em “eppendorfs” com capacidade para 100 μl e amplificar no ciclador térmico Perck Elmer® (Modelo 9600).

Após padronização das condições das reações de RT-PCR para os genes HGF, TGF-α e timidina quinase, tentou-se padronizar as condições da reação de RT-PCR para a IL-6.

A tentativa de padronização das condições das reações de RT-PCR para IL-6, envolveu realização de várias reações com diferentes "primers", 2 amostras selecionadas de forma randomizada de cada grupo experimental, e variações programadas da temperatura de denaturação, "anneling" e extensão,

número de ciclos e concentração de sulfato de Magnésio de acordo com a literatura especializada, numa tentativa de visualização do produto estudado.

Foi necessário desenvolver experimentos para indução de septicemia, condição onde ocorre super-expressão da IL-6, para obtenção de controles positivos e facilitar a padronização das reações desta citocina. A especificidade dos oligonucleotídios foi confirmada realizando-se reações de RT-PCR com amostras de RNA provenientes do baço de ratos sépticos e do remanescente hepático dos animais experimentais, no mesmo experimento.

Experimento para indução de septicemia:

Realizou-se a indução de "sépse" em 02 animais por meio de laparotomia, punção do ceco com agulha de grosso calibre e contaminação da cavidade abdominal com fezes. Posteriormente realizou-se anastomose intestinal, sutura da cavidade abdominal e re-alimentação com dieta oral por 48 horas (O'Leary et al., 2001). O sacrifício foi realizado após este período com remoção do baço para extração e purificação do RNA total para estudo da expressão gênica da IL-6. A extração, purificação do RNA do tecido estudado e realização das reações de RT-PCR foram realizadas de acordo com protocolo previamente descrito.

As amostras de RNA provenientes do baço de animais sépticos foram utilizadas para identificação da expressão gênica da IL-6 e usadas como controle positivo das reações.

A quantidade de ciclos de amplificação, temperatura das reações de denaturação, agrupamento (*annealing*) e extensão das moléculas de c-DNA dos genes estudados, encontram-se esquematizadas no quadro 6. No quadro 7, encontram-se disponíveis as seqüências dos oligonucleotídios utilizados no presente estudo.

Quadro 6: Condições das reações de RT-PCR

Substância	Ciclos de amplificação	Temperatura das Reações		
		Denaturação	Agrupamento "Annealing"	Extensão
HGF-α	26	94ºC	60ºC	72ºC
TGF	22	94ºC	55ºC	72ºC
TK	28	94ºC	60ºC	72ºC
IL-6	30	94ºC	62ºC	72ºC

Quadro 7: Seqüência dos oligonucleotídios e tamanho dos produtos esperados da PCR. Incluir seqüência β-microglobulina

cDNA amplificado	Seqüência dos "primers" 5' → 3'	Tamanho do Produto (pb)
HGF*	CCC GGT GCT GCA GCA TGT CCT TCC CCT CGA GGA TTT CGA CAG	530
TGF-α*	GAC AAG TTG AAC AAG AAC CTC CGT CAT CCA CCT AAT ACA TAA G	250
IL-6**	ACA GCG ATG ATG CAC TGT CAG ATG GTC TTG GTC CTT AGC CAC	337
Timidina quinase (TK)*	GCA GAT CCA GGT GAT TCT CG ATC GAT GCC AAT GAC AGC CA	234

Ref: * Masson et al., 1999a; ** Demetris et al., 1997;

Em seguida, procedeu-se corrida eletroforética em gel de agarose para posterior semi-quantificação dos produtos amplificados por meio de densitometria e comparação dos resultados obtidos.

3.5. Análise Estatística.

Para a análise dos resultados obtidos utilizaram-se testes não paramétricos, levando-se em consideração a natureza de distribuição das variáveis estudadas. Fixou-se em 0,05 ou 5% ($\alpha \leq 0,05\%$) o nível de rejeição da hipótese de nulidade, assinalando-se com um asterisco (S*) os valores significantes.

1- Análise de Variância por postos de Kruskal-Wallis complementada pelo teste de comparações múltiplas (Siegel e Castellan, 1988), para comparar os subgrupos em cada um dos grupos estudados e para cada variável pesquisada.

2- Teste de Mann-Whitney (Siegel e Castellan, 1988), para comparar ratos nutridos com ratos desnutridos em cada subgrupo, para cada variável estudada.

RESULTADOS

4. Resultados.

4.1. Teor de RNA total do remanescente hepático.

O teor de RNA total, sempre expresso em μg/mg de tecido hepático, foi menor nos grupos experimentais nutridos (N-Gln e N-Pro) após hepatectomia parcial em relação ao teor de RNA encontrado no fígado intacto dos animais nutridos controles sem hepatectomia (N-Controle), independente da suplementação da fórmula parenteral com alanina ou prolina (0,75 e 0,63 < 1,67), conforme tabela 2, figuras 5 e 6. Resultados estatisticamente significativos $p < 0,05$.

Os animais do grupo nutrido com glutamina (N-Gln=0,75) obtiveram maior teor de RNA total do remanescente hepático do que os animais do grupo nutrido com prolina (N-Pro=0,63). Resultados estatisticamente significativos com $p < 0,05$, conforme demonstrado na tabela 2, figuras 5 e 6.

No grupo controle nutrido (N-Controle) o teor de RNA total foi superior a do grupo controle desnutrido (D-Controle) {1,67 > 1,10 ($p < 0,05$)}.

A administração de NP suplementada com alanina mais prolina nos animais desnutridos (D-Pro) aumentou o teor do RNA total neste grupo em relação aos grupos nutridos com prolina (N-Pro), desnutrido com glutamina D-Gln e D-Controle, respectivamente (3,18 > 0,63; 0,93 e 1,10), conforme tabela 2, figuras 5 e 6. Resultados estatisticamente significativos $p < 0,05$.

Tabela 1: Teor de RNA total do remanescente hepático de ratos nutridos e desnutridos submetidos a hepatectomia parcial (HP) e NP enriquecida com Ala-Gln ou Ala+Pro, comparados com controles não hepatectomizados. Valores expressos em μg/mg de tecido hepático.

Grupos Experimentais	RNA Total	
	Média ±DP	Máximo após 96 h da HP
N-Gln	0,94 ± 0,36	54%
N-Pro	0,56 ± 0,20	32%
N-Controle	1,73 ± 0,51	100%
D-Gln	0,98 ± 35	94%
D-Pro	2,58 ± 1,39	248%
D-Controle	1,04 ± 0,37	100%

Tabela 2: Teor de RNA total do remanescente hepático de ratos nutridos e desnutridos submetidos a hepatectomia parcial e NP suplementada com Ala-Gln ou Ala+Pro, comparados com controles nutridos e desnutridos não hepatectomizados. Valores expressos em μg/mg de tecido hepático.

	NUTRIDO (N)			DESNUTRIDO (D)		
Nº	**N-Gln**	**N-Pro**	**N-Controle**	**D-Gln**	**D-Pro**	**D-Controle**
1	0,55	0,90	1,67	0,77	3,18	1,07
2	0,50	0,63	2,50	1,37	3,44	0,60
3	1,25	0,53	1,43	1,10	4,07	1,13
4	0,65	0,30	1,27	1,53	4,26	1,42
5	1,40	0,65	1,03	0,53	3,18	0,43
6	1,50	0,38	2,40	0,93	0,76	1,52
7	1,08	0,65	1,80	0,60	1,02	1,10
8	0,75	0,75			0,76	
9	0,75	0,30				
Mediana	**0,75**	**0,63**	**1,67**	**0,93**	**3,18**	**1,10**

Teste de Mann-Whitney U crítico = 37 $p < 0,05$

1. Glutamina x Prolina:

N-Gln > N-Pro **S** (U calculado =17) p = 0,04*
D-Pro > D-Gln **S** (U Calculado = 13) p = 0,02*

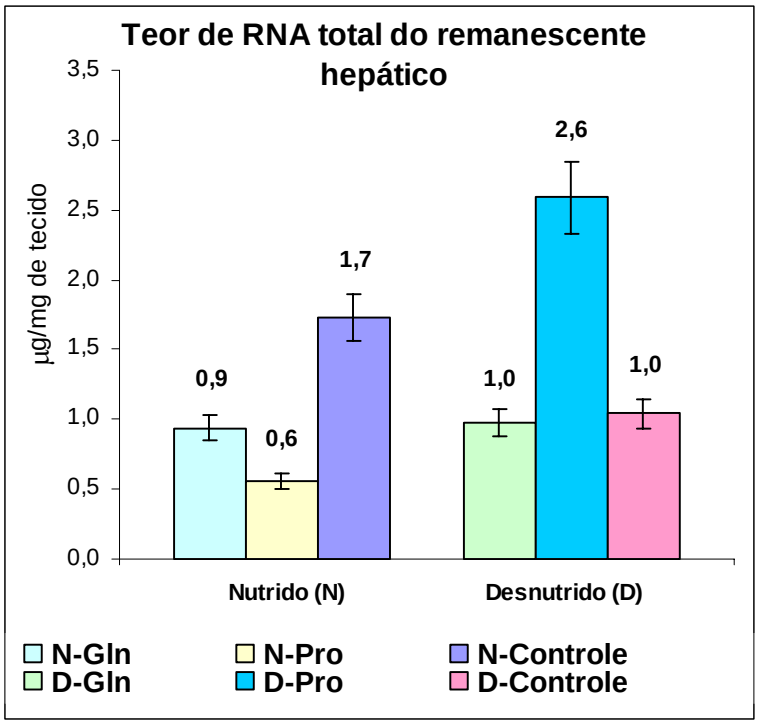
2. Hepatectomizado x Não hepatectomizado:

N-Gln < N-Controle **S** (U Calculado = 7,0) p = 0,05*
N-Pro < N-Controle **S** (U Calculado = 1,0) p = 0,001*
D-Gln x D-Controle **NS** (U Calculado = 22) p = 0,07
D-Pro > D-Controle **S** (U Calculado = 15,0) p = 0,01*

3. Nutrido x Desnutrido:

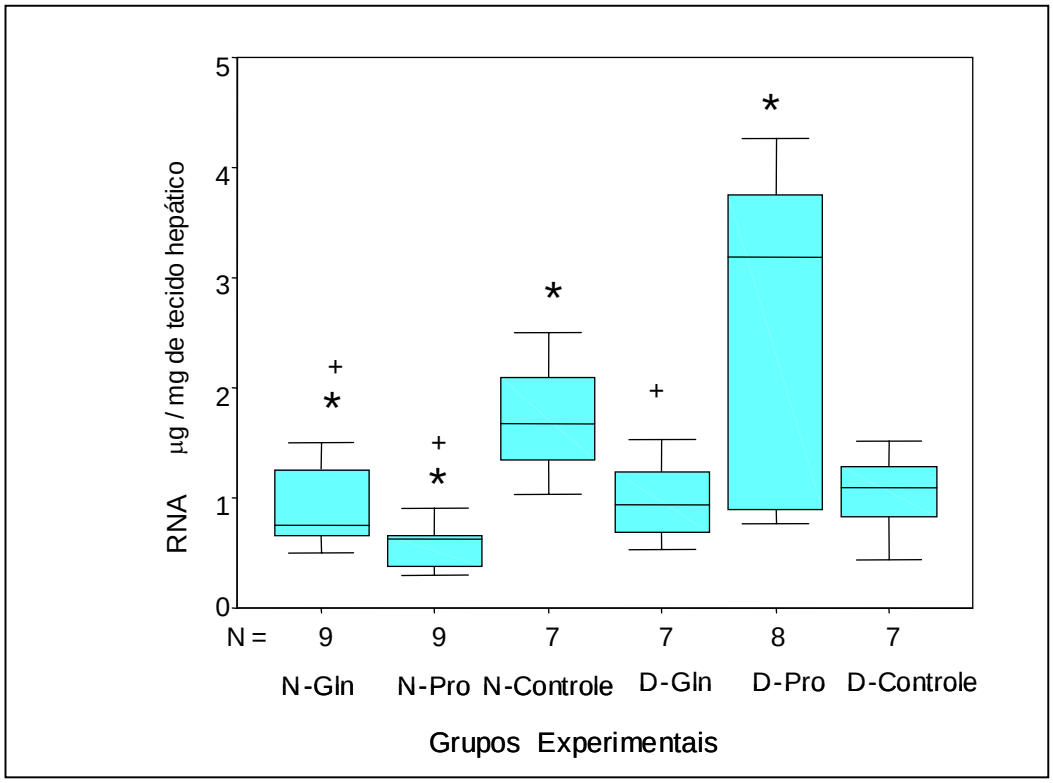
N-Gln x D-Gln **NS** (U Calculado = 28,0) p = 0,7
D-Pro > N-Pro **S** (U Calculado = 2,0) p = 0,001*
N-Controle > D-Controle **S** (U Calculado = 8,0) p = 0,03*

Figura 5: Teor de RNA total do remanescente hepático de ratos nutridos e desnutridos submetidos a hepatectomia parcial e NP suplementada com Ala-Gln ou Ala+Pro, comparados com controles nutridos e desnutridos não hepatectomizados. Valores expressos em μg/mg de tecido hepático.



N=Nutrido; D=Desnutrido; Gln=Glutamina; Pro=Prolina.
Resultados: Média e DP

Figura 6: Teor de RNA total do remanescente hepático de ratos nutridos e desnutridos submetidos a hepatectomia parcial e NP suplementada com Ala-Gln ou Ala+Pro, comparados com controles nutridos e desnutridos não hepatectomizados. Valores expressos em μg/mg de tecido hepático.



Nota: Caixas: percentis 25º, 50º e 75º; Barras: percentis 10º e 90º; o valores do "outlier": (1,5 a 3 extensões da caixa para o percentil 75º); # valores extremos (> 3 extensões da caixa para o percentil 75º).

Teste de Mann-Whitney

* **Em relação aos grupos controles sem HP: p<0,05**
N-Gln e N-Pro < N-Controle
D-Gln = D-Controle
D-Pro > D-Controle
N-Controle > D-Controle

\+ **Em relação aos grupos experimentais: p<0,05**
N-Gln > N-Pro
N-Pro < D-Pro
N-Gln = D-Gln
D-Gln < D-Pro

4.2. Reações de RT-PCR.

Os presentes resultados foram obtidos por meio das reações de RT-PCR para identificação da transcrição dos genes estudados (IL-6, HGF, TGF-α e timidina quinase - TK), envolvidos na regeneração hepática de ratos nutridos e desnutridos submetidos a hepatectomia parcial, conforme mostra a tabela 3.

Observou-se maior expressão gênica do HGF no grupo D-Gln em relação ao grupo D-Controle {0,31>0,23 ($p<0,05$)} e no grupo desnutrido com NP suplementada com prolina (D-Pro=0,46) em relação aos grupos: nutrido suplementado com prolina (N-Pro=0,33), desnutrido suplementado com glutamina (D-Gln=0,31) e controle fisiológico desnutrido sem hepatectomia (D-Controle=0,23), conforme mostra a tabela 5 e figura 10. ($p<0,05$).

Ao se comparar os valores da expressão gênica do HGF, TGF-α e TK, considerando apenas o estado nutricional, verificou-se aumento da expressão gênica do HGF no grupo desnutrido experimental (D-Experimental=0,44) em relação ao grupo nutrido experimental (N-Experimental=0,27) e ao grupo controle desnutrido sem hepatectomia (D-Controle=0,23), conforme tabela 7 e figura 10 com $p<0,05$. Já para o grupo N-Experimental verificou-se inversão desta relação, pois neste grupo a expressão gênica do HGF foi inferior ao seu respectivo controle sem hepatectomia (N-Controle). {0,27<0,48 ($p<0,05$)}. Verificou-se ainda maior expressão do HGF no grupo N-Controle, em relação

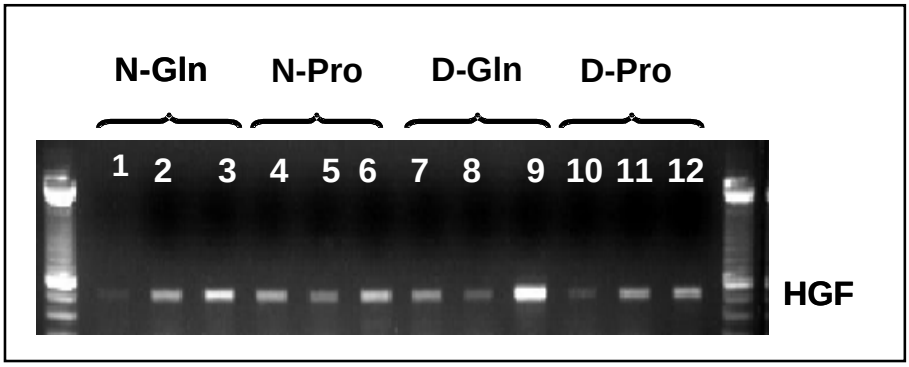
ao D-Controle. Estes resultados encontram-se apresentados na tabela 7 e figura 12.

Não ocorreram diferenças significativas da expressão gênica de TGF-α e timidina kinase nos diferentes grupos experimentais do presente trabalho, conforme tabelas 4 e 6, figuras 8 e 11.

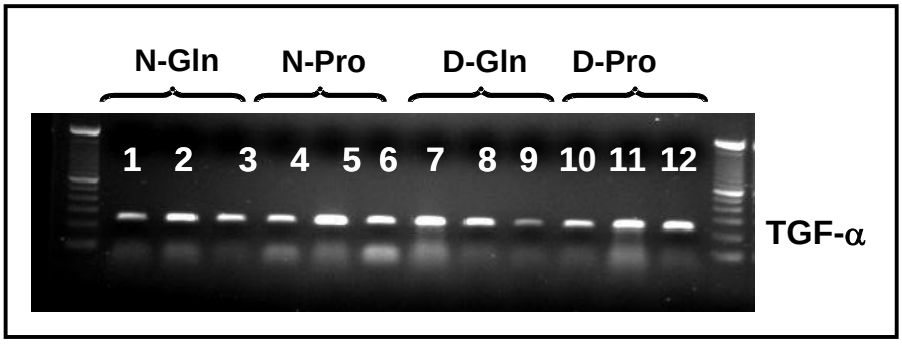
Não se detectou a expressão gênica da IL-6 nas amostras do remanescente hepático dos grupos experimentais 96 horas após hepatectomia parcial, conforme demonstra a figura 7D. Observou-se na mesma reação de RT-PCR, presença de amplificação da IL-6 nas amostras de RNA obtidas de baço de ratos sépticos e ausência de amplificação da IL-6 nas amostras de RNA proveniente do remanescente hepático 96 horas após hepatectomia parcial. (Figura 7D).

Figura 7: Análise semi-quantitava por RT-PCR de fatores de crescimentos, Interleucina 6 (IL-6) e timidina quinase (TK) de ratos nutridos e desnutridos após hepatectomia parcial. A: hepatocyte growth factor (HGF); B: Transforming growth factor-alfa (TGF-α); C: Timidina quinase (TK); D: Interleucina-6; E: β_2Microglobulina (β_2MG);

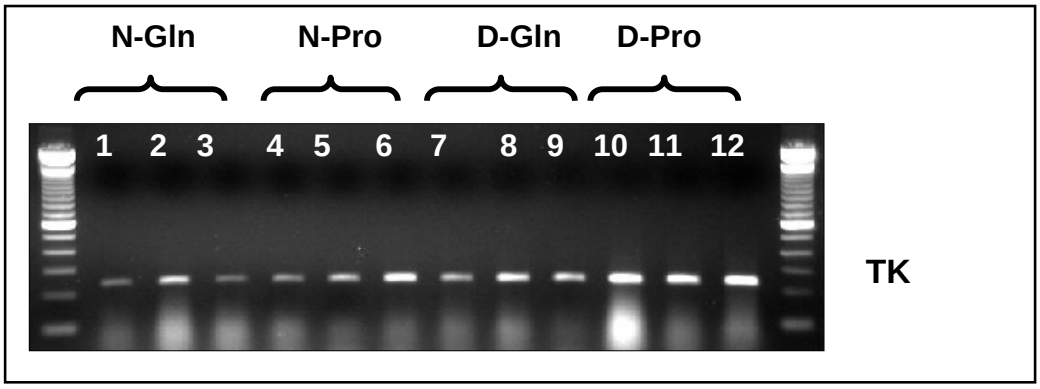
A



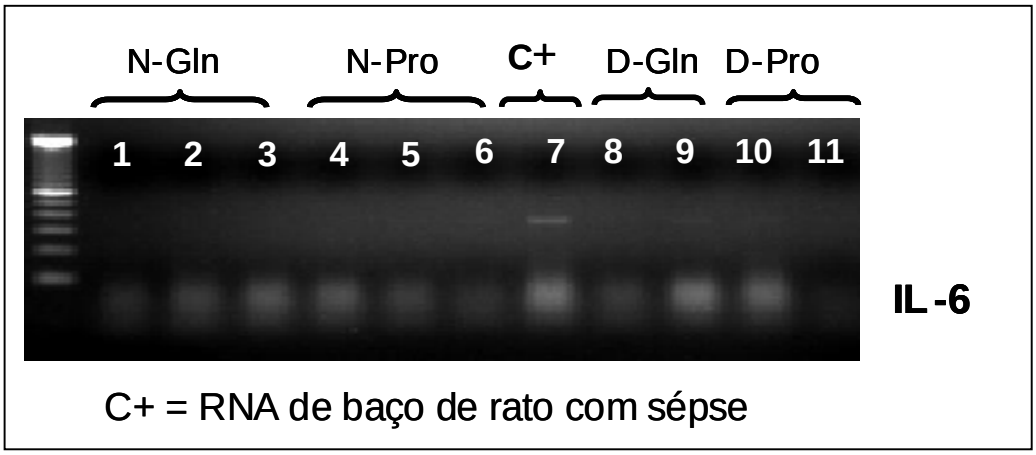
B



C


N-Gln
N-Pro
D-Gln
D-Pro
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
TK

D


N-Gln
N-Pro
C+
D-Gln
D-Pro
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11
IL-6
C+ = RNA de baço de rato com sépse

E

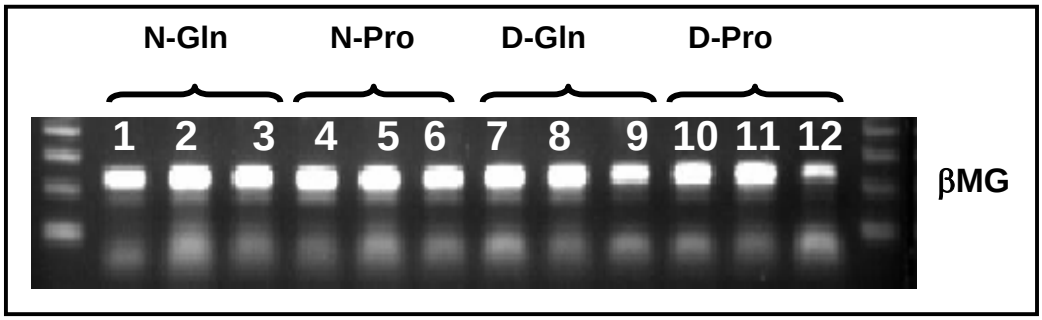

N-Gln
N-Pro
D-Gln
D-Pro
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
βMG

Tabela 3: Valores da mediana da expressão gênica de HGF, TGF-α e timidina quinase (TK) no remanescente hepático de ratos nutridos e desnutridos com NP suplementada com Ala-Gln ou Ala+Pro, normalizada com $\beta_2$microglobulina (β_2MG). Resultados expressos em unidades arbitrárias (UA).

	Nutridos (N)			**Desnutridos (D)**		
Gene	**N-Gln**	**N-Pro**	**N-Controle**	**D-Gln**	**D-Pro**	**D-Controle**
TGF-α	0,39	0,43	0,54	0,48	0,62	0,42
HGF	0,26	0,33	0,48	0,31	0,45	0,23
TK	0,40	0,46	0,53	0,53	0,39	0,58

Tabela 4: Valores da expressão gênica do TGF-α, no fígado remanescente de ratos nutridos e desnutridos submetidos à hepatectomia parcial e NP suplementada com Ala-Gln ou Ala+Pro, comparados com Controles Nutridos e desnutridos não hepatectomizados. Resultados normalizados com $\beta_2$microglobulina (β_2MG) e expressos em unidades arbitrárias (UA).

	NUTRIDO (N)			**DESNUTRIDO (D)**		
Nº	**N-Gln**	**N-Pro**	**N-Controle**	**D-Gln**	**D-Pro**	**D-Controle**
1	0,61	0,67	0,25	0,67	0,85	0,60
2	0,85	0,32	1,67	0,53	0,81	0,54
3	0,85	0,20	1,51	0,44	0,28	0,00
4	0,02	1,18	1,49	0,70	0,67	0,52
5	0,86	0,69	0,49	0,24	0,71	0,26
6	0,39	0,53	0,54	0,19	0,50	0,31
7	0,27	0,22	0,36	0,48	0,41	
8	0,60	0,41		0,52	0,62	
9	0,39	0,46		0,28	0,60	
10	0,28	0,40		0,48	0,09	
11	0,37	0,33			0,79	
12	0,32	0,35				
13	0,51	1,58				
14		0,87				
Mediana	**0,39**	**0,43**	**0,54**	**0,48**	**0,62**	**0,42**

1. Análise de Variância por Postos de Kruskal-Wallis
(Ala-Gln x Ala-Prl x Controle)
H crítico = 5,99

Grupo Nutrido
H Calculado = 1,62
p=0,446
NS

Desnutrido
H Calculado = 3,88
p=0,144
NS

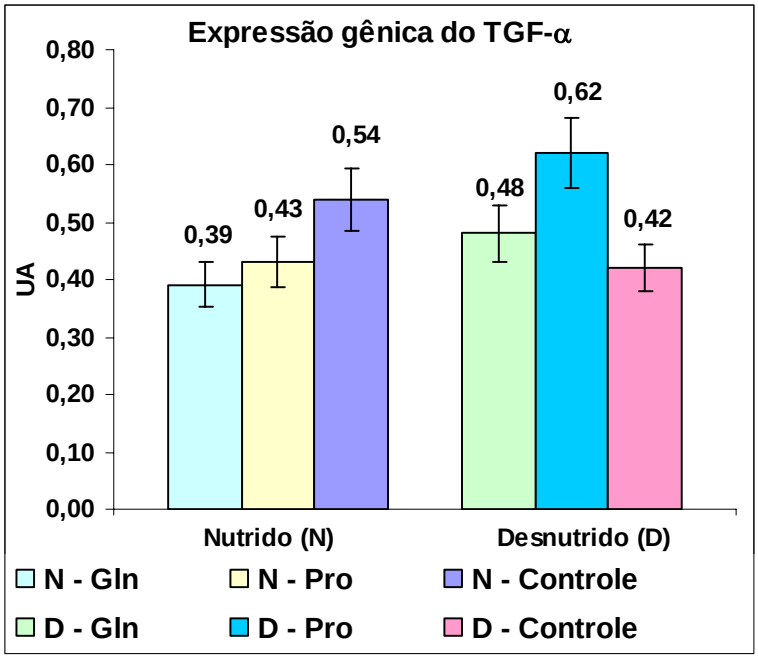
2. Teste de Mann-Whitney
(Nutrido x Desnutrido)
z Crítico = 1,96

L-alanil-L-glutamina
z Calculado = 0,25
NS

Alanina +Prolina
z Calculado = 0,66
NS

Controle
z Calculado = 1,14
NS

Figura 8. Valores da expressão gênica do TGF-α, no fígado remanescente de ratos nutridos e desnutridos submetidos à hepatectomia parcial e NP suplementada com Ala-Gln ou Ala+Pro, comparados com controles nutridos e desnutridos não hepatectomizados. Resultados normalizados com $\beta_2$microglobulina (β_2MG) e expressos em unidades arbitrárias (UA).



N=Nutrido; D=Desnutrido; Gln=Glutamina; Pro=Prolina
Test Mann-Whitney e Kruskal-Wallis (p>0,05).

Tabela 5: Valores da expressão gênica do HGF, no fígado remanescente de ratos nutridos e desnutridos submetidos a hepatectomia parcial e NP suplementada com Ala-Gln ou Ala+Pro, comparados com controles nutridos e desnutridos não hepatectomizados. Resultados normalizados com $\beta_2$microglobulina (β_2MG) e expressos em unidades arbitrárias (UA).

	NUTRIDO (N)			**DESNUTRIDO (D)**		
Nº	**N-Gln**	**N-Pro**	**N-Controle**	**D-Gln**	**D-Pro**	**D-Controle**
1	0,55	0,24	0,69	0,31	0,53	0,23
2	0,33	0,19	0,94	0,25	0,31	0,19
3	0,13	0,33	0,49	1,07	0,35	0,33
4	0,21	0,44	0,48	0,46	0,46	0,16
5	0,26	0,45	0,32	0,44	0,76	0,27
6	0,26	0,49	0,26	0,32	0,60	0,23
7	0,17	0,16		0,27	0,32	
8	0,33	0,16		0,20	0,44	
9	0,46	0,43		0,18	0,44	
10	0,23	0,49		0,91	0,53	
11	0,24	0,33			0,76	
12	0,47	0,25				
13	0,29	1,23				
Mediana	**0,26**	**0,33**	**0,48**	**0,31**	**0,46**	**0,23**

1. Análise de Variância por Postos de Kruskal-Wallis – H crítico = 5,99

Glutamina (Ala-Gln) x Prolina (Ala-Pro) x Controle (C-Nutrido e C-Desnutrido):

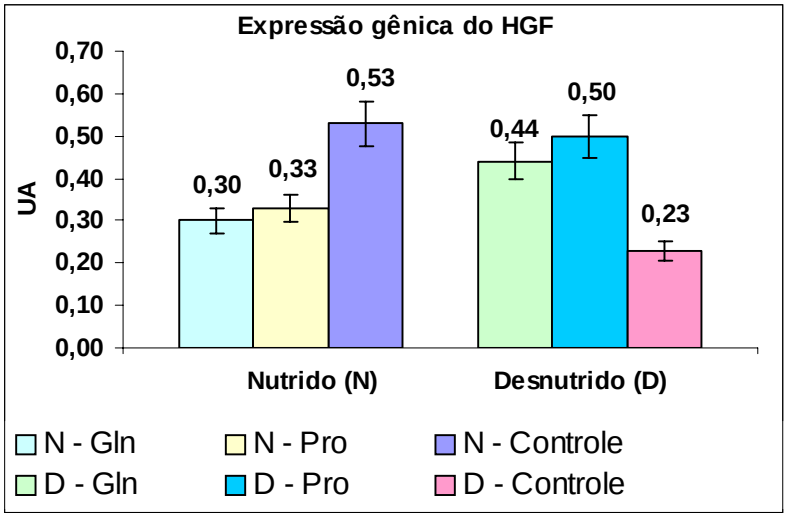
N-Gln < N-Controle	**S**	H Calculado = 6,83	p = 0,03*
N-Pro x N-Controle	**NS**	H Calculado = 3,19	p = 0,07
D-Gln > D-Controle	**S**	H Calculado = 9,79	p = 0,007*
D-Pro > D-Controle	**S**	H Calculado = 9,75	p = 0,002*
N-Gln x N-Pro	**NS**	H Calculado = 0,17	p = 0,68
D-Pro > D-Gln	**S**	H Calculado = 7,20	p = 0,04*

2. Teste de Mann-Whitney – p < 0,05 U crítico = 37

Nutrido x Desnutrido:

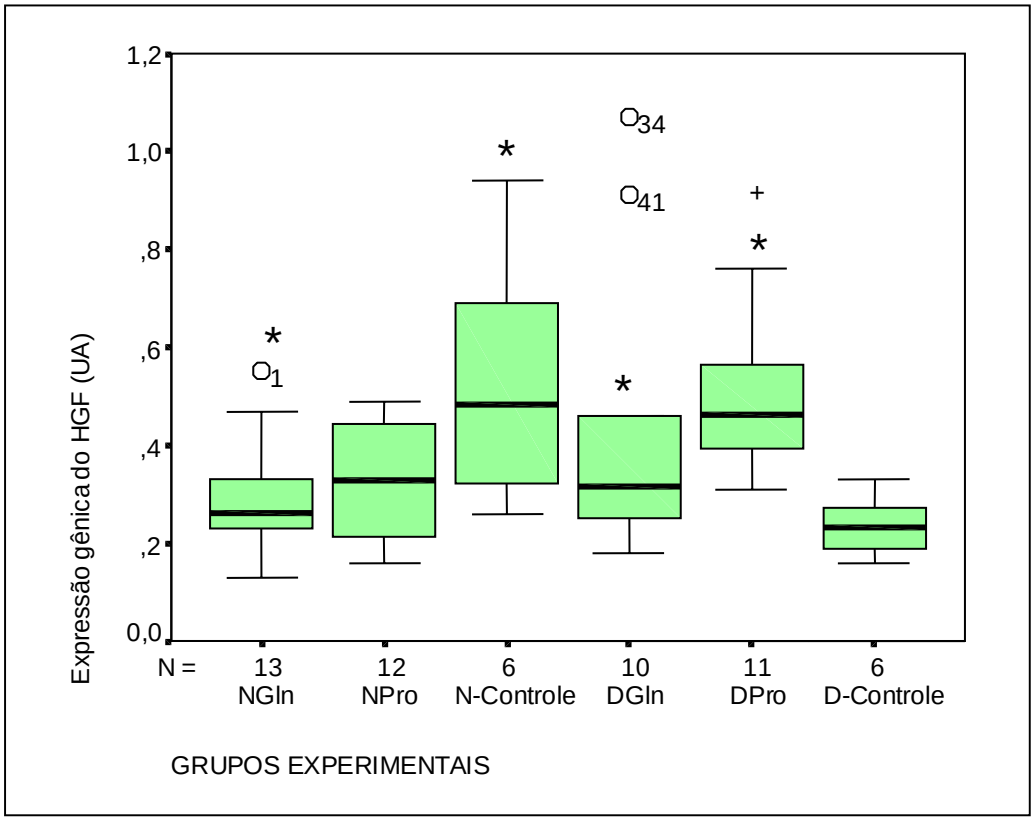
N-Gln x D-Gln	**NS**	U = 51,5	p = 0,40
D-Pro > N-Pro	**S**	U = 28	p = 0,019*
N-Controle > D-Controle	**S**	U = 3	p = 0,016*

Figura 9. Valores da expressão gênica do HGF, no fígado remanescente de ratos nutridos e desnutridos submetidos a hepatectomia parcial e NP suplementada com Ala-Gln ou Ala+Pro, comparados com controles nutridos e desnutridos não hepatectomizados. Resultados normalizados com $\beta_2$microglobulina (β_2MG) e expressos em unidades arbitrárias (UA).



N=Nutrido; D=Desnutrido; Gln=Glutamina; Pro=Prolina
Testes de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis ($p < 0,05$).

Figura 10. Valores da expressão gênica do HGF, no fígado remanescente de ratos nutridos e desnutridos submetidos a hepatectomia parcial e NP suplementada com Ala-Gln ou Ala+Pro, comparados com controles nutridos e desnutridos não hepatectomizados. Resultados normalizados com $\beta_2$microglobulina (β_2MG) e expressos em unidades arbitrárias (UA).



Nota: Caixas: percentis 25º, 50º e 75º; Barras: percentis 10º e 90º; o valores do "outlier": (1,5 a 3 extensões da caixa para o percentil 75º); # valores extremos (> 3 extensões da caixa para o percentil 75º).

Teste de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis

* **Em relação aos grupos controles sem HP: p<0,05**
N-Gln < N-Controle
N-Pro = N-Controle
D-Gln e D-Pro > D-Controle
N-Controle > D-Controle

\+ **Em relação aos grupos experimentais: p<0,05**
N-Gln = N-Pro N-Gln = D-Gln
D-Pro > N-Pro D-Pro > D-Gln

Tabela 6: Valores da expressão gênica da Timidina kinase (TK), no fígado remanescente de ratos nutridos e desnutridos submetidos a hepatectomia parcial e NP suplementada com Ala-Gln ou Ala+Pro, comparados com controles nutridos e desnutridos não hepatectomizados. Resultados normalizados com $\beta_2$microglobulina (β_2MG) e expressos em unidades arbitrárias (UA).

	NUTRIDO (N)			**DESNUTRIDO (D)**		
	N-Gln	**N-Pro**	**N-Controle**	**D-Gln**	**D-Pro**	**D-Controle**
	1,07	0,43	0,53	0,61	0,76	0,19
	0,37	0,23	0,64	0,86	0,67	0,12
	0,26	0,43	0,44	0,54	0,80	1,76
	0,32	0,42	0,42	0,38	0,70	0,19
	0,54	0,30	0,57	0,26	0,19	0,63
	0,41	0,76	0,62	0,53	0,12	
	0,30	0,52	0,53	0,45	0,22	
	0,24	0,35		0,64	0,34	
	0,99	1,12		0,31	0,67	
	0,64	0,50		1,11	0,31	
	0,57	0,73			0,39	
	0,64	0,62				
	0,18	0,99				
		0,18				
Mediana	**0,40**	**0,46**	**0,53**	**0,53**	**0,39**	**0,58**

1. Análise de Variância por Postos de Kruskal-Wallis p<0,05
(Ala-Gln x Ala-Pro x Controle)
H crítico = 5,99

Grupo Nutrido
H Calculado = 0,82
p=0,663
NS

Desnutrido
H Calculado = 1,26
p=0,533
NS

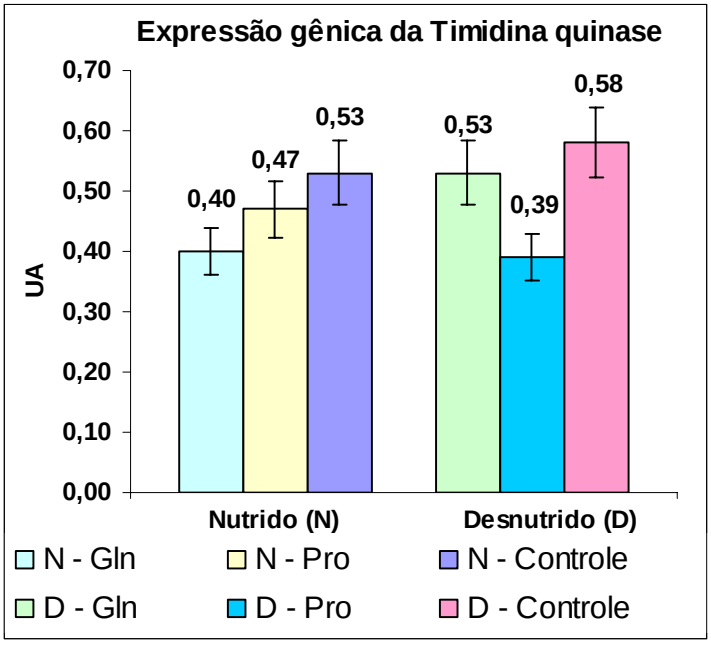
3. Teste de Mann-Whitney
(Nutrido x Desnutrido)
z Crítico = 1,96

L-alanil-L-glutamina
z Calculado = 0,74
NS

Alanina + Prolina
z Calculado = 0,60
NS

Controle
z Calculado = 0,73
NS

Figura 11. Valores da expressão gênica da Timidina kinase (TK), no fígado remanescente de ratos nutridos e desnutridos submetidos a hepatectomia parcial e NP suplementada com Ala-Gln ou Ala+Pro, comparados com controles nutridos e desnutridos não hepatectomizados. Resultados normalizados com $\beta_2$microglobulina (β_2MG) e expressos em unidades arbitrárias (UA).



Testes de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis (p>0,05).

N=Nutrido; D=Desnutrido; Gln=Glutamina; Pro=Prolina

Tabela 7: Valores da mediana da expressão gênica de HGF, TGF-α e timidina quinase (TK) no remanescente hepático de ratos nutridos e desnutridos submetidos a hepatectomia parcial (grupos experimentais) comparadas com controles sem hepatectomia (grupos Controles), normalizados com $\beta_2$microglobulina (β_2MG). Resultados expressos em unidades arbitrárias (UA).

	Nutrido (N)		**Desnutridos (D)**	
Genes	**N-Experimental**	**N-Controle**	**D-Experimental**	**D-Controle**
TGF-α	0,43	0,54	0,52	0,42
HGF	**0,27^{+} ***	**0,48***	**0,44^{+} ***	**0,23***
TK	0,49	0,53	0,53	0,58

Resultados estatísticos da expressão gênica do HGF

1. Análise de Variância por Postos de Kruskal-Wallis – $p < 0,05$

Nutrido Experimental (N-Gln + N-Pro) x Desnutrido Experimental (D-Gln + D-Pro) x Controle (C-Nutrido e C-Desnutrido):

N-Experimental < N-Controle $p = 0,04$
D-Experimental > D-Controle $p = 0,05$

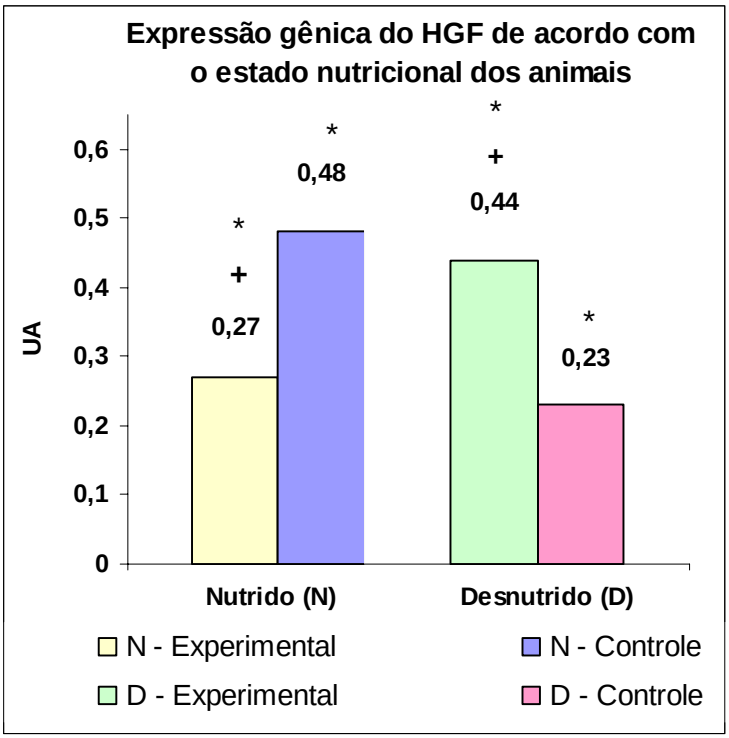
2. Teste de Mann-Whitney – $p < 0,05$

Nutrido x Desnutrido:

D-Experimental > N-Experimental $p = 0,02$
N-Controle > D-Controle $p = 0,05$

N-Experimental = N-Gln + N-Pro; D-Experimental = D-Gln + D-Pro; Gln=Glutamina; Pro=Prolina; N = Nutrido; D = Desnutrido

Figura 12. Valores da mediana da expressão gênica do HGF no remanescente hepático de ratos nutridos e desnutridos submetidos a hepatectomia parcial (grupos experimentais) comparadas com controles nutridos e desnutridos sem hepatectomia (grupos Controles), normalizada com $\beta_2$microglobulina (β_2MG). Resultados expressos em unidades arbitrárias (UA).



Testes de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis (p<0,05).

*** Em relação aos grupos controles sem HP:**
N-Experimental < N-Controle
D-Experimental > D-Controle
N-Controle > D-Controle

+ Em relação aos grupos experimentais:
D-Experimental > N-Experimental

N-Experimental = N-Gln + N-Pro; D-Experimental = D-Gln + D-Pro;
Gln=Glutamina; Pro=Prolina
Resultados apresentados como mediana dos valores

DISCUSSÃO

5. Discussão

5.1. Do modelo apresentado

O fígado tem uma capacidade regenerativa extremamente eficaz. Após remoção de aproximadamente 70% do parênquima hepático, ocorre intensa hipertrofia e hiperplasia compensatória até o remanescente atingir peso original em 7 a 10 dias. No entanto, a restauração da massa hepática se dá preferencialmente por hipertrofia dos hepatócitos periportais (Nagy et al., 2001).

Em animais nutridos já foi demonstrado que a suplementação da nutrição parenteral (NP) com dipeptídio L-alanil-L-glutamina (Ala-Gln) aumenta a taxa de regeneração hepática e concentração de DNA total do fígado (Ito e Higashiguchi, 1999; Yamaguchi et al., 1997, Yoshida et al., 1995).

Considerando que na prática clínica os pacientes submetidos a hepatectomia parcial geralmente estão desnutridos em decorrência da hepatopatia crônica (McCullough et al., 1998; Plauth et al., 1997; Capacci, 1996), nós idealizamos um modelo experimental para verificar se a administração de Ala-Gln na (NP) poderia alterar aspectos moleculares da regeneração hepática na condição de desnutrição.

5.2. Do teor de RNA total.

Amostras de RNA total nas células eucarióticas são compostas principalmente por RNA ribossômico (rRNA), com visualização das bandas 28S e 18S por meio de eletroforese corada com brometo de etídio (Palmer e Prediger, 2004). Considerando que o RNA total contém apenas 1 a 3% de RNA mensageiro (mRNA), o qual não é prontamente detectável (Palmer e Prediger, 2004), a concentração de RNA total reflete basicamente a quantidade de RNA ribossômico e portanto está relacionado intrinsecamente com síntese protéica.

A administração de aminoácidos livres regula a síntese hepática de proteína em ratos submetidos à inanição. A alanina, ornitina e prolina aumentam significativamente a agregação dos poliribossomos hepáticos existentes nesta condição. A alanina foi o aminoácido mais eficiente, promovendo agregação poliribossomal associado ao decréscimo do tempo de elongação da cadeia polipeptídica, indicando que alanina estimula a síntese de proteína hepática durante a privação alimentar (Perez-Sala et al., 1987).

O presente trabalho demonstrou que 96 horas após hepatectomia, a síntese de RNA total do remanescente hepático dos grupos nutridos experimentais (N-Gln e N-Pro), ainda não havia sido totalmente restabelecida em relação ao teor de RNA do fígado dos controles fisiológicos (sem hepatectomia), independente da adição de glutamina ou prolina. No entanto, observou-se grande tendência para aproximação dos valores basais (ver tabela

01) no grupo D-Gln e maior estímulo para a síntese de RNA total no grupo D-Pro, sugerindo que a adição de Ala-Gln e principalmente de Ala-Pro na NP pode favorecer o rápido restabelecimento do teor de RNA total do remanescente hepático após hepatectomia em animais desnutridos.

Desde que Carrillo et al., (1996) demonstraram que o teor de RNA total hepático foi maior em ratos jovens desnutridos em relação aos animais nutridos, obtivemos evidencias a respeito da possibilidade da regeneração hepática ocorrer de forma eficiente, mesmo em condição de desnutrição. Portanto, esperávamos que os valores referentes ao teor de RNA total no remanescente hepático fossem maiores nos dois grupos desnutridos, similarmente aos resultados demonstrados por Carrillo et al., (1996). No entanto, obtivemos resultados diferenciados, uma vez que o teor de RNA total do grupo D-Gln foi similar ao RNA total encontrado no N-Gln, enquanto no grupo suplementado com prolina o grupo desnutrido (D-Pro) obteve valores de RNA total muito superiores aos grupos: nutrido com prolina (N-Pro), desnutrido com glutamina (D-Gln) e desnutrido controle (D-Controle). (Tabela 2, Figuras 5 e 6).

Nossos resultados demonstraram que nos grupos desnutridos a suplementação da NP com prolina provavelmente favoreceu a síntese de RNA total durante o processo de regeneração hepática, talvez por acionar mecanismos compensatórios como maior absorção intestinal de prolina que resultam na economia de suprimentos energéticos e protéicos, para

proliferação, transcrição celular e síntese de proteínas (Waheed e Gupta, 1997).

Existe correlação direta entre a concentração plasmática de prolina na veia porta e captação hepática deste aminoácido. Watanabe et al., (1999), demonstraram experimentalmente que após 8 horas da ingestão via oral de dieta contendo 16% de proteína, verifica-se captação hepática de aproximadamente 93,3% da prolina existente no sangue portal. No entanto, quando os ratos recebem dieta deficiente em prolina, aproximadamente 50% deste aminoácido liberado pelo intestino para a veia porta, é captado pelo fígado, evidenciando que quando a concentração de prolina na veia porta aumenta ou reduz, o fígado também aumenta ou reduz a captação de prolina, respectivamente. Estes dados sugerem que o aproveitamento hepático da prolina pode ser eficiente mesmo quando sua disponibilidade no sangue portal é baixa (Watanabe et al., 1999), justificando provavelmente os melhores resultados referentes ao teor de RNA total, obtidos no grupo desnutrido com NP suplementada com a solução de alanina mais prolina da presente pesquisa.

Outro aspecto que devemos considerar para compreendermos este resultado, é que além da prolina estar amplamente distribuída nos tecidos corporais, ela corresponde à cerca de 20% da composição aminoacídica do colágeno (Adams, 1970). Além disso, a enzima responsável pelo estágio final da síntese de colágeno, Pirrolina-5-carboxilase, possui atividade hepática já comprovada (Herzfeld et al., 1977; Small e Jones, 1978) e foi demonstrado que

a síntese de colágeno, ocorre de forma constitutiva nos hepatócitos (Guzelian et al., 1981).

Portanto, o fato de obtermos maior concentração de RNA total no grupo D-Pro em relação ao grupo N-Pro, pode indicar maior capacidade de síntese protéica nos animais desnutridos submetidos a NP enriquecida com prolina. Neste sentido, podemos inferir que se a prolina está relacionada ao aumento do RNA total e se isso reflete síntese protéica, provavelmente este aminoácido poderia estar sendo utilizado na produção de colágeno e não necessariamente na proliferação celular dos hepatócitos remanescentes.

O fígado em regeneração é capaz de manter diversos ciclos de proliferação celular simultaneamente com as funções altamente especializadas dos hepatócitos (LaBrecque, 1994), devido a super-expressão simultânea de genes relacionados com crescimento e inflamação verificada durante esta fase (Kelley-Loughnane et al., 2002).

A administração de L-prolina e L-glutamina no fígado de ratos perfundidos libera nitrogênio sob a forma de íons de amônia (NH_4^+) para síntese de carbamil-P, molécula iniciadora do ciclo da uréia (Lehninger, Nelson, Cox, 2000; Bode e Nordlie, 1993). No entanto, a glutamina atua de forma mais eficiente que a prolina na ureagenese, pois uma molécula de L-glutamina pode fornecer adicionalmente ao ciclo da uréia, uma molécula de L-aspartato, enquanto a prolina pode fornecer apenas uma molécula de NH_4^+ para síntese de uréia ou uma molécula de aspartato para gliconeogênese (Bode e Nordlie, 1993).

Portanto, outra hipótese que poderia justificar o maior teor de RNA total nos grupos suplementados com prolina, baseia-se na possibilidade da glutamina ter sido desviada para manutenção de funções metabólicas essenciais como a eliminação normal da amônia produzida durante a regeneração hepática em detrimento da sua ação como substrato utilizável na síntese de purinas e pirimidinas (Lehninger, Nelson, Cox, 2000; Murray, 1994).

Nossos resultados demonstraram que 96 horas após a hepatectomia parcial, o teor de RNA total do remanescente hepático dos grupos nutridos experimentais (N-Gln e N-Pro) ainda não atingiu os valores basais, em relação ao fígado intacto dos animais controles nutridos indicando que há um período de intensa adaptação e reformulação molecular que persiste provavelmente por alguns dias. A identificação dos fatores genéticos envolvidos na resposta imediata ao trauma cirúrgico poderia ser útil para melhor compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na regeneração hepática.

5.3. Do Processo de Regeneração Hepática.

Após hepatectomia parcial, os genes que codificam a expressão de “proteínas de fase aguda” e gliconeogênese são rapidamente super-expressos para restaurar a homeostase metabólica e reparar o dano tecidual do remanescente hepático (Leu, 2001). A resposta celular imediata ao trauma cirúrgico é fundamental para induzir os hepatócitos para o ciclo celular (Xu et al., 2000).

Ocorre reprogramação da transcrição gênica após hepatectomia parcial que resulta na regeneração e desenvolvimento do fígado. Nesta fase ocorrem três padrões de expressão gênica: ativação de grupos de genes específicos para crescimento/inflamação e metabolismo; super-expressão de genes com função reguladora do crescimento hepático e resposta inflamatória e super-expressão de ciclinas e outras proteínas envolvidas no ciclo celular. A ativação de genes com função específica para as diferentes fases do desenvolvimento hepático, mostra a importância da manutenção da demanda metabólica durante o crescimento do órgão (Kelley-Loughnane et al., 2002). Por isso investigamos se a administração endovenosa de glutamina ou prolina poderia influenciar a expressão de genes envolvidos na regeneração hepática após a fase de resposta aguda ao trauma.

Por outro lado à quantidade e qualidade da proteína dietética pode influenciar o perfil da expressão gênica de proteínas hepáticas. Em ratos submetidos à dieta isenta de proteína por uma semana, observou-se alteração na expressão gênica de 281 genes. Os genes envolvidos no crescimento, transporte de substâncias, sinal de transdução, receptores e metabolismo energético, são os mais afetados negativamente com a dieta sem proteína. Alguns dos genes que tem sua expressão reduzida com a privação protéica expressam proteínas como fator de crescimento semelhante à insulina (Insulin-like growth factor -1 / IGF-1), além de proteínas envolvidas com transporte de substancias, controle da expressão gênica e genes envolvidos na biosíntese do colesterol e colágeno I e III (Endo et al., 2002).

A resposta regenerativa ocorre após ressecção hepática de qualquer extensão, mas o curso da regeneração está relacionado à quantidade de fígado removido. Após remoção de uma pequena porção do fígado, a resposta é mais baixa e mais gradual do que a observada na hepatectomia usualmente utilizada de 70% (Masson et al., 1999b).

Embora os hepatócitos sejam os principais responsáveis pela manutenção da homeostase metabólica, atualmente sabe-se que estas células não atuam isoladamente. As células endoteliais remanescentes atuam em sinergia com hepatócitos para promover o crescimento hepático (Matsumoto et al., 2001).

A interação entre células parenquimatosas (hepatócitos) e não parenquimatosas (células de Kupffer, endoteliais, estreladas e ductais) é essencial durante o mecanismo de desenvolvimento e regeneração hepática (Matsumoto et al., 2001; Bezerra, 2002). As substâncias secretadas pelas células não parenquimatosas e hepatócitos como fatores de crescimento, citocinas e hormônios podem estimular ou inibir a proliferação de todos os tipos celulares do parênquima hepático remanescente (Evarts et al., 1992). As células não parenquimatosas são as principais reguladoras do metabolismo intermediário e crescimento quando ocorre dano tecidual que afeta os hepatócitos (Maher e Friedman, 1993) e, portanto, devem ser consideradas conjuntamente durante o processo de regeneração do parênquima hepático.

5.4. Da Expressão gênica do HGF, TGF, IL-6 e timidina quinase.

TGF-α e HGF são os principais fatores de crescimento envolvidos na regeneração hepática (Tomiya et al., 1998). O TGF-α provavelmente participa da regeneração hepática nos estágios mais tardios e atua por mecanismo autócrino (Ankoma-Sey, 1999; Michalopoulos e DeFrances, 1997).

Apesar do aumento significativo do mRNA que codifica o TGF, observa-se elevação deste fator de crescimento apenas duas vezes o valor basal durante a regeneração hepática (Russell et al., 1993). No entanto, a expressão do TGF-α no remanescente hepático está sensivelmente associada com a mitose de hepatócitos e esta resposta regenerativa é proporcional à quantidade de tecido removido. O pico máximo da expressão do TGF-α ocorre dois dias após hepatectomia subtotal de 80%, simultaneamente à fase “S” do ciclo celular, período caracterizado por ampla divisão de DNA (Scotte et al., 1997).

Ratos com função hepática normal, apresentam aumento significativo dos níveis de mRNA para TGF-α seis horas após a hepatectomia parcial, atingindo pico máximo da expressão gênica 24 horas após o procedimento cirúrgico. Os valores do mRNA permanecem elevados até o segundo dia pós-operatório, declinando lentamente até atingir os valores basais, por volta do sexto dia da hepatectomia parcial (Masson et al.,1999a).

O nosso modelo experimental não foi capaz de demonstrar diferenças no padrão de expressão do TGF-α entre os diversos grupos experimentais. Isto foi

devido provavelmente ao fato das nossas amostras terem sido coletadas 96 horas após a hepatectomia, período onde já se observa um declínio significativo dos níveis do mRNA que codifica o TGF-α. Além da expressão gênica do TGF-α se encontrar próxima aos valores basais neste período, sabe-se que após a hepatectomia parcial, ocorre forte estímulo para expressão de alguns fatores de crescimento como o TGF-α, (Scotte et al., 1997), mesmo sem qualquer estímulo exógeno.

Desde que o HGF é considerado o mais potente estimulador da proliferação de hepatócitos, atuando por mecanismos parácrino e endócrino para estimular mitose celular (Michalopoulos e DeFrances, 1997), torna-se importante determinar se a administração de aminoácidos via parenteral influencia a expressão gênica deste fator de crescimento, em ratos desnutridos submetidos a hepatectomia parcial.

Em ratos com a função hepática preservada, a expressão gênica do HGF aumenta significativamente 6 a 24 horas após hepatectomia parcial, com pico máximo da sua expressão verificado 12 horas após a ressecção hepática. Os níveis do mRNA para HGF permanecem elevados até o primeiro dia pós-operatório, declinando para os níveis basais no segundo dia pós-operatório. Após este período, verifica-se nova ascensão da expressão gênica do HGF, com pico menos proeminente que o anterior no terceiro dia após a ressecção hepática. A partir do terceiro dia, ocorre um declínio da expressão gênica do

HGF no remanescente hepático até alcançar os valores basais, por volta do sexto dia pós-operatório (Masson et al., 1999a).

A presente pesquisa demonstrou alterações na expressão gênica do HGF em determinados grupos experimentais, 96 horas após a ressecção hepática. Observou-se nos grupos desnutridos experimentais (D-Gln e D-Pro), que os níveis de mRNA para HGF foram superiores ao controle desnutrido sem hepatectomia, enquanto nos grupos nutridos experimentais (N-Gln e N-Pro), os níveis de mRNA para HGF permaneceram próximos aos valores basais, com tendência a redução dos valores, em relação aos controle nutrido sem hepatectomia. Observou-se também que o grupo D-Pro apresentou maior expressão gênica do HGF em relação ao grupo N-Pro, enquanto o grupo D-Controle apresentou menor expressão do HGF, quando comparado com o grupo N-Controle, sugerindo que a expressão gênica do HGF possa sofrer maior influencia do estado nutricional e da hepatectomia parcial do que da infusão de aminoácidos nesses animais.

A presente pesquisa não demonstrou diferença significativa da expressão gênica do HGF 96 horas após a ressecção hepática, nos grupos experimentais nutridos (N-Gln e N-Pro) quando comparados com os grupos D-Gln e N-Controle respectivamente.

No presente trabalho, realizamos um trabalho de intervenção nutricional, com quatro grupos experimentais e dois grupos controles, utilizando-se RNA extraído do remanescente hepático total, onde cerca de 90% do tecido é composto por hepatócitos. Já no experimento desenvolvido por Masson et al.,

(1999a) as reações de RT-PCR foram realizadas com RNA extraído de células não parenquimatosas isoladas do fígado residual e os autores avaliaram apenas o nível de expressão gênica do HGF e outros fatores de crescimento, citocinas e ciclinas, durante vários períodos após a hepatectomia parcial em ratos cirróticos e saudáveis.

Considerando que as células não parenquimatosas são as principais secretoras de HGF durante a regeneração hepática (Ankoma-Sey, 1999; Matsuda e Nakamura, 1993; Matsumoto e Nakamura, 1992), a utilização de RNA total proveniente destas células em relação ao RNA extraído do fígado total residual aumenta a quantidade do produto amplificado com os “primers” para o HGF, melhorando a sensibilidade do método e possibilitando a identificação de diferenças significativas no trabalho descrito anteriormente, em relação aos nossos resultados. Portanto, as diferenças existentes entre as variáveis metodológicas das duas pesquisas, provavelmente influenciaram a obtenção de resultados menos expressivos da expressão gênica do HGF nos grupos experimentais da presente pesquisa.

Quando a expressão gênica do HGF foi comparada, considerando-se apenas o estado nutricional dos animais e presença ou ausência de hepatectomia observou-se no presente trabalho, aumento significativo do mRNA para HGF no grupo desnutrido experimental (D-Experimental), em relação ao grupo nutrido experimental (N-Experimental). Isto demonstra que a desnutrição pode estimular a expressão gênica do HGF no remanescente

hepático, provavelmente devido às alterações metabólicas e moleculares que ocorrem no fígado de ratos desnutridos (Park et al., 2003).

O processo inflamatório estimulado pela administração de LPS (*lipopolysaccharid*e) induz significativo aumento da expressão gênica do HGF tanto no fígado total como em hepatócitos isolados. No entanto, quando a hepatectomia parcial é precedida pela inflamação provocada pela LPS ou TNFα, ocorre aumento dos níveis de mRNA para HGF no fígado total e um decréscimo significativo da expressão gênica do HGF nas células não parenquimatosas. Isto sugere que na ocorrência de inflamação sistêmica, o HGF hepático pode ser secretado principalmente pelos hepatócitos em detrimento das células não parenquimatosas. Portanto, em situações não fisiológicas como a inflamação, o HGF pode atuar na proliferação de hepatócitos por mecanismo autócrino (Masson et al., 2001; Shiota et al.,1994).

Em camundongos com cirrose induzida por tetracloreto de carbono (CCl_4), o pré-tratamento com IL-6 reduz o dano hepático como fibrose e apoptose (Kovalovich et al., 2000), e pode influenciar diretamente o crescimento hepático (Cressman et al., 1996). A IL-6 e TNF-α são as principais citocinas envolvidas na regeneração hepática, estimulando as células do remanescente hepático a transitarem da fase “G0” para “G1” e da fase “G1” para a fase “S” do ciclo celular (Michalopoulos e DeFrances, 1997).

A IL-6 prepara os hepatócitos para ação dos fatores de crescimento, induz a resposta de fase aguda, estimula precocemente a entrada de

hepatócitos quiescentes no ciclo celular, inibe a apoptose e favorece a manutenção da homeostase durante a regeneração hepática (Zimmers et al., 2003; Blindenbacher et al., 2003; Leu et al., 2001).

Imediatamente após a hepatectomia parcial ocorrem alterações da expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias como a interleucina-6 (IL-6) no fígado de ratos com função hepática normal ou com cirrose. Nas células não parenquimatosas isoladas do fígado residual, verifica-se que o pico máximo da expressão da IL-6 ocorre 12 horas após a ressecção hepática e permanece elevada até o segundo dia pós-operatório. A partir daí observa-se declino progressivo até atingir os valores basais no terceiro dia após a hepatectomia parcial, sugerindo que ocorre resposta inflamatória no fígado residual, imediatamente após a agressão tecidual (Masson et al., 1999a).

No presente trabalho não se detectou amplificação do mRNA para IL-6 nas amostras do remanescente hepático, 96 horas após a hepatectomia parcial, provavelmente por se tratar de uma proteína de fase aguda com expressão gênica e ação imediata (2 a 4 horas) após a ressecção hepática (Blindenbacher et al., 2003).

A timidina quinase (TK), enzima essencial para divisão celular está diretamente relacionada com a incorporação de H^3timidina no núcleo celular e mitose. Esta enzima catalisa a adição de fosfato na timidina, passo fundamental para a síntese e utilização da purina na cascata de reações que envolvem a síntese de DNA (Kahn, 1980).

Normalmente a atividade da TK é muito baixa em condições fisiológicas. No entanto, observa-se 12 a 24 horas após a hepatectomia aumento significativo da atividade e expressão desta enzima, as quais permanecem elevadas por vários dias (Masson et al., 1999b; Beyer, 1991). Tal evento coincide com maior atividade da divisão celular, observada durante a regeneração hepática (Zieve et al., 1985; Kahn et al., 1980).

Em ratos com a função hepática normal, ocorre aumento da atividade enzimática 24 horas após a hepatectomia parcial, com pico máximo 36 horas após o procedimento cirúrgico. No fígado em regeneração, a atividade da TK pode aumentar até 50 vezes o valor normal e permanece elevada no máximo por 60 horas após a hepatectomia parcial, declinando para os valores basais em sete a oito dias do pós-operatório (Zieve et al.,1985).

Inicialmente ocorre redução dos níveis de mRNA para TK, seis horas após a hepatectomia. A partir deste momento, verifica-se aumento significativo da expressão gênica da TK, atingindo pico máximo da sua expressão no primeiro dia do pós-operatório. Os valores do mRNA da TK permanecem significativamente elevados até o terceiro dia após a hepatectomia parcial, quando declinam lentamente. No entanto, a expressão gênica da TK no remanescente hepático continua acima dos valores basais até o sexto dia pós-operatório (Masson et al., 1999a).

Desde que o aumento da expressão gênica da TK pode estar relacionado com o crescimento e proliferação celular (Beyer et al., 1991), nós

estudamos a expressão gênica desta enzima 96 horas após hepatectomia parcial, para verificar se ocorre super-expressão com conseqüente pico de divisão de DNA (fase “S”) neste período, de forma a estudar aspectos moleculares da regeneração hepática mais tardiamente. No entanto, os resultados da presente pesquisa não demonstraram alterações na expressão gênica da TK neste período, nos diversos grupos experimentais, confirmando que o aumento da atividade enzimática até 96 horas após a ressecção hepática não ocorre associada à modulação gênica, evento condicionalmente mais precoce.

5.5. Considerações Finais.

Em síntese, os resultados da presente pesquisa demonstraram que a desnutrição e hepatectomia parcial induzem alterações no teor de RNA total do remanescente hepático 96 horas após a hepatectomia. Observou-se que a suplementação de aminoácidos glutamina ou prolina na NP, após hepatectomia parcial em ratos desnutridos foi capaz de aumentar a expressão gênica do HGF, quando comparados aos animais nutridos nas mesmas condições. Quando os dados foram analisados considerando-se apenas estado nutricional, confirmamos esses resultados uma vez que ocorreu aumento da expressão gênica do HGF no grupo desnutrido experimental, quando comparado com o grupo nutrido experimental, ambos, submetidos a hepatectomia parcial. Contudo, não houve alterações na expressão gênica do TGF-α, interleucina 6

(IL-6) e timidina quinase (TK) nos vários grupos experimentais do modelo utilizado.

Nosso trabalho reúne evidências que a desnutrição, bem como a infusão endovenosa de aminoácidos, são capazes de alterar o teor de RNA total e o padrão de expressão gênica do HGF no remanescente hepático dos ratos utilizados neste estudo. No entanto, são necessárias pesquisas adicionais envolvendo administração de nutrientes, modelos diferenciados de hepatectomia e utilização de métodos sensíveis para estudo do remanescente hepático, de forma a esclarecer a função metabólica e molecular de aminoácidos como a glutamina e prolina, durante a regeneração hepática em várias condições de nutrição, para obtermos evidencias irrefutáveis sobre a segurança e eficiência da administração de aminoácidos durante o processo de regeneração hepática e sua possível aplicação clínica.

CONCLUSÕES

6. Conclusões.

Nas condições da presente pesquisa, em que ratos nutridos e desnutridos hepatectomizados foram submetidos por 96 horas à nutrição parenteral (NP) suplementada com L-alanil-L-glutamina (Ala-Gln), pode-se concluir que:

1. O RNA total hepático foi menor nos animais nutridos submetidos a hepatectomia parcial independente da administração de glutamina ou prolina;
2. Nos animais desnutridos submetidos a hepatectomia parcial, a prolina aumentou o teor de RNA total;
3. Ocorreu relação inversa entre desnutrição e teor de RNA total no remanescente hepático dos animais experimentais com prolina;
4. A administração de aminoácidos aumentou a expressão gênica do HGF após hepatectomia parcial em ratos desnutridos, sendo que a prolina teve efeito mais expressivo que a glutamina;
5. Ratos desnutridos submetidos a HP tiveram maior expressão gênica de HGF do que aqueles sem hepatectomia ou nutridos com hepatectomia;
6. A oferta de aminoácidos não se associou a modificação da expressão gênica de TGF-α e TK no remanescente hepático.

REFERÊNCIAS

7. Referências

Adams E. Metabolism of proline and of hydroxyproline. *Int Rev Connect Tissue Res.* 1970;5:1-91.

Ankoma-Sey V. Hepatic regeneration: revisiting the myth of prometheus. *News Physiol Sci.* 1999;14:149-55.

Arias M, Irwin M, Boyer JL, Fausto N. Hepatic regeneration. In: Fausto N, editor. *The liver: biology and pathobiology.* New York: Raven Press; 1994. p.32-53.

Beyer HS, Sherman R, Zieve L. Aging is associated with reduced liver regeneration and diminished thymidine kinase mRNA content and enzyme activity in the rat. *J Lab Clin Med.* 1991;117(2):101-8.

Bezerra JA. Hepatocytes and endothelial cells: joining forces to conquer development [Editorial]. Science. 2002; 51(4):413.

Blindenbacher A, Wang X, Langer I, Savino R, Terracciano L, Heim MH. Interleukin 6 is important for survival after partial hepatectomy in rats. *Hepatology.* 2003;38(3):674-82.

Bode AM, Nordlie RC. Reciprocal effects of proline and glutamine on glycogenesis from glucose and ureagenesis in isolated, perfused rat livers. *J Biol Chem.* 1993;268(22):16298-301.

Buchman A. The role of glutamine: Counterpoint. *Nut Clin Prac.* 2003;18:391-6.

Capacci ML. Suporte nutricional em hepatopatias. *Rev Metab Nutr.* 1996*;* 3(1):6-8.

Carrillo MC, Carnovale CE, Favre C, Monti JA, Scapini C. Hepatic protein synthesis and serum aminoacid levels during liver regeneration in young and old malnourished rats. *Mech Ageing Dev.* 1996;91:55-64.

Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate phenol chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987;162:159-69.

Cressman DE, Greenbaum LE, DeAngelis RA, Ciliberto G, Furth EE, Poli V, Taub R. Liver failure and defective hepatocyte regeneration in interleukin-6-deficient mice. *Science*. 1996;274(5291):1379-83.

D'Errico A, Fiorentino M, Ponzetto A, Daikuhara Y, Tsubouchi CB, Grigioni WF. Liver hepatocyte growth factor does not always correlate with hepatocellular proliferation in human liver lesions: its specific receptor c-met does. *Hepatology.* 1996; 24(1): 60-4.

Demetris AJ, Murase N, Ye Q, Galvão FHF, Richert C, Saad R, Pham S, Duquesnoy RJ, Zeevi A, Fung JJ; Starzl TE. Analysis of chronic rejection and obliterative arteriopathy. possible contributions of donor antigen-presenting cells and lymphatic disruption. *Am J Pathol .* 1997; 150(2):563-78.

Eguchi S, Lilja H, Hewitt WR, Middleton Y, Demetriou AA, Rozga J. Loss and recovery of liver regeneration in rats with fulminant hepatic failure. *J Surg Res.* 1997;72(2):112-22.

Endo Y, Fu Z, Abe K, Arai S, Kato H. Dietary protein quantity and quality affect rat hepatic gene expression. *J Nutr.* 2002;132(12):3632-7.

Evarts RP, Nakatsukasa H, Marsden ER, Hu Z, Thorgeirsson SS. Expression of transforming growth factor-alpha in regenerating liver and during hepatic differentiation. *Mol Carcinog.* 1992; 5:25-31.

Fausto N. Hepatic regeneration. Zakim D, Boyer TD, editors. *Hepatology.* Philadelphia: WB Saunders; 1996. p.32-57.

Fausto N, Lair AD, Webber EM. Liver regeneration. 2. Role of growth factors and cytokines in hepatic regeneration. *FASEB J.* 1995; 9(15):1527-36.

Fleig WE. Liver-specific growth factors. *Scand J Gastroenterol Suppl.* 1988;151:31-6.

Franco DL, Capussotti C, Smajda H, Bouzari J, Meak-ins F, Kemeny D, Grange Dellepiane, M Dellepiane. Resection of hepatocellular carcinomas: results in 72 european patients with cirrhosis. *Gastroenterology.* 1990;98:733–8.

Fukuhara Y, Hirasawa A, Li XK, 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(6):784-92.

Gohda E. Function and regulation of production of hepatocyte growth factor (HGF). *Nippon Yakurigaku Zasshi.* 2002;119(5):287 [Abstract em Medline].

Guzelian PS, Qureshi GD, Diegelmann RF. Collagen synthesis by the hepatocyte: studies in primary cultures of parenchymal cells from adult rat liver. *Coll Relat Res.* 1981;1(1):83-93.

Haque SM, Chen K, Usui N, Iiboshi Y, Okuyama H, Masunari A, Cui L, Nezu R, Takagi Y, Okada A. Alanyl-glutamine dipeptide-supplemented parenteral nutrition improves intestinal metabolism and prevents increased permeability in rats. *Ann Surg.* 1996;223(3):334-41.

Herzfeld A, Mezl VA, Knox WE. Enzymes metabolizing delta1-pyrroline-5-carboxylate in rat tissues. *Biochem J.* 1977;166(1):95-103.

Higgins GM, Anderson RM. Experimental pathology of the liver. *Arch Pathol.* 1931;186:186-202.

Ito A, Higashiguchi T. Effects of glutamine administration on liver regeneration following hepatectomy. *Nutrition.* 1999;15:23-8.

Jesus RP, Waitzberg DL, Campos FG. Regeneração hepática: papel dos fatores de crescimento e nutrientes. *Rev Assoc Med Bras.* 2000; 46(3):242-54.

Kahn D, Stadler J, Terblanche J, Hoorn-Hickman RV. Thymidine kinase: an inexpensive index of liver regeneration in a large animal model. *Gastroenterology.* 1980; 79(5):907-11.

Kelley-Loughnane N, Sabla GE, Ley-Ebert C, Aronow BJ, Bezerra JA. Independent and overlapping transcriptional activation during liver development and regeneration in rats. *Hepatology.* 2002;35(3):525-34.

Kmiec Z. Cooperation of liver cells in health and disease. *Adv Anat Embryol Cell Biol.* 2001;161:3-13I,1-151.

Kovalovich K, DeAngelis RA, Li W, Furth EE, Ciliberto G, Taub R. Increased toxin-induced liver injury and fibrosis in interleukin-6-deficient mice. *Hepatology.* 2000;31(1):149-59.

LaBrecque D. Liver regeneration: a picture emerges from the puzzle. *Am J Gastroenterol.* 1994;89:S86-S96.

Lai EC, Ng IO, Ng MM, Lok AS, Tam PC, Fan ST, Choi TK, Wong J. Long-term results of resection for large hepatocellular carcinoma: a multivariate analysis of clinicopathological features. *Hepatology.* 1990;11(5):815-8.

Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM. Biossíntese de aminoácidos, nucleotídios e moléculas relacionadas. In: Lehninger AL. *Princípios de bioquímica.* 2ª ed. São Paulo: Sarvier; 2000. p.514-51.

Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM. Oxidação dos aminoácidos e a produção de uréia. In: Lehninger AL. *Princípios de bioquímica.* 2ª ed. São Paulo: Sarvier; 1995. p.375-403.

Leu JI, Crissey MA, Leu JP, Ciliberto G, Taub R. Interleukin-6-induced STAT3 and AP-1 amplify hepatocyte nuclear factor 1-mediated transactivation of hepatic genes, an adaptive response to liver injury. *Mol Cell Biol.* 2001;21(2):414-24.

Lima-Gonçalves E, Yamagushi N, Waitzberg DL, Mello Filho GB. Nutrição parenteral em ratos: aspectos técnicos. *Acta Cir Bras.* 1990;5:17-22.

MacCullough AJ, Mullen KD, Smanik EJ, Tabbaa M, Szauter K. Nutritional therapy in liver disease. *Gastroenterol Clin Health Am. 1989;*18:619-43.

Maher JJ, Friedman SL. Parenchymal and nonparenchymal cell interactions in the liver. *Semin Liver Dis.* 1993; 13:13-20.

Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. *Molecular cloning: a laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.

Martinez-Hernandez A, Amenta PS. The extracellular matrix in hepatic regeneration. *FASEB J.* 1995;9(14):1401-10.

Masson S, Daveau M, Francois A, Bodenant C, Hiron M, Teniere P, Salier JP, Scotte M. Up-regulated expression of HGF in rat liver cells after experimental endotoxemia: a potential pathway for enhancement of liver regeneration. *Growth Factors.* 2001;18(4):237-50.

Masson S, Daveau M, Hiron M, Lyoumi S, Lebreton JP, Teniere P; Scotte M. Differential regenerative response and expression of growth factors following hepatectomy of variable extent in rats. *Liver.* 1999b; 19(4):312-7.

Masson S, Scotte M, Francois A, Coeffier M, Provot F, Hiron M, Teniere P, Fallu J, Salier JP, Daveau M. Changes in growth factor and cytokine mRNA levels after hepatectomy in rat with CCl(4)-induced cirrhosis. *Am J Physiol.* 1999a; 277(4 Pt 1):G838-G46.

Matsuda Y, Nakamura T. Molecular biology of hepatocyte growth factor (HGF). *Nippon Rinsho.* 1993;51(2):435-45. [Abstract em Medline].

Matsumoto K, Nakamura T. Hepatocyte growth factor: molecular structure, roles in liver regeneration and other biological functions. *Crit Rev Oncog.* 1992;3(1-2):27-54.

Matsumoto K, Yoshitomi H, Rossant J, Zaret KS. Liver organogenesis promoted by endothelial cells prior to vascular function. *Science.* 2001;294(5542):559-63.

Mead JE, N Fausto. Transforming growth factor a maybe a physiological regulator of liver regeneration by means of an autocrine mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1989; 86:1558–62.

Michalopoulos GK, DeFrances MC. Liver regeneration. *Science.* 1997; 276:60-6.

Morlion BJ, Stehle P, Wachtler P, Siedhoff HP, Koller M, Konig W, Furst P, Puchstein C. Total parenteral nutrition with glutamine dipeptide after major abdominal surgery: a randomized, double-blind, controlled study. *Ann Surg.* 1998;227(2):302-8.

Mullhaupt B, Feren A, Fodor E, Jones A. Liver expression of epidermal growth factor RNA. Rapid increases in immediate-early phase of liver regeneration. *J Biol Chem.* 1994; 269 (Suppl 19):667-70.

Murray RK, Granner DK, Mayes PA. Metabolismo dos nucleotídios de purina e pirimidinas. In: Rodwell VW. *Harper: Bioquímica.* 6a ed. São Paulo: Editora São Paulo; 1994. p.361-3.

Nagy P, Bisgaard HC, Schnur J, Thorgeirsson SS. Studies on hepatic gene expression in different liver regenerative models. Biochem Biophys Res Commun. 2000; 272(2):591-5.

Nagy P, Teramoto T, Factor VM, Sanchez A, Schnur J, Paku S, Thorgeirsson SS. Reconstitution of liver mass via cellular hypertrophy in the rat. *Hepatology.* 2001;33(2):339-45.

Nakamura T, Nawa K, Ichihara A. Partial purification and characterization of hepatocyte growth factor from serum of hepatectomized rats. *Biochem Biophys Res Commun.* 1984; 16;122(3):1450-9.

O'Leary MJ, Ferguson CN, Rennie MJ, Hinds CJ, Coakley JH, Preedy VR. Sequential changes in in vivo muscle and liver protein synthesis and plasma and tissue glutamine levels in sepsis in the rat. *Clin Sci.* 2001; 101:295-304.

Palmer M, Prediger E. *Assessing RNA Quality* [online]. Available from: http://www.ambion.com/techlib/tn/111/8.html. [cited 2004 May 10].

Park KS, Kim SK, Kim MS, Cho EY, Lee JH, Lee KU, Pak YK, Lee HK. Fetal and early postnatal protein malnutrition cause long-term changes in rat liver and muscle mitochondria. *J Nutr.* 2003;133(10):3085-90.

Passos de Jesus Mazza R, Bertevello PL, Torrinhas RSMM, Nonogaki S, Alves VAF, Gama Rodrigues J, Waitzberg DL. Effect of glutamine dipeptide on hepatic regeneration in partially hepatectomized malnourished rats. *Nutrition.* 2003;19:930-5.

Perez-Sala D, Parrilla R, Ayuso MS. Key role of L-alanine in the control of hepatic protein synthesis. *Biochem J.* 1987;241(2):491-8.

Plauth M, Merli M, Kondrup J, Weimann A, Ferenci P, Müller MJ. ESPEN guidelines for nutrition in liver disease and transplantation (Consensus Statement). *Clin Nut.* 1997;16:43-55.

Reeves PG, Nielsen FH, Fahey Jr GC. AIN-93: purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing

Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. *J Nutr.* 1993; 123:1939-51.

Rozovski SJ, Temkin ME. Protein malnutrition in aged rats: an experimental model. *J Nutr.* 1984; 114:1199-203.

Russell WE, Dempsey PJ, Sitaric S, Peck AJ, Coffey Jr, RJ. Transforming growth factor-alpha (TGF-alpha) concentrations increase in regenerating rat liver: evidence for a delayed accumulation of mature TGF alpha. *Endocrinology.* 1993;133:1731–8.

Scotte M, Laquerriere A, Masson S, Hiron M, Teniere P, Hemet J, Lebreton JP, Daveau M. Transforming growth factor alpha (TGF-alpha) expression correlates with DNA replication in regenerating rat liver whatever the hepatectomy extent. *Liver.* 1997;17(4):171-6.

Shiota G, Kawasaki H, Nakamura T, Schmidt EV. Assessment of in vitro growth potential of hepatocytes expressing hepatocyte growth factor in an autocrine fashion. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol.* 1994; 85(2):151-6.

Siegel S, Castellan N J Jr. *Nonparametrics statistics.* 2nd ed. New York: Mac Graw-Hill; 1988.

Small WC, Jones ME. Pyrroline 5-carboxylate dehydrogenase of the mitochondrial matrix of rat liver. Purification, physical and kinetic characteristics. *J Biol Chem.* 1990;265(30):18668-72.

Svensson G, Fjalling M, Gretarsdottir J, Jacobsson L, Holmberg SB. Kupffer cell and hepatocyte function in rat transplanted liver. *Transpl Int.* 1992;5 (Suppl 1):S417-9.

Taub R. Liver regeneration 4: transcriptional control of liver regeneration. *FASEB J.* 1996;10(4):413-27.

Thompson MW, McInnes RR, Willard HF. *Genética médica.* 5ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1993. p.22-37: Estrutura do DNA, cromossomos e genes.

Tomiya T, Ogata I, Fujiwara K. Transforming growth factor alpha levels in liver and blood correlate better than hepatocyte growth factor with hepatocyte proliferation during liver regeneration. *Am J Pathol.* 1998;153(3):955-61.

Wadamori K, Oka M, Tokuda N, Fujikura Y, Hazama TF, Suzuki T. Influence of continuous Interleukin-2 administration via the portal vein on liver regeneration following partial hepatectomy in rats. *Hepatology.* 1996; 23 (6):1578-83.

Waheed AA, Gupta PD. Changes in structural and functional properties of rat intestinal brush border membrane during starvation. *Life Sci.* 1997;61(25):2425-33.

Watanabe M, Sugimura K, Yamanoha B. Effect of acute deficiency of dietary proline on proline balance in the rat small intestine and liver. *J Anim Physiol*. 1999; 82:294-304.

Williams GM, Iatropoulos MJ. Alteration of liver cell function and proliferation: differentiation between adaptation and toxicity. *Toxicol Pathol.* 2002;30(1):41-53.

Wischmeyer PE. Clinical applications of L-Glutamine: past, present, and future. *Nutr Clin Pract.* 2003;18:377-85.

Xu W, Wang S, Wang G, Wei H, He F, Yang X. Identification and characterization of differentially expressed genes in the early response phase during liver regeneration. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000; 278(2):318-25.

Yamaguchi N, Waitzberg DL, Lima-Gonçalves E. Intermediário de livre movimentação para esquema de nutrição parenteral em ratos. *Acta Cir Bras.* 1989; 04:109-11.

Yamaguchi T, Minor T, Isselhard W. Effect of glutamine or glucagon-insulin enriched total parenteral nutrition on liver and gut in 70% hepatectomized rats. *J Am Coll Surg.* 1997; 185:156-62.

Yoshida S, Yunoki T, Aoyagi K, Ohta J, Ishibashi N, Noake T, Kakegawa T. Effect of Glutamine supplement and hepatectomy on DNA and protein synthesis in the remnant liver. *J Surg Res.* 1995; 59:475-81.

Ziegler TR, Bye RL, Persinger RL, Young LS, Antin JH, Wilmore DW. Effects of Glutamine supplementation on circulating lymphocytes after bone marrow transplantation: a pilot study. *Am J Med Sci.* 1998; 315:4-10.

Zieve L, Anderson R, Lindblad S. Course of hepatic regeneration after 80% to 90% resection of normal rat liver. Comparison with two-lobe and one-lobe hepatectomy. *J Lab Clin Med.*1985; 105(3):331-6.

Zimmers TA, McKillop IH, Pierce RH, Yoo JY, Koniaris LG. Massive liver growth in rats induced by systemic interleukin 6 administration. *Hepatology.* 2003;38(2):326-34.