

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO - USP**

**ALTERAÇÕES MITOCONDRIAIS DO FÍGADO REMANESCENTE
PÓS-HEPATECTOMIA A 70%**

Doutorando: Ailton José Barbosa

Orientador: Prof. Dr. Orlando de Castro e Silva Jr.

Ribeirão Preto,SP

2006

Barbosa, Ailton José

Alterações mitocondriais do fígado remanescente pós hepatectomia parcial a 70%.

Ribeirão Preto, 2006.

63 p. : il. ; 30 cm

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto / USP – Área de concentração: Cirurgia.

Orientador: *Castro e Silva Júnior, Orlando.*

1. Hepatectomia parcial 2. Regeneração hepática 3. Respiração mitocondrial 4. Potencial de membrana mitocondrial 5. LASER

**TESE DE DOUTORADO APRESENTADA AO
DEPARTAMENTO DE CIRURGIA E ANATOMIA
DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE
DOUTOR EM CLÍNICA CIRURGICA**

*Este trabalho foi realizado:
Laboratório de Bioquímica e Transplante Hepático
da Disciplina de Gastroenterologia
do Departamento de Cirurgia e Anatomia –
Setor de Técnica Cirúrgica e Cirurgia Experimental
da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
da Universidade de São Paulo / USP.*

Dedico:

À Deus que me permitiu caminhar em busca de novas conquistas e me presenteou com uma linda família da qual eu tiro exemplos e estímulo de vida.

Aos meus pais e irmãos pelo apoio e confiança nunca negados, que me ajudaram enfrentar as dificuldades sem jamais esmorecer.

À minha esposa Wilce que sempre esteve presente apoiando e dando carinho.

E aos meus filhos Pedro e Julia, motivo de viver.

À Universidade José do Rosário Vellano – UNIFENAS,
na pessoa de seu *Magnífico Reitor*
Edson Antônio Velano.

Agradecimento Especial:

Ao Prof. Dr. Orlando Castro e Silva Júnior,
ela amizade, estímulo e orientação,
cujo apoio e colaboração serei sempre grato.

Agradecimentos:

Silvio Tucci Júnior

Leandra Náira Zambelli Ramalho

Aldo da Cunha Medeiros

Carlos Curti

Maria Elisa Jordani de Souza

Maria Aparecida Neves Cardoso Piccinato

Maria Cecília Jordani Gomes

Clarice Fleury Fina Franco

Marcia Aparecida Baratella Fonseca

Sebastião Assis Mazzeto

Walkiria de Pádua Lara Andrade

Antonio Carlos de Souza

André Alves Barbosa

Wilson Gonçalves da Silva Junior

Funcionários da Cirurgia Experimental HC-USP-RP

Funcionários do Departamento de Cirurgia e Anatomia da FMRP-USP

Funcionários da Seção de Pós Graduação da FMRP-USP

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

I – INTRODUÇÃO	1
1.1. Estrutura e função mitocondrial	6
1.2. Sistema de transporte de elétrons	8
1.3. Gradiente eletroquímico de prótons (Δp) e Potencial de membrana das mitocôndrias ($\Delta \psi$)	9
1.4. Síntese de ATP	11
1.5. Transição e permeabilidade mitocondrial (TPM)/ Intumescimento osmótico	11
II – OBJETIVO	17
III – MÉTODO	18
3.1. Animais	18
3.2. 1ª Etapa	18
3.3. 2ª Etapa - Aplicação do LASER na fase aguda da regeneração hepática	22
3.4. Procedimentos Laboratoriais	24
3.4.1. Estudo da Função Mitocondrial	24
3.4.2. Isolamento das mitocôndrias do fígado	24
3.4.3. Determinação do Consumo de Oxigênio pelas Mitocôndrias Energizadas	25

3.4.4. Determinação do Potencial Elétrico da Membrana	
Mitochondrial Interna	26
3.4.5. Intumescimento Osmótico das Mitocôndrias	27
IV - ANÁLISE ESTATÍSTICA	28
V – RESULTADO	29
VI – DISCUSSÃO	39
VII – CONCLUSÃO	47
VIII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
IX – APÊNDICE	59

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Rato em decúbito dorsal, sob anestesia inalatória. **19**
- Figura 2.** Laparotomia com identificação dos lobos hepáticos. **20**
- Figura 3.** Ligadura do hilo dos lobos esquerdo e quadrado. **21**
- Figura 4.** Remanescente hepático, lobo caudado e posterior direito. **21**
- Figura 5:** Aparelho de LASER de baixa potência utilizado no grupo de pesquisas hepática na FMRP-USP **23**
- Figura 6:** Bioestimulação com LASER de baixa potência no remanescente hepático, pós hepatectomia a 70%. **23**
- Figura 7.** Representação gráfica da respiração mitocondrial nos estados 3 (respiração ativada por ADP) e estado 4 (respiração basal) **26**
- Figura 8 –** Valores do consumo de oxigênio pelas mitocôndrias hepáticas no estado 3 da repiração mitocondrial, expressos em n.at.O/minuto/mg.proteína mitocondrial nos respectivos tempos estudados. **29**
- Figura 9 –** Valores do consumo de oxigênio pelas mitocôndrias hepáticas no estado 4 da respiração mitocondrial, expressos emn.at.O/minuto/mg.proteina mitocondrial nos respectivos tempos estudados. **30**
- Figura 10 -** Valores da razão do controle respiratório (RCR), referente ao estado 3 e 4 de consumo de oxigênio mitocondrial **31**

- Figura 11** - Valores do Potencial de Membrana (PM) em mV nos diversos grupos estudados, referentes aos respectivos tempos de eutanásia. **32**
- Figura 12** – Valores do intumescimento mitocondrial, (Δ Abs) em relação aos tempos de eutanásia, nos diversos grupos estudados. **33**
- Figura 13** - Valores do consumo de oxigênio pelas mitocôndrias no estado 3 expressos em n.at.O/minuto/mg.proteína mitocondrial nos respectivos tempos estudados, relacionando grupos de ratos, que foram e não, submetidos à bioestimulação com LASER. **34**
- Figura 14** - Valores do consumo basal de oxigênio pelas mitocôndrias no estado 4 expressos em n.at.O/minuto/mg.proteína mitocondrial nos respectivos tempos estudados, relacionando grupos de ratos, que foram e não, submetidos à bioestimulação com LASER. **35**
- Figura 15** - Valores da razão do controle respiratório (RCR), referente ao estado 3 e 4 de consumo de oxigênio mitocondrial nos respectivos tempos estudados, relacionando grupos de ratos, que foram e não, submetidos à bioestimulação com LASER. **36**
- Figura 16** - Valores do Potencial de Membrana (PM) em mV, referentes aos respectivos tempos de eutanásia, relacionando grupos de ratos, que foram e não, submetidos à bioestimulação com LASER. **37**
- Figura 17** - Valores do intumescimento mitocondrial, (Δ Abs) em relação ao tempo, referentes aos respectivos tempos de eutanásia, relacionando grupos de ratos, que foram e não, submetidos à bioestimulação com LASER. **38**

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1: Valores individuais do Estado 3 nos grupos submetidos a HP a 70%. 59**
- Tabela 2: Valores individuais do Estado 4 nos grupos submetidos a HP a 70%. 59**
- Tabela 3: Valores individuais da Razão de Controle Respiratório nos grupos submetidos a HP a 70%. 60**
- Tabela 4: Valores individuais do Potencial de Membrana nos grupos submetidos a HP a 70%. 60**
- Tabela 5. Valores individuais do Intumescimento Osmótico Mitocondrial (Swelling) nos grupos submetidos a HP a 70%. 61**
- Tabela 6: Comparativo dos valores individuais do Estado 3 nos grupos submetidos a HP a 70% com e sem bioestimulação com LASER. 62**
- Tabela 7: Comparativo dos valores individuais do Estado 4 nos grupos submetidos a HP a 70% com e sem bioestimulação com LASER. 62**
- Tabela 8: Comparativo dos valores individuais da Razão de Controle Respiratório nos grupos submetidos a HP a 70% com e sem bioestimulação com LASER. 62**
- Tabela 9: Comparativo dos valores individuais do Potencial de Membrana Mitocondrial nos grupos submetidos a HP a 70% com e sem bioestimulação com LASER. 63**
- Tabela 10: Comparativo dos valores individuais do Intumescimento Osmótico Mitocondrial (Swelling), nos grupos submetidos a HP a 70% com e sem bioestimulação com LASER. 63**

RESUMO

No presente estudo analisou-se a função mitocondrial do remanescente hepático após ressecção hepática a 70% e os possíveis benefícios da bioestimulação a LASER em tempos pré-fixados. Este estudo foi realizado em duas etapas, na 1ª etapa, foram utilizados 96 ratos da linhagem Wistar, divididos em 16 grupos (n=6, em cada grupo), dentro dos critérios aprovados pela comissão de ética da FMRP-USP em experimentação animal. Os animais foram submetidos a hepatectomia parcial (HP) a 70%, posteriormente colhido o remanescente hepático (RH) em tempos seriados de eutanásia (C=0',2',5',10',15',30', 1h, 2h, 4h, 6h,12h, 1dia, 2dias, 3 dias, 6 dias, 15 dias) e enviados para estudos da respiração mitocondrial. Foram usados como parâmetros os estados 3, 4, RCR, PM e Swelling. Na segunda etapa utilizou -se 30 ratos divididos em 5 grupos (n=6) dentro dos padrões anteriores, desenvolvendo a mesma técnica. Mediante os resultados obtidos na 1ª etapa, selecionou-se os tempos C=0', 2', 4h, 6h e 24h para usar a bioestimulação a LASER num comprimento de onda de 660 nm com potência de 30 mw, em cinco pontos distintos no RH por 30 segundos,na dose 22,5 J/cm³ em cada um deles.Os resultados dos vários grupos foram analisados e comparados por testes não paramétricos de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney. As diferenças foram significantes para p<0.05. Com relação ao estado 3, o LASER provocou uma significativa diminuição da respiração mitocondrial após quatro horas, o que não ocorreu após seis horas de hepatectomia. O LASER não alterou o estado 4 da

respiração mitocondrial em relação ao controle e mesmo reduzindo os níveis de RCR não causou desacoplamento mitocondrial. Concluiu-se que, a sobrecarga metabólica do RH na fase aguda da regeneração hepática, foi significativa no intervalo entre quatro e seis horas, tendendo a uma estabilização subsequente. Numa análise global, o LASER, na dose utilizada e nas condições experimentais do presente estudo, não induziu lesão adicional ao FR e parece ter retardado o surgimento do estresse metabólico hepatocelular do fígado remanescente. Na seqüência, outros estudos deverão ser programados para se estabelecer com melhor precisão os eventos metabólicos que ocorrem pós - hepatectomia parcial e a possível ação da luz LASER sobre o fígado, após as ressecções hepáticas parciais.

Palavras chave: Hepatectomia parcial, regeneração hepática, respiração mitocondrial, potencial de membrana mitocondrial, LASER.

ABSTRACT

In the present study the mitochondrial function of the hepatic remainder (HR) after 70% hepatic resection was analyzed, as well as the possible benefits of LASER biostimulation in pre-fixed time. This study was accomplished in two stages: in the 1st stage 96 Wistar rats were used, according to the standards approved by the ethics commission of animal experimentation, from FMRP-USP, divided in 16 groups (n=6 in each group). The animals were submitted to partial hepatectomy (PH) at 70%, the hepatic remainder (HR) being subsequently taken up in seriate periods of euthanasia (C=0',2',5',10',15',30', 1h,2h,4h,6h,12h, 1 day, 2 days, 3 days, 6 days, 15 days) and sent for mitochondrial breathing studies. As parameters, states 3, 4, RCR, PM, and Swelling were used. In the 2nd stage 30 rats were used, divided in 5 groups (n=6 in each group) according to the foregoing standards, developing the same technique. By means of the results obtained in the first stage, times C=0, 2', 4h, 6h and 24h were selected to be used in LASER biostimulation, at a 660nm wavelength with a 30mw potency in five distinct spots of the HR for 30 seconds, at a 22,5J/cm³ dose in each one of them. The results of the several groups were analyzed and compared by non-parametric tests from Kruskal-Wallis and Mann-Whitney. Differences were significant for p<0.05. Relating to stage 3, the LASER provoked a significative reduction in mitochondrial breathing after four hours, which did not occur after six hours of hepatectomy. LASER did not alterate stage 4 of mitochondrial breathing compared to control, and even when RCR levels were reduced it didn't cause mitochondrial uncoupling. The conclusion

was that the HR metabolic overload in the acute phase of hepatic regeneration was significant in the four-to-six hour interval, with a subsequent stabilization. In an overall analysis, LASER, in the used dose and experimental conditions of the present study, did not induce additional injury to the remaining liver (RL) and seems to have delayed the arising of the hepatocellular metabolic stress in the RL. In sequence, other studies should be scheduled to establish with more acute precision the metabolic events that occur after partial hepatectomy and the possible effect of LASER light in the liver, after the partial hepatic resections.

Key-words: partial hepatectomy, hepatic regeneration, mitochondrial breathing, mitochondrial membrane potential, LASER.

I - INTRODUÇÃO

O fígado é o único órgão humano capaz de se regenerar. A lenda de Prometeu, da Mitologia Grega, revela que desde a antigüidade o fenômeno regenerativo hepático era conhecido. Por ter roubado dos deuses do Olimpo o segredo do fogo e o revelado aos homens, Prometeu foi condenado por Zeus a ter seu fígado diariamente devorado por uma águia. No entanto, durante a noite, o fígado de Prometeu se regenerava, provendo a águia incessante alimentação, e conduzindo Prometeu à interminável tortura.^{57,73}

Logo no início do século XX, Milne percebeu que qualquer alteração, patológica ou experimental, levando a destruição de hepatócitos, era capaz de desencadear o processo proliferativo hepatocelular. Em 1920, Rous e Larimore relataram que a ligadura parcial dos ramos da veia porta resultava em aumento de volume dos lobos hepáticos não privados do suprimento portal.^{76,91}

Recentes estudos têm demonstrado que a capacidade regenerativa hepática é quase que ilimitada, validando a antiga fábula de Prometeu. Em trabalhos utilizando transplantes seriados de clones de hepatócitos em camundongos, observou-se que um único hepatócito foi capaz de sofrer 69 divisões celulares sucessivas, originando $5,9 \times 10^{20}$ células. Considerando que o fígado do animal possui cerca de 8×10^7 células, pode-se concluir que um único hepatócito possui potencial clonogênico para produzir 7×10^{12} fígados, potencial semelhante ao das células progenitoras hematopoéticas. Esse achado é deveras inesperado, dada a elevada ploidia e a tamanha complexidade das funções desempenhadas pelos hepatócitos.⁸²

O fenômeno regenerativo hepático é reconhecido como um espetacular exemplo de crescimento tecidual ordenado e organizado. Há completa restauração da massa hepática, mesmo após lesões celulares agudas extensas, como nas hepatites fulminantes virais e tóxicas, após amplas ablações cirúrgicas, como nas ressecções segmentares devido a grandes massas tumorais e lesões traumáticas agudas, ou após transplantes de segmentos hepáticos. Experimentalmente, a regeneração pode ser induzida por qualquer tratamento agudo, cirúrgico ou químico, o qual remova ou destrua um grande percentual do parênquima hepático. A perda tecidual rapidamente desencadeia o processo regenerativo até que o peso original seja recuperado.⁷⁵

A regeneração hepática vem sendo estudada, com detalhes, após a administração de tetracloreto de carbono ou após hepatectomia parcial em animais experimentais; ou, em humanos, após ressecção parcial do fígado ou necrose hepática maciça. Embora mecanismos diferentes possam operar estas situações clínicas e experimentais distintas, o melhor modelo para o estudo da regeneração hepática é a *hepatectomia parcial* (HP) descrita por Higgins e Anderson (1931). A HP consiste na ressecção dos lobos lateral esquerdo e mediano (lobos anteriores), os quais constituem aproximadamente 67% da massa hepática total. Permanecem intactos os lobos lateral direito e caudado (lobos posteriores), que correspondem respectivamente a 24 e 9 % da massa hepática total. Comparando-se a outros métodos, a HP constitui-se no procedimento mais utilizado, visto não induzir reação inflamatória ou lesão tecidual, além de permitir a definição precisa do início do estímulo regenerativo.^{2,9,35,49,75.}

O termo regeneração, embora comumente usado, é biologicamente incorreto, uma vez que a resposta induzida pela ressecção do tecido hepático não

é verdadeiramente regenerativa. Os lobos ressecados não se desenvolvem novamente. A restauração da massa hepática ocorre por hiperplasia celular compensatória nos lobos remanescentes, com conseqüente aumento em suas dimensões. Isto sugere que o crescimento hepático seja controlado por fatores funcionais ao invés de fatores anatômicos. Qualquer que seja a natureza destes fatores, eles parecem ser bastante precisos, uma vez que o crescimento cessa quando o fígado atinge seu peso original (variações de 5 a 10%). A proliferação de hepatócitos não se torna desregulada ou autônoma, nem mesmo após ressecções consecutivas. Simpson e Finckh (1963) observaram completa restauração da massa hepática após uma série de 5 hepatectomias sucessivas, com intervalos de 5 a 7 semanas. Após a primeira hepatectomia parcial, a regeneração ocorreu às custas de aumento no número e no tamanho dos lóbulos hepáticos; enquanto que após as hepatectomias subseqüentes houve progressivo predomínio do aumento no número de lóbulos hepáticos.^{99,108}

Embora todas as células hepáticas participem do processo regenerativo, a maioria dos estudos focaliza os hepatócitos. Estes constituem cerca de 90% da massa hepática e 60% do número total de células. As células endoteliais e as células de Kupffer representam 35% da população celular hepática e 5-10% da massa hepática total.^{2,119}

A cinética da resposta regenerativa já está bem descrita em ratos. A síntese de DNA se inicia 10-14 horas após a HP, sendo o primeiro pico obtido em 24-26 horas após a cirurgia, com um segundo pico, menor que o primeiro, entre 36 e 48 horas após a HP. É seguida por uma onda de mitoses, que se inicia 22 a 24 horas após a HP, e cujo pico ocorre 32 a 34 horas após a cirurgia. O processo regenerativo geralmente se completa em 7 a 10 dias. A síntese de DNA nas

células não parenquimatosas (células endoteliais, ductais biliares, estreladas e de Kupffer) se inicia 24 horas após o início da síntese de DNA nos hepatócitos. Taxas máximas de mitose nas células de Kupffer, nas células endoteliais e nas células ductais biliares ocorrem 48, 96 e 48 horas após a HP, respectivamente.^{2,22,23,36,43,89}

Durante os primeiros 3 dias após a HP, 85% dos hepatócitos sintetizam DNA, com cerca de 80% da síntese ocorrendo nas proximidades do espaço porta (zonas 1 e 2 do ácino hepático de Rappaport). Hepatócitos localizados nas zonas 1 e 2 replicam o DNA mais precocemente que aqueles próximos à veia centrolobular (zona 3 do ácino hepático), com algumas células periportais podendo experimentar mais de um ciclo de replicação. O processo regenerativo após a HP ocorre predominantemente nas proximidades do espaço porta, uma vez que a grande maioria dos "novos hepatócitos" é formada a este nível.^{22,23,89}

O fator de necrose tumoral, α TNF, e a interleucina IL-6 são citocinas sintetizadas no fígado por células de Kupffer e células endoteliais em resposta à estimulação por endotoxinas. O α TNF atua como agente citotóxico em diversos tipos de lesão hepática, sendo também capaz de induzir a síntese de diversas citocinas, tais como o β_2 interferon e as interleucinas 1 e 6. O α TNF atua através de dois receptores distintos: o TNFR-1 e o TNFR-2. Os níveis séricos de α TNF e de interleucina 6 encontram-se elevados muito precocemente após a HP, e a administração de anticorpos anti- α TNF inibe a regeneração hepática após a HP em ratos, sugerindo que o α TNF pode ter importante participação na proliferação hepatocelular.^{1,26,108}

A síntese de DNA após a HP foi extremamente reduzida em camundongos deficientes em receptores TNFR-1, observando-se significativa mortalidade 24 a 40 horas após a cirurgia. Semelhantemente, camundongos deficientes em interleucina 6 apresentaram comprometimento da resposta regenerativa hepática, e a infusão de interleucina 6 corrigiu o déficit na replicação de DNA após a HP. Esses estudos revelam que o α TNF e seu receptor TNFR-1 são importantes para o processo regenerativo hepático após a HP. A perda tecidual aguda induz elevação dos níveis de endotoxina no sangue portal, estimulando a secreção de α TNF pelas células não parenquimatosas (células endoteliais e de Kupffer). O α TNF promove a ativação do fator de transcrição NF κ B e a secreção de IL-6, a qual, por sua vez, é capaz de ativar o fator de transcrição STAT3. Os fatores NF κ B e STAT3 atuam, respectivamente, sobre os oncogenes *c-myc* e *c-fos*, induzindo proliferação celular. Essa mesma via também deve estar envolvida no mecanismo regenerativo após lesão pelo tetracloreto de carbono.^{26,73,108}

O processo da regeneração hepática é dependente de energia cuja fonte primordial é a mitocondrial. Após ressecção do parênquima hepático há aumento da função mitocondrial no sentido de fornecer ao fígado remanescente (FR) energia necessária para que haja restauração da massa hepática por hiperplasia e hipertrofia celulares.

1.1. Estrutura e função mitocondrial

As mitocôndrias são organelas encontradas em quase todas células eucarióticas. Sua principal função é a produção de adenosina trifosfato (ATP) a partir de substratos respiratórios, sendo a principal moeda de troca entre a energia redox livre proveniente da oxidação dos substratos respiratórios em energia química, na forma de ATP. O ATP é utilizado por uma variedade de enzimas na execução das diversas funções celulares. Sendo assim, os organismos não poderiam viver nem mesmo por um momento, sem suprimento adequado de ATP.

A mais imediata função dos sistemas circulatório e respiratório é eliminar o dióxido de carbono e suprir os tecidos de oxigênio, o qual será utilizado pelas mitocôndrias como aceptor final de elétrons.

As mitocôndrias variam consideravelmente em forma e tamanho, mas todas mantêm a mesma arquitetura básica. Há uma membrana externa lisa formada por uma bicamada fosfolipídica contendo proteínas estruturais chamadas porinas, as quais permitem passagem de moléculas de até 10 kilodaltons (kDa). Dentro dessa membrana externa há uma membrana interna com inúmeras cristas, composta por uma estrutura que contém todos os complexos do sistema transportador de elétrons, a F_0F_1 -ATPase e proteínas de transporte, sendo permeável ao oxigênio, dióxido de carbono e água.

As membranas criam dois compartimentos na estrutura mitocondrial, uma região entre membranas, chamado de espaço intermembranas que desempenha importante função no processo de fosforilação oxidativa e o espaço

delimitado pela membrana interna que é chamado de matriz mitocondrial e contém as enzimas responsáveis pelo ciclo de Krebs.

O ciclo de Krebs, ou ciclo do ácido cítrico ou tricarboxílico é uma seqüência de reações mediadas por enzimas com a função de oxidar os substratos em um processo cíclico. O substrato mais reduzido, isto é com maior energia livre, é o ácido cítrico (citrato); em contrapartida o mais oxidado, com menor energia livre, é o ácido oxalacético (oxalacetato). O ácido cítrico pode ser regenerado pelo acoplamento do oxalacetato a duas unidades de carbonos, no caso do ciclo de Krebs, o acetil coenzima-A.

O acetil coenzima-A, gerado a partir do metabolismo de gorduras e açúcares, restabelece a energia livre do sistema. Outra forma de adicionar mais energia é a conversão de vários aminoácidos a intermediários do ciclo.

Em certos pontos do ciclo, as enzimas responsáveis pela reação conservam a energia livre reduzindo moléculas de nicotidamida-adenina dinucleotídeo (NAD^+) ou flavina-adenina dinucleotídeo (FAD), que funcionam como receptores de hidrogênio, dessa forma a oxidação fica associada a uma redução.

Esses dinucleotídeos em forma reduzida (NADH e FADH_2) são carreadores de energia, e entregam essa energia para moléculas presentes na membrana interna mitocondrial, sendo então reoxidados. As moléculas presentes na membrana interna são carreadores de energia de tipo diferente dos dinucleotídeos citados, pois transferem energia por meio de transporte de pares de elétrons através de uma cadeia de reações. Juntas, as moléculas transportadoras de elétrons da membrana interna mitocondrial são chamadas de sistema de transporte de elétrons.

1.2. Sistema de transporte de elétrons

O sistema de transporte de elétrons é composto pelos complexos I, II, III e IV, além de duas moléculas individuais, a coenzima Q e o citocromo C.

O NADH é reoxidado no complexo I (NADH-desidrogenase). O par de elétrons do NADH é passado do complexo I para a coenzima Q (complexo II, succinato-desidrogenase), liberando energia. Essa energia no complexo I faz com que cada par de elétrons que passe pela sua cadeia de reações, um par de prótons (H^+) seja forçado a passar da matriz ao espaço intermembranas.

O par de elétrons é então passado ao complexo III (Citocromo-c-redutase), em que mais prótons são forçados ao espaço intermembranas, bem como quando passam do complexo III ao IV. O complexo IV também chamado de citocromo-c-oxidase utiliza a energia recebida para reduzir oxigênio à água.

A transferência de equivalentes redutores até a formação de água gera um consumo de O_2 , que é denominado respiração mitocondrial, dessa forma o oxigênio precisa ser repostado, caso contrário, o transporte de elétrons pára. Cada carreador, uma vez reduzido, assim permanecerá até que haja aceptores de seus pares de elétrons e essa é a função principal do oxigênio no final do sistema de transporte de elétrons. Na ausência de oxigênio todos os carreadores do sistema de transporte de elétrons permaneceriam reduzidos. A necessidade de suprir o sistema de transporte de elétrons com oxigênio é a responsabilidade mais imediata do sistema respiratório e circulatório.

Na transferência dos elétrons através dos carreadores, o total de

energia livre cai, e cada carreador é mais eletronegativo do que imediatamente anterior. Parte da energia é perdida na forma de calor, mas uma quantidade significativa é armazenada na forma de gradiente de prótons no espaço intermembranas.

Porém, o oxigênio em concentrações altas torna-se tóxico em praticamente todas as células aeróbicas onde decorre a formação de Eros (espécies reativas de oxigênio) que podem interagir com diversas biomoléculas, com o objetivo de se estabilizar, lesando diferentes estruturas celulares. Em condições normais, a concentração destas espécies dentro da célula é extremamente baixa pelo fato de existirem enzimas antioxidantes que as removem, ou impedem sua formação. Estes radicais tendem a ser eliminados do organismo pelo conjunto das enzimas glutaciona peroxidase, glutaciona redutase, superóxido dismutase e pela catalase.

1.3. Gradiente eletroquímico de prótons (Δp) e Potencial de membrana das mitocôndrias ($\Delta \psi$)

O sistema de transporte de elétrons através dos complexos I, III e IV da cadeia respiratória é acompanhado de bombeamento de prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembranas. As membranas interna e externa mitocondriais são impermeáveis aos prótons, dessa forma esses são acumulados no espaço intermembranas, criando o que é chamado de gradiente eletroquímico de prótons. Esse gradiente eletroquímico de H^+ (Δp), gera um potencial elétrico de membrana ($\Delta \psi$) que atinge cerca de 180 mili Volts, no estado de repouso,

(negativo na matriz), cuja diferença de pH (ΔpH) é de 1 unidade (alcalino na matriz), assim, $\Delta p = \Delta\psi + \Delta\text{pH}$. A energia livre liberada no retorno dos prótons à matriz mitocondrial induz uma alteração conformacional do componente F_1 da $F_0F_1\text{-ATPase}$, liberando o ATP formado em seus sítios catalíticos⁷⁵.

A mitocôndria *in vivo* mantém seus gradientes de energia em níveis constantes, essa situação é assim mantida em razão de mecanismos de controle. A manutenção desse gradiente é chamada de controle respiratório.

O transporte de elétrons não prossegue se prótons não forem bombeados para o espaço intermembranas. Prótons não podem ser bombeados para o espaço intermembranas a menos que a energia disponível para movê-los para fora da matriz mitocondrial exceda a quantidade de energia requerida para o processo de transporte e da energia perdida em forma de calor.

De fato, o transporte de elétrons é estimulado pelo aumento da eletronegatividade dos carreadores e pela disponibilidade de substratos para fornecer elétrons, e limitado pelo gradiente eletroquímico, assim, o transporte de elétrons é estimulado proporcionalmente à energia perdida pelo gradiente eletroquímico.

Vários processos atuam no sentido de dissipar o gradiente eletroquímico do espaço intermembranas, mesmo em condições basais. Dessa forma o transporte de elétrons nunca pára totalmente, mantendo níveis mínimos de atividade, sendo que o principal processo de dissipação do potencial eletroquímico é a produção de calor para organismos homeotérmicos.

1.4. Síntese de ATP

Junto à membrana mitocondrial interna existe uma enzima denominada F_0F_1 -ATPase (complexo V). Esse complexo consiste basicamente em um canal de prótons (componente F_0) e um sítio catalítico para a síntese de ATP a partir de ADP e íon fosfato (componente F_1). Quando ADP e fosfato estão disponíveis, eles ligam-se aos sítios da F_0F_1 -ATPase, levando à abertura do canal de prótons e permitindo a volta desses à matriz mitocondrial. A energia envolvida no processo será usada para acoplar o fosfato ao ADP produzindo ATP.

O $\Delta\Psi$ pode também ser consumido, sem síntese de ATP, dissipando sua energia. Isso caracteriza o que é chamado de desacoplamento entre a respiração e a fosforilação oxidativa: os prótons ejetados da matriz da mitocôndria pela respiração retornam sem passar pelo canal de prótons da ATP-sintase, passo essencial para a fosforilação do ADP.

1.5. Transição e Permeabilidade Mitocondrial (TPM) / Intumescimento osmótico

Transição de permeabilidade foi primeiramente definida por Hunter e Havorth (1979)⁴⁴, os quais demonstram um edemaciamento mitocondrial induzido pelo acúmulo de Ca^{2+} , ocorrendo quando a mitocôndria passa do estado acoplado para o estado desacoplado. A matriz mitocondrial fica expandida,

permitindo a passagem de moléculas de baixo peso molecular ($PM < 1,5$ kDa), componentes de suporte osmótico, caracterizando um aumento inespecífico da permeabilidade da membrana mitocondrial interna ¹²², levando a mitocôndria ao estado intumescido, chamado de intumescimento osmótico.

O ponto chave da transição de permeabilidade é o acúmulo de Ca^{2+} na matriz mitocondrial, sendo que a quantidade de Ca^{2+} necessária para o início do intumescimento variam entre espécies ou mesmo entre órgãos. Embora a adição de Ca^{2+} seja suficiente para induzir a transição de permeabilidade, este fenômeno pode ser acelerado por ação de algumas substâncias designadas indutores ¹²²

O termo “transição” é usado porque a permeabilidade pode ser em parte revertida, logo após o início do processo, pela adição de quelantes de Ca^{2+} ou agentes redutores. A formação do poro pode ser estimulada por compostos capazes de aumentar o estresse oxidativo mitocondrial: fosfato inorgânico, oxidantes de nucleotídeos de piridina e de grupamentos tiólicos, protonóforos (carreadores de prótons) e outros. ^{54,55} Reagentes capazes de interferir no estado redox dos grupos tiólicos também parecem estar envolvidos na indução de transição de permeabilidade; dentre eles destacam-se os metais pesados, de transição e seus complexos (Hg^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+}) além das substâncias que induzem a formação de ligações cruzadas e pontes dissulfeto como diamida e a n-etilmaleimida ¹²²

Um dos mecanismos propostos para explicar o fenômeno da TPM baseia-se na ligação do Ca^{2+} a sítios internos da membrana permitindo a abertura de um canal hidrofílico transmembrana. Este poro é regulado pela ligação de Ca^{2+} na membrana no lado da matriz, revertida por EGTA e inibido por H^+ , Mg^{2+} e nucleotídeos de adenina ⁴⁴

Há evidências experimentais de que a TPM seria um evento essencial no processo de morte celular tanto por apoptose quanto por necrose. O aumento prolongado da concentração de Ca^{2+} no citosol e na matriz mitocondrial pode induzir essa permeabilização. Na morte celular por necrose, o teor de Ca^{2+} aumenta no citosol por falência dos mecanismos que promovem a retirada desse íon e a ocorrência da TPM generalizada leva à falta de ATP, seguida de morte celular.

Na morte por apoptose, a TPM seria um evento restrito aos locais de aumento do Ca^{2+} liberado de forma regulada pelo retículo endoplasmático. Nesse caso, a produção do ATP necessária para esse tipo de morte seria garantida por outras mitocôndrias não acometidas. Contrariando a opinião de alguns autores⁵ os quais afirmam que a abertura do poro de transição de permeabilidade induz a formação de espécies reativas de oxigênio (Eros), Kowaltowsky et al., 2001, afirmam que a transição de permeabilidade mitocondrial ocorre em resposta à formação de EROs. Assim sendo, durante este processo se abririam megacanaís na membrana mitocondrial interna, também denominados de poros de transição de permeabilidade, o que resultaria no desacoplamento momentâneo da respiração e eliminação de EROs. Caso ocorresse, o fechamento dos poros a respiração mitocondrial retornaria ao normal.

Se as EROs continuassem se acumulando, os poros de transição continuariam abertos resultando no inchaço e posterior ruptura da organela. Tal rompimento, por sua vez, levaria a liberação no citosol de proteínas "suicidas", descrita na literatura como fatores indutores da apoptose (AIF – acrônimo do inglês "Apoptosis-inducing factor") ou fatores ativadores das caspases (APAF – acrônimo do inglês "Apoptotic protease activating factor")¹¹¹.

Após a Hepatectomia Parcial (70%), em função, sobretudo da perda repentina do parênquima hepático, o fígado remanescente passa por alterações celulares intensas no sentido de se adaptar à nova situação hemodinâmica imposta pela hepatectomia.

Estudo realizado em animais com HP 70 % (Grupo I) e 85%(Grupoll), observou-se que no Grupo II após 2 dias não houve sobrevida (Falência Hepática Letal). Nas lâminas desses animais foram encontrados: grande congestão de distribuição irregular principalmente centrolobular, esteatose microvascular, regeneração hepática com importante número de mitoses, áreas de necrose centrolobular estavam presentes em diversas áreas seccionadas, grande números de PAS glóbulos (+) e alguns desses (+) para α -feto proteína, sendo estas alterações menos evidentes no Grupo I. Foram documentados também alterações no sistema de citocinas após HP letais e não letais, entretanto, após HP não letal notou-se um grande aumento de PGE_2 associado a um baixo aumento de $TNF\alpha$.⁸⁷

Nas HP a 70% o fígado remanescente (FR) que representa 30% continua recebendo o fluxo sanguíneo portal, que recebia o fígado em sua íntegra antes da hepatectomia parcial. Isto representa, per se, sobrecarga intensa ao FR que sofrerá nas próximas horas um grande estresse metabólico com intuito de adaptar o novo continente de 30% ao fluxo portal.

Este aumento do fluxo portal, em função do aumento da resistência imposta pelo reduzido FR, gera, tradicionalmente, um aumento da pressão na veia porta que acaba sendo um dos fatores desencadeadores do processo de regeneração hepática.

O sucesso das ressecções hepáticas depende, portanto, da capacidade metabólica e regenerativa do fígado remanescente e está diretamente

relacionado ao contínuo suprimento energético produzido pelas mitocôndrias.⁸⁷ Adicionalmente, foi demonstrado experimentalmente a capacidade da luz de LASER interferir no processo de regeneração do fígado, Castro e Silva et al., em 1991, pela primeira vez, relatou o incremento da regeneração hepática em ratos após hepatectomia a 70% e irradiação do fígado com laser argônio em todos os comprimentos de onda estudados¹⁰⁴. Nesse experimento houve um aumento das atividades mitocondriais e mitóticas hepáticas promovidas pela fotobioestimulação o que foi avaliado pela fosforilação oxidativa e proliferating cell nuclear antigen (PCNA)¹⁰⁴.

LASER é uma sigla que significa, em inglês, *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*. Em 1917, Albert Einstein escreve o artigo que lança os fundamentos da emissão estimulada de luz. O raio LASER surgiu no final da década de 1950 por meio de seu precursor o MASER - *Microwave light amplification by stimulated emission of radiation*. Todavia, foi em 1960 que Theodore Maiman apresentou ao mundo LASER cujo meio ativo era o cristal de rubi com feixe de luz na forma de pulsos e em 1961, foi desenvolvido os primeiros LASER de emissão contínua associada ao gás Hélio –n Neônio. E o Neodímio, Yang Laser , baseado na emissão de energia próxima do infra-vermelho do espectro da luz. Em 1962, surgiu o LASER de Argônio e Pateel, em 1964, desenvolveu-se o LASER de óxido de carbono.

Em 1972 começaram a ser descritos os efeitos biológicos do LASER quando se constatou o estímulo ao processo cicatricial em feridas cirúrgicas submetidas a irradiação LASER de baixa potência. Este efeito passou a ser chamado de fotobioestimulação⁷⁵.

Sobre sua ação no parênquima hepático pressupõe-se que o LASER conduza a

alterações conformacionais na estrutura do citocromos dos hepatócitos de modo que haveria um incremento na produção de ATP expressando um aumento no metabolismo energético do fígado de ratos submetidos a hepatectomia. No Brasil há mais de uma década uma série de estudos experimental tem sido realizada com o objetivo de analisar o efeito LASER sobre o fígado, sugerindo sua ação fotobioestimuladora na regeneração hepática^{81,104}

Assim, o objetivo do presente estudo é analisar as alterações da função mitocondrial na fase precoce da regeneração do FR após hepatectomia parcial a 70%, e o efeito da luz de LASER sobre as mitocôndrias hepáticas, nesta situação.

II - OBJETIVO

Este trabalho tem como objetivo estudar as alterações mitocondriais e o efeito da bioestimulação com LASER no fígado remanescente pós-hepatectomia a 70%, na fase aguda da regeneração hepática.

III - MÉTODO

3.1. Animais

Este trabalho foi realizado em 2 etapas distintas, onde na primeira fase foi estudada as alterações mitocondriais em tempos estabelecidos aleatoriamente, porém limitados a fase aguda da regeneração hepática. Na segunda etapa, foram selecionados através da observação dos tempos de maior significância da 1ª etapa a fim de serem bioestimulados com LASER, conforme relatos da literatura.

3.2. 1ª Etapa

Foram utilizados 96 ratos (n=96) machos da linhagem Wistar, com peso corporal entre 180-230g, fornecidos pelo Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, alimentados com ração padrão para laboratório (Purina Nutrimentos Ltda.) e água *ad libidum*. Os animais foram mantidos no Biotério do Laboratório de Técnica Cirúrgica e Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia e Anatomia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, em temperatura ambiente, sob um ciclo de 12 horas luz-escuro, em gaiolas de polipropileno translúcido com tampa de arame zincado, com dimensões de 41×34×16cm, com

população máxima de 5 animais. Os procedimentos foram realizados de acordo com as diretrizes da Comissão de Ética em Experimentação em Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, conforme Protocolo 226/2005.

Os animais foram submetidos à hepatectomia parcial de aproximadamente 70% do fígado, nos quais o remanescente hepático direito, correspondente aos lobos caudado e posterior direito, de acordo com método descrito por Higgins e Anderson, em 1931,⁴¹ e foram divididos em 16 grupos, com 06 animais por grupo (n=6), de acordo com tempo de eutanásia (C=0', 2', 5', 10', 15', 30', 1h, 2h, 4h, 6h, 12h, 1 dia, 2 dias, 3 dias, 6 dias, e 15 dias).

Os animais foram submetidos à anestesia, utilizando-se técnica inalatória com éter etílico, mantidos em decúbito dorsal.



Figura 1. Rato em decúbito dorsal, sob anestesia inalatória.

Após realização da tricotomia da região abdominal anterior e antissepsia com álcool iodado a 2%, os animais foram operados em ambiente limpo, porém

não asséptico.

Realizou-se abertura da parede abdominal por incisão longitudinal mediana, de 5 a 6 cm, a partir do apêndice xifóide. Foram identificados os lobos hepáticos e a seguir a ligadura com fio de algodão 2-0, próximo ao hilo, com objetivo de permitir a exérese dos 70% sem que haja hemorragia.

Posteriormente, decorrido o período de tempo pré-estabelecido, conforme cronograma abaixo, os animais foram submetidos à eutanásia por exsangüinação. Os animais, cujo tempo para eutanásia for inferior a 30' minutos não foram submetidos ao fechamento da parede abdominal, ficando estes sobre anestesia contínua. Os demais foram novamente submetidos à anestesia inalatória, relaparotomizados e realizada a coleta do fígado remanescente.



Figura 2. Laparotomia com identificação dos lobos hepáticos.

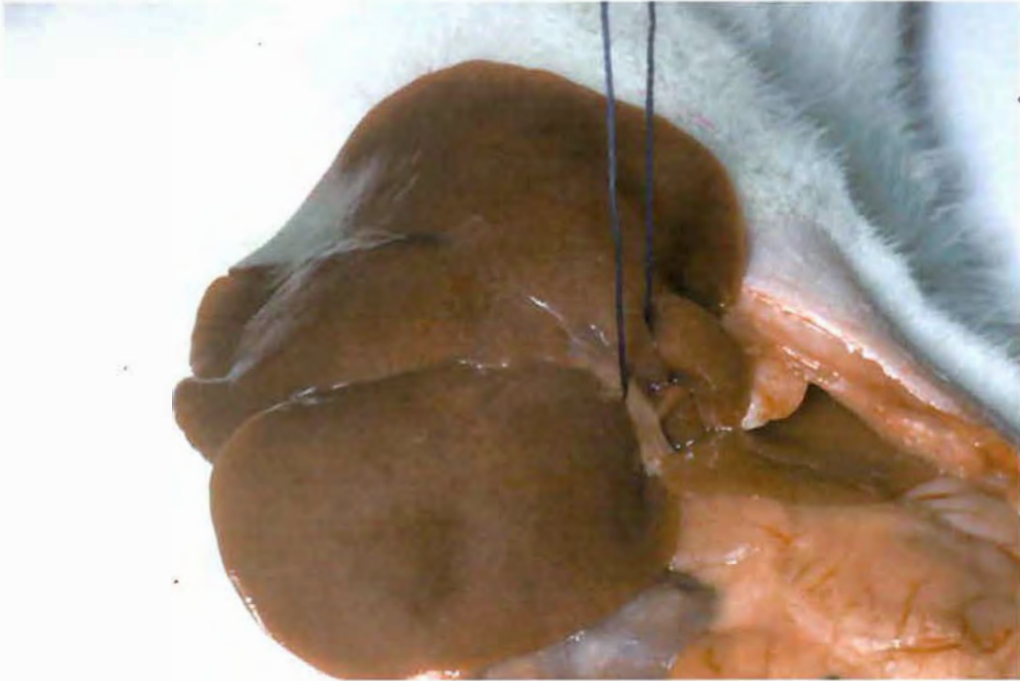


Figura 3. Ligadura do hilo dos lobos esquerdo e quadrado.



Figura 4. Remanescente hepático, lobo caudado e posterior direito.

3.3. 2ª Etapa - Aplicação do LASER na fase aguda da regeneração hepática

Neste estudo foram utilizados 30 animais divididos em 05 grupos de 6 animais (n=6), conforme padrão utilizado no experimento anterior, submetidos a hepatectomia parcial a 70% segundo Higguis & Anderson, em 1931⁴¹, diante das observações realizadas sobre a respiração mitocondrial e a regeneração hepática bem como o proposto por Silva Júnior que aponta o LASER de baixa potência como bioestimulante melhorando a regeneração hepática na sua fase aguda¹⁰⁰. Através desses indícios o remanescente hepático foi irradiado em 5 pontos distintos por LASER de luz vermelha com comprimento de onda 660 nm e potência de 50 mW no RH por um período de 30 segundos/ponto, na dose de 22,5 J/cm³ em cada um deles, imediatamente após a hepatectomia parcial¹⁰³.

Posteriormente, decorrido o período de tempo pré-estabelecido (C= 0', 2', 4h e 12h), foi realizada a coleta do remanescente hepático e os animais foram submetidos a eutanásia por exsanguinação. O remanescente foi enviado para o Laboratório de Técnica Cirurgia e Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia e Anatomia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.



Figura 5: Aparelho de LASER de baixa potência utilizado no grupo de pesquisas hepática na FMRP-USP



Figura 6: Bioestimulação com LASER de baixa potência no remanescente hepático pós hepatectomia a 70%.

3.4. Procedimentos Laboratoriais

3.4.1. Estudo da Função Mitocondrial

Amostras do fígado ressecado no momento do sacrifício foram coletadas para as análises bioquímicas da função mitocondrial (estados 3 e 4 da respiração mitocondrial, razão do controle respiratório (RCR), potencial de membrana e intumescimento osmótico), baseados nos estudos de Chance & Willians (1956)¹².

3.4.2. Isolamento das mitocôndrias do fígado

As mitocôndrias foram isoladas por meio de centrifugação diferencial¹⁰². O fígado removido foi lavado imediatamente em solução salina 0,9% gelada. Em seguida, foi colocado em meio de homogeneização contendo sacarose 250mM, EGTA 1mM, Hepes-KOH 10mM, pH 7,2 e picotado em pequenos fragmentos com auxílio de uma tesoura reta. Os fragmentos hepáticos foram processados em homogeneizador do tipo Potter Elvhjem por 3 segundos com intervalo de 1 minuto, por 3 vezes. O homogeneizado obtido foi centrifugado a 750 rpm por 5 minutos e o sobrenadante resultante foi novamente centrifugado a 1.200 rpm, por 10 minutos. O sedimento foi suspenso em 10ml de meio contendo sacarose 250mM, EGTA 0,3mM e Hepes-KOH 10 mM, pH 7,2 e centrifugado a 4320 rpm

por 15 minutos. Em seguida, as mitocôndrias foram suspensas novamente em 0,5ml de meio contendo sacarose 250mM e HEPES-KOH 10mM, pH7,2. Uma amostra desta preparação foi usada para dosagem de proteínas e os estudos com as mitocôndrias energizadas foram feitos dentro de um período máximo de 2 horas após seu isolamento. Todas as etapas foram realizadas a 4°C.

A concentração de proteína mitocondrial foi determinada espectrofotometricamente pelo método do Biureto ³⁷ modificado pela adição de colato 1% ^{47,89} utilizando-se BSA 1% como padrão.

3.4.3. Determinação do Consumo de Oxigênio pelas Mitocôndrias Energizadas

O consumo de oxigênio pelas mitocôndrias foi determinado polarograficamente a 30 °C, utilizando-se oxígrafo equipado com um eletrodo de oxigênio tipo CLARCK (Gilson Medical Electronics, Middleton, WI, E.U.A.). O meio de respiração (1,3ml) foi composto por sacarose 125mM, KCl 65mM, fosfato de potássio 2mM, cloreto de magnésio 1mM, EGTA 0,1mM e HEPES-KOH 10mM, pH 7,4, onde foi adicionado succinato de potássio 5mM e 2mg de proteína mitocondrial.

O estado 3 da respiração mitocondrial (estado ativado) foi obtido pela adição de 200nmoles de ADP às mitocôndrias energizadas. A relação entre a velocidade de respiração após adição de ADP (estado 3) e a velocidade do estado basal (estado 4), obtidas após o consumo de ADP, forneceu a razão do

controle respiratório (RCR). Os resultados obtidos dos estados 3 e 4 foram expressos em nano átomos de oxigênio/mg de proteína mitocondrial/minuto.

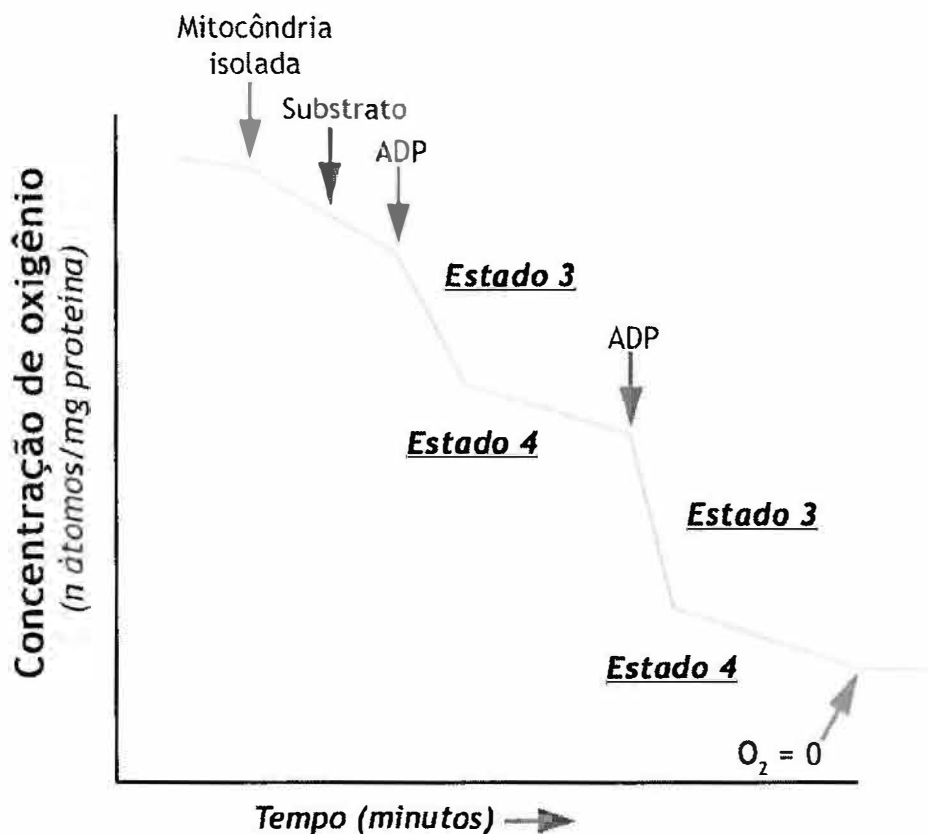


Figura 7. Representação gráfica da respiração mitocondrial nos estados 3 (respiração ativada por ADP) e estado 4 (respiração basal)

3.4.4. Determinação do Potencial Elétrico da Membrana Mitocondrial Interna

O potencial elétrico de membrana das mitocôndrias (PM) foi determinado espectrofluorimetricamente utilizando-se safranina O $5\mu\text{M}$ como indicador, em fluorímetro tipo SLM-AMINCO, em comprimentos de onda de 495nm para excitação e 586nm para emissão ¹⁸. As mitocôndrias foram incubadas em um

meio contendo sacarose 200mM, fosfato de potássio 2mM, EGTA 0,03mM, cloreto de magnésio 1mM e Hepes-KOH 10mM, em pH7,2, onde foi adicionado succinato de potássio 5mM. Após a estabilização do potencial de membrana, adicionou-se 1 μ M do desacoplador FCCP (carbonil cianeto *p*-(trifluoro-metoxi) fenilhidrazona).⁴² Os resultados obtidos (unidade relativa de fluorescência) foram convertidos em mV a partir de uma curva de calibração.

3.4.5. Intumescimento Osmótico das Mitocôndrias

O intumescimento osmótico mitocondrial ("swelling") foi estimado pela diminuição da densidade óptica (absorvância) da proteína mitocondrial (0,4mg) a 540nm, utilizando-se um espectrofotômetro BECKMAN DU-640B, após a adição de CaCl₂ 10 μ M e KH₂PO₄ 5 μ M. Os ensaios foram realizados em meio contendo sacarose 125mM, KCl 65mM, Hepes-KOH 10mM, pH7,4, energizado pela adição de succinato de potássio 5mM, segundo Kowaltowski et al. (1996). Os resultados foram expressos por variação da absorvância (Δ Abs).

IV - ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados dos vários grupos foram analisados e comparados pelos testes não paramétricos de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney. As diferenças foram significantes para $p < 0.05$.

V - RESULTADO

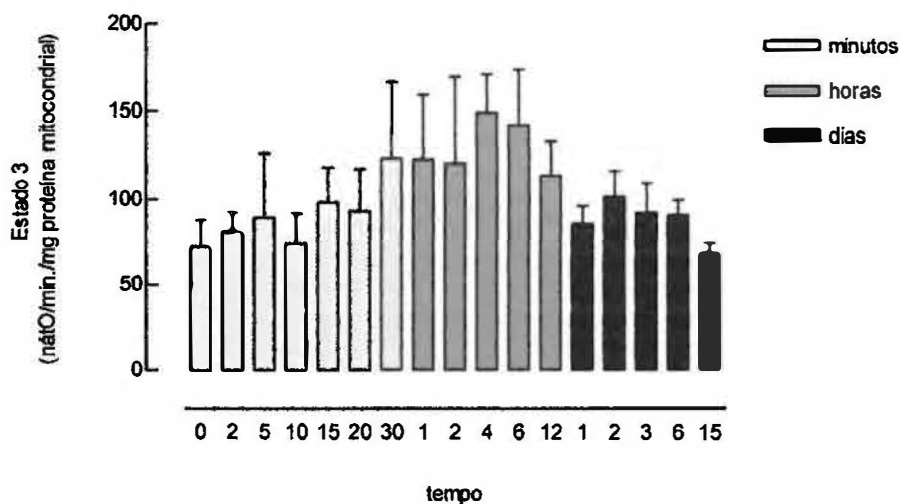


Figura 8 – Valores do consumo de oxigênio pelas mitocôndrias hepáticas no estado 3 da respiração mitocondrial expresso em n.at.O/minuto/mg.proteína mitocondrial nos respectivos tempos estudados.

0' X 30' - $p < 0,05$

4h X 1d - $p < 0,05$

A velocidade de consumo de oxigênio no estado 3 da respiração mitocondrial foi semelhante ao tempo controle 0 (zero) até 20 minutos após a hepatectomia parcial (HP). Nos tempos de 30 minutos até 6 horas pós HP houve aumento significativo do estado 3. Os valores de consumo de oxigênio no estado 3 após 1 dia da HP voltaram a ser semelhantes ao valor controle (tempo zero) ($P < 0,05$),

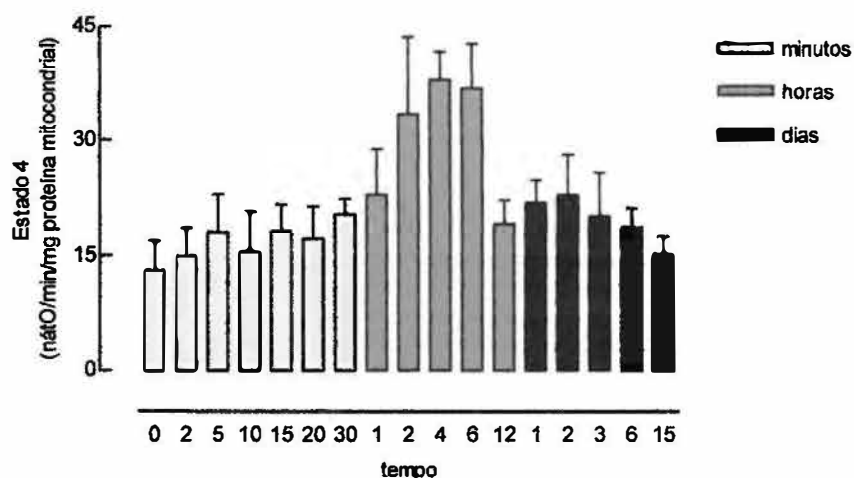


Figura 9 - Valores do consumo de oxigênio pelas mitocôndrias hepáticas no estado 4 da respiração mitocondrial, expressos em n.at.O/minuto/mg.proteína mitocondrial nos respectivos tempos estudados.

0' X 30' (p= 0,002)	0' X 2d (p= 0,0011)
0' X 1h (p= 0,0034)	0' X 3d (p= 0,0081)
0' X 12h (p= 0,0032)	0' X 6d' (p= 0,0057)
0' X 1d (p= 0,0011)	

A velocidade de consumo de oxigênio no estado 4 da respiração mitocondrial aumentou significativamente, em relação ao tempo controle 0 (zero) aos 30 minutos após a hepatectomia parcial (HP), atingindo seus valores máximos após 2, 4, e 6 horas após a HP. Após 12 horas até 6 dias os valores são menores que os valores máximos (2, 4 e 6 horas), porém permanecem maiores que o controle (tempo zero). Após 15 dias da HP os valores são semelhantes ao controle.

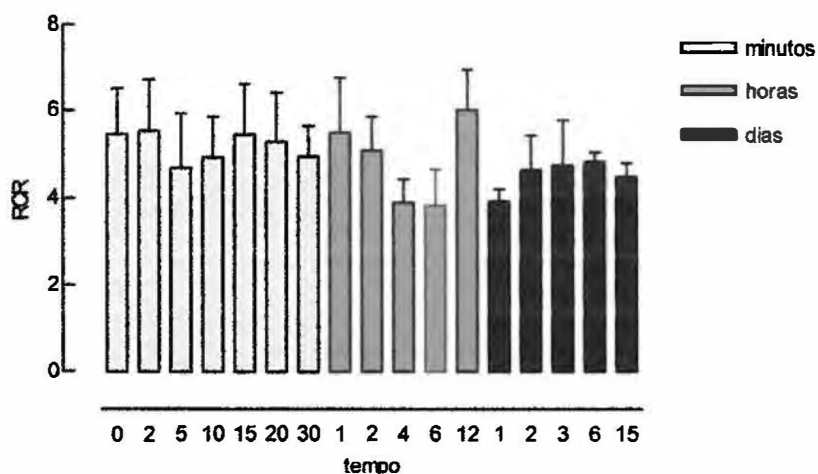


Figura 10 - Valores da razão do controle respiratório (RCR), referente ao estado 3 e 4 de consumo de oxigênio mitocondrial

0' X 4h (p= 0,0023)

0' X 6h (p= 0,0045)

0' X 1d (p= 0,0013)

1hX 4h (p= 0,0411)

A Razão de Controle Respiratório (RCR) se mantém estável entre 0 e 2 horas, com queda significativa no período de 4 a 6 horas em relação aos momentos anteriores.

No tempo 12 horas houve aumento significativo da RCR em relação aos momentos subsequentes.

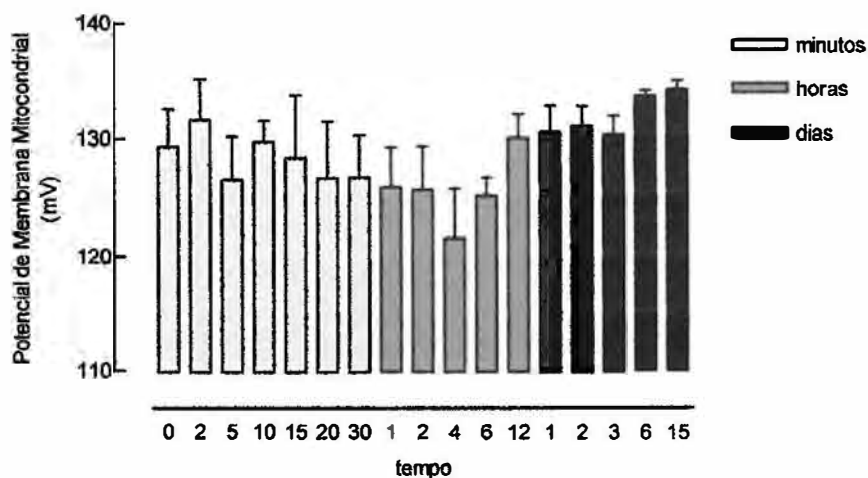


Figura 11 - Valores do Potencial de Membrana (PM) em mV nos diversos grupos estudados, referentes aos respectivos tempos de eutanásia.

0' X 2h (p= 0,0388)

0' X 4h (p= 0,0029)

0' X 6h (p= 0,0111)

O potencial de membrana mitocondrial (PM) diminuiu significativamente a partir de 2 horas em relação ao grupo controle (tempo 0), atingindo valor mínimo em 4 horas após hepatectomia parcial. O retorno aos valores semelhantes ao grupo controle ocorreu a partir de 12 horas.

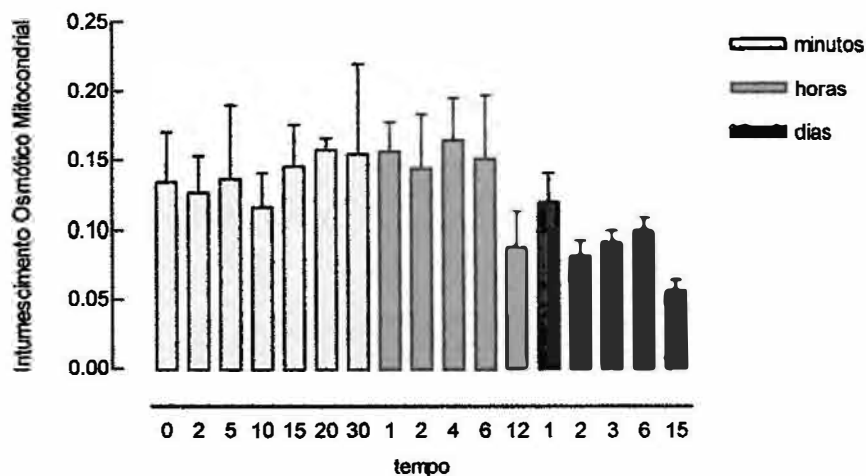


Figura 12 – Valores do intumescimento osmótico mitocondrial, (Δ Abs) em relação aos tempos de eutanásia, nos diversos grupos estudados.

0' X 12h ($p= 0,0064$)

6h X 12h ($p= 0,0111$)

12h' X 15d ($p= 0,0175$)

O intumescimento osmótico mitocondrial, até 6 horas, não houve diferenças significativas entre os grupos estudados. Com 12 horas após hepatectomia parcial houve diminuição significativa permanecendo com valores semelhantes até 6 dias. Com 15 dias os valores foram menores do que em todos os tempos estudados.

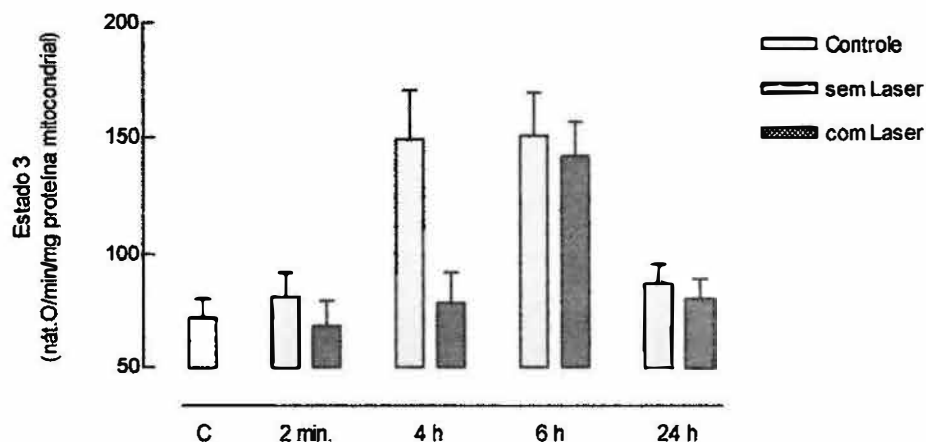


Figura 13 - Valores do consumo de oxigênio pelas mitocôndrias no estado 3 expressos em n.at.O/minuto/mg.proteína mitocondrial nos respectivos tempos estudados, relacionando grupos de ratos, que foram e não, submetidos a bioestimulação com LASER.

A velocidade do consumo de oxigênio no estado 3 da respiração mitocondrial no grupo bioestimulado manteve-se próximos aos valores de controle (tempo 0) até 4 horas, quando houve um aumento no consumo de oxigênio chegando ao seu pico máximo no tempo de 6 horas, equiparando-se aos valores dos grupos que não foram bioestimulados a partir de 24 horas. Porém os parâmetros não foram significativos estatisticamente.

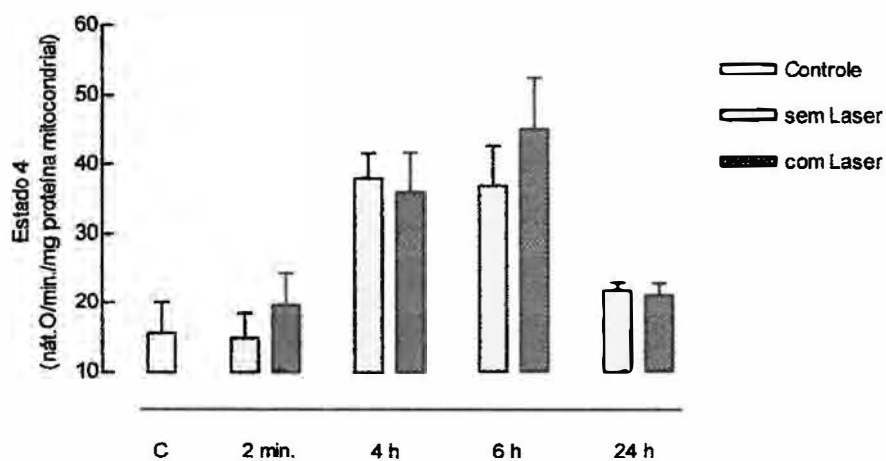


Figura 14 - Valores do consumo basal de oxigênio pelas mitocôndrias no estado 4 expressos em n.at.O/minuto/mg.proteína mitocondrial nos respectivos tempos estudados, relacionando grupos de ratos, que foram e não, submetidos à bioestimulação com LASER.

A velocidade de consumo de oxigênio no estado 4 da respiração mitocondrial mostrou valores semelhantes até 4 horas, entre os grupos bioestimulados e o controle (não exposto à luz LASER). O LASER induziu a um aumento do consumo de oxigênio em 6 horas pós hepatectomia em relação ao grupo não bioestimulado, voltando as mesmas proporções após 24 horas.

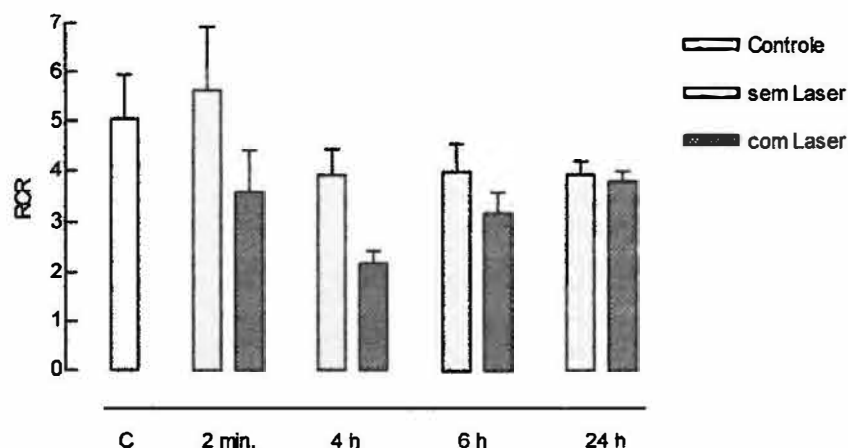


Figura 15 - Valores da razão do controle respiratório (RCR), referente ao estado 3 e 4 de consumo de oxigênio mitocondrial nos respectivos tempos estudados, relacionando grupos de ratos, que foram e não, submetidos a bioestimulação com LASER.

2' (s/LASER) X 2' (c/LASER) ($p= 0,0152$)

6h (s/LASER) X 6h (c/LASER) ($p= 0,0152$)

A Razão do Controle Respiratório (RCR) mostrou uma diminuição significativa no grupo bioestimulado a partir de 2 minutos em relação ao grupo controle (não estimulado com a luz de LASER), apresentando um pico mínimo em 4 horas e mantendo uma relação inferior ao controle até 24 horas, quando os valores se tornam proporcionais.

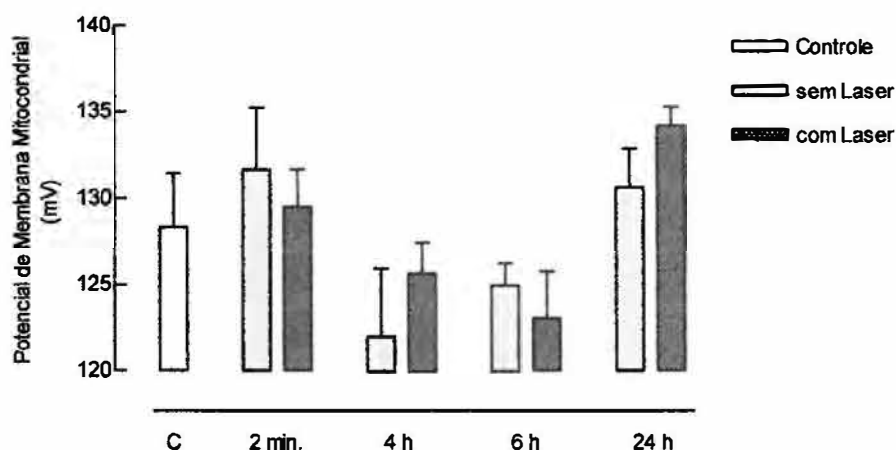


Figura 16 - Valores do Potencial de Membrana (PM) em mV, referentes aos respectivos tempos de eutanásia, relacionando grupos de ratos, que foram e não, submetidos à bioestimulação com LASER.

4h (s/LASER) X 4h (c/LASER) ($p= 0,0411$)

24h (s/LASER) X 24h (c/LASER) ($p= 0,0087$)

O Potencial de Membrana Mitocondrial apresentou uma diferença significativa entre os grupos bioestimulados com a luz LASER e o controle a partir de 4 horas pós hepatectomia, com queda importante do grupo sem LASER. Notou-se uma queda semelhante no grupo bioestimulado em 6 horas com uma tendência a equiparação dos valores após 24 horas.

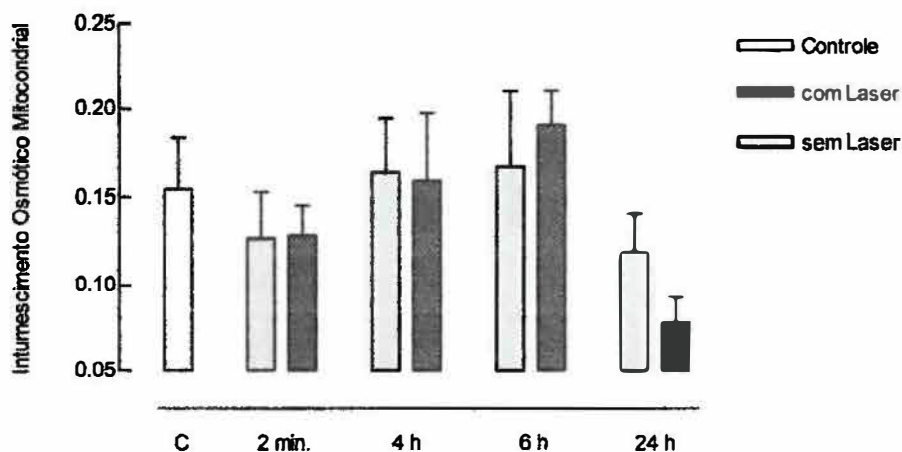


Figura 17 - Valores do intumescimento mitocondrial, (Δ Abs) em relação ao tempo, referentes aos respectivos tempos de eutanásia, relacionando grupos de ratos, que foram e não, submetidos à bioestimulação com LASER.

24h (s/LASER) X 24h (c/LASER) (p= 0,0022)

O Intumescimento Osmótico Mitocondrial apresentou-se com valores semelhantes entre o grupo bioestimulado e o grupo não irradiado pela luz LASER até 6 horas pós hepatectomia parcial, mostrando uma queda significativa do grupo bioestimulado em relação ao não estimulado com 24 horas do experimento.

VI - DISCUSSÃO

Além das cirurgias hepáticas, como as ressecções parciais para exérese de tumores, os transplantes convencionais com doador cadáver, transplantes intervivos, o fígado também pode ser acometido tanto no trauma aberto como no trauma fechado do abdome, com necessidade eventual de ressecções parciais do parênquima hepático.

Nos casos onde é necessária realização de hepatectomia parcial (HP), o fígado remanescente (FR) tem capacidade de regenerar-se. A porção remanescente, se corresponder a mais de 20% do volume total do órgão e for histológica e funcionalmente normal, pode refazer, em poucos meses, tecidos funcionantes equivalente ao volume hepático perdido¹¹¹.

Modelos experimentais têm sido desenvolvidos para estudo deste fascinante aspecto regenerativo. O modelo experimental mais utilizado tem sido o desenvolvido por Higgins e Anderson em 1931⁴¹. Consistindo de ressecção parcial de dois terços do fígado, remove-se os dois lobos frontais os quais constituem em torno de 70% de tecido hepático. Nesse modelo, a HP tem a vantagem de induzir resposta regenerativa sem que ocorra lesão no tecido remanescente diferindo dos processos lesivos causados por agentes tóxicos, virais, câncer ou cirrose, onde a capacidade regenerativa dos hepatócitos está comprometida. Nestes casos, onde a capacidade de proliferação dos hepatócitos encontra-se inibida entram em cena células capazes de diferenciar-se em tecido hepático como as células tronco do próprio fígado, células ovais, e células tronco extra hepáticas, como as células

tronco de origem hematopoéticas. Além destes mecanismos celulares uma série de genes, citocinas, fatores de crescimento estão envolvidos neste processo regenerativo. O mecanismo exato de regeneração e interação entre células e citocinas ainda não se encontra completamente elucidado.⁶³

A regeneração hepática (RH) é, portanto, reconhecida como um espetacular exemplo de crescimento tecidual do parênquima hepático remanescente. A perda do parênquima desencadeia o processo regenerativo até que o peso hepático original seja restaurado. A restauração da massa hepática ocorre por hiperplasia celular compensatória no parênquima remanescente⁹⁴. Após, há síntese de DNA, se a quantidade de tecido removido for superior a 30% da massa hepática. Em cirurgias com ressecção de mais de 80%, a eficiência da regeneração é geralmente inferior àquela observada na hepatectomia parcial "standard"²³ a 70%, onde a cinética da resposta regenerativa já está bem descrita^{20, 34, 89,103}. A síntese de DNA inicia-se em 12-16 horas após a HP, com um pico 24-26 horas após a cirurgia. É seguida por uma onda de mitoses, que se inicia 22-24 horas após a HP, e cujo pico ocorre 32-34 horas após a HP. Cerca de 85% dos hepatócitos sintetizam DNA durante os primeiros 3 dias após a cirurgia.

O processo regenerativo, em ratos, geralmente se completa em 7 a 14 dias. A síntese de DNA nas células não parenquimatosas inicia-se 24 horas após o início da síntese de DNA nos hepatócitos⁷³. Estudos recentes em nosso laboratório, mostraram claramente, que entre 7 e 14 dias após HP a 70%, em ratos, o fígado recupera sua massa hepática inicial e que no período de 24 a 96 horas pós HP 70% há intensas alterações bioquímicas e estruturais no parênquima hepático, suficientes para alterar significativamente a auto-

fluorescência hepatocelular, que pode ser medida por espectroscopia de fluorescência a LASER.⁴ Estas alterações de fluorescência podem estar relacionadas com as intensas modificações celulares e moleculares, próprias deste período, e que são fruto do processo de regeneração e adaptações das células do fígado remanescente à nova condição energética, em resposta à redução do parênquima hepático. Alguns estudos que focalizam alterações bioquímicas no parênquima hepático durante a regeneração, verificaram alterações importantes, entre as quais acúmulo momentâneo de triglicérides, elevação de isoenzimas fetais e aumento nos níveis de enzimas associadas à síntese de DNA. Uma conclusão importante consiste no fato de que, embora a grande maioria dos hepatócitos participem da resposta regenerativa após a HP, permanecem preservadas a maioria das funções necessárias a homeostase orgânica, incluindo síntese de albumina, de fatores de coagulação, bile e manutenção da glicemia, da atividade do ciclo da uréia e dos níveis normais de nitrogênio ureico. Não obstante as extensas perdas de parênquima após a HP, surpreendentemente são pequenas as alterações nas concentrações plasmáticas de fatores ou macromoléculas sintetizados pelo fígado (albumina, fatores de coagulação, etc.). Os níveis glicêmicos permanecem constantes, mesmo quando o jejum é mantido no pós-operatório, devido a um significativo aumento da capacidade gluconeogênica no fragmento hepático remanescente. O suprimento energético necessário à manutenção das atividades metabólicas e da regeneração é mantido por um elevado afluxo de ácidos graxos livres aos hepatócitos^{65, 73, 88}.

Em casos onde a HP é acompanhada de importante perda sangüínea, com instalação de choque circulatório hemorrágico, tanto mais grave quanto maior o tamanho da lesão hepática há diminuição da intensidade do processo regenerativo. Conforme Frank e col. ^{30,31}, após hemorragia superior a 35% da volemia, o fígado torna-se incapaz de sintetizar proteína, mesmo que não tenha sido atingido no trauma. Essa incapacidade reflete-se na diminuição das taxas de protrombina e fibrinogênio, o que agrava a hemorragia. No trauma de fígado, nos casos de trauma de tipos I e II, a hemorragia em geral não atinge esses níveis, o metabolismo mantém-se nos limites da normalidade. Bastam 15% de fígado normal para produzir a desaminação dos aminoácidos para uréia. Porém, no trauma hepático grave, acompanhado de choque prolongado, altera-se o metabolismo de proteínas, lipídios e glicídios, com diminuição do glicogênio e aumento da acidez láctica e cetônica.

As repercussões do choque sobre a célula hepática são importantes porque ela suporta mal a hipóxia. Liberam-se peptídeos vasoativos, diminui a síntese das proteínas, aumentam os aminoácidos e ácidos graxos, agravando-se a acidose. Alteram-se a permeabilidade vascular e celular, passando água e sódio para dentro da célula e saindo potássio. Esses efeitos surgem após lesão hepática extensa no trauma, ou no estabelecimento de hipovolemia prolongada, mesmo de origem em outros locais. Comprometem, pois, as condições necessárias para conduzir a seqüência de eventos que levam à regeneração hepática¹⁰⁴.

Isto posto, após perda de massa hepática por ressecção de parte do fígado, torna-se fundamental a manutenção do *status* metabólico e do processo

de regeneração hepática para a manutenção da função do órgão. Por outro lado, alterações hemodinâmicas por sangramentos de intensidades variáveis, que invariavelmente acompanham as ressecções hepáticas eletivas e, sobretudo os traumas hepáticos graves, impõem ao organismo um prejuízo funcional sistêmico, comprometendo a função hepática. Da mesma forma, na cirrose hepática, de qualquer etiologia, o fígado apresenta diminuição significativa da reserva funcional o que impede ou dificulta a manutenção de seu *status* metabólico não sendo possível nesta situação, grandes ressecções hepáticas.

Assim, sendo necessária a ressecção parcial, a garantia de boa reserva metabólica do fígado remanescente, é pressuposto mínimo para a indicação de ressecção parcial do fígado. A hepatectomia impõe ao lobo remanescente sobrecarga metabólica, uma vez que, além de ter que arcar com todas as funções hepatocelulares deverá dispende energia adicional para necessária adaptação hemodinâmica e para desencadear o processo regenerativo.

No presente estudo, a hepatectomia a 70% foi realizada em condições de normovolemia. Sabe-se que, mesmo nessas condições o fígado remanescente (FR) passa por significativo *stress* oxidativo, sobretudo, na fase pré-replicativa da regeneração hepática nas primeiras 24 horas pós-hepatectomia e que pode ser evidenciado pelo aumento significativo de malondialdeído (MDA)³⁹ e pelos níveis aumentados de estado 3 e 4, verificados no presente estudo, nos tempos de 4 e 6 horas após a ressecção do fígado. Esta sobrecarga metabólica ocorre, sobretudo, em função, da necessidade do FR de regenerar-se, manter a capacidade metabólica, e de adaptar-se hemodinamicamente diante de um desbalanço induzido pela diminuição do continente e relativo aumento do conteúdo hepático

de sangue ^{29, 63, 66,115}. Diante deste *stress* metabólico, o FR apresenta significativas alterações moleculares e celulares que, dependendo da magnitude da ressecção hepática e das alterações hemodinâmicas do hospedeiro, podem induzir graus variados de insuficiência hepática ^{29, 46, 63, 64,66}.

Após a ressecção parcial do fígado, há aumento significativo do fluxo hepatoportal e da pressão portal e conseqüente ingurgitamento do FR que, ao mesmo tempo em que levam a um estado de isquemia funcional hepatocelular parecem servir como indutores da regeneração hepática, necessária tanto à manutenção do trofismo hepatocelular quanto para sobrevivência do hospedeiro. ⁵⁶ ^{59,68}. Nesta fase precoce da regeneração hepática há, portanto, uma relação alterada entre a necessidade e a oferta de energia ao fígado remanescente, sobretudo pela diminuição abrupta do parênquima hepático. Da mesma forma que nutrientes não são devidamente aproveitados pelas células hepáticas, o oxigênio disponível também acaba por não ser totalmente reduzido, determinando a formação de radicais livres pelas células de Kupffer, neutrófilos, cadeia respiratória mitocondrial, microsossomos, xantinas oxidases, entre outros³⁹. Estes radicais livres do oxigênio, ao mesmo tempo em que induzem ou facilitam o processo de regeneração hepática, determinam alterações estruturais e funcionais das mitocôndrias, podendo alterar os parâmetros relacionados ao consumo de oxigênio pelas mitocôndrias, o potencial de membrana e ainda provocar a abertura de poros de transição de membrana. O processo de regeneração hepática do fígado remanescente depende fundamentalmente da energia produzida pela oxidação fosforilativa mitocondrial, que invariavelmente está comprometida nas primeiras 24 horas pós-hepatectomia. ^{76,112}

Trabalhos na literatura mostram que o remanescente hepático normal apresenta uma carga energética e níveis de ATP hepáticos diminuídos, 24 horas após a ressecção hepática ^{76,112}. Alterações na função mitocondrial, incluindo mudanças nos valores da RCR, também são observadas neste período e em uma fase mais precoce ^{39, 112}.

No presente estudo determinou-se, com relação à função mitocondrial, que a sobrecarga metabólica do FR manifestou-se, sobretudo no período de 4 e 6 horas após a secção do parênquima hepático com um aumento significativo da respiração ativada por ADP (estado 3) e um aumento concomitante da respiração mitocondrial basal (estado 4) com manutenção da RCR, o que mostra a manutenção do acoplamento entre o processo de oxidação e fosforilação das mitocôndrias hepáticas. Do mesmo modo, observou-se redução significativa do potencial elétrico da membrana mitocondrial, sem, entretanto, haver edema mitocondrial efetivo, neste mesmo período (4 a 6 horas pós HP).

Observou-se que 24 horas pós HP, apesar dos parâmetros respiratórios (estado 3, estado 4, RCR, PM) retornarem aos níveis controles, as mitocôndrias mostraram-se levemente intumescidas, o que sugere o envolvimento dos poros de transição de membrana mitocondrial no processo de regeneração hepática, vindo em concordância com outros estudos prévios, que sugerem que durante a fase pré-replicativa da regeneração hepática, as mudanças na ultra estrutura mitocondrial estão correlacionadas com aumento do conteúdo de Ca⁺⁺ mitocondrial, induzindo à transição da permeabilidade nas mitocôndrias ^{37, 39, 74}.

Estes dados reforçam os achados de outros trabalhos do grupo e sugerem que a sobrecarga metabólica do FR induzida pela hepatectomia per si, indicada

de forma sensível pelas alterações mitocondriais encontradas nas primeiras horas pós hepatectomia,^{37, 74, 75,112} provavelmente é consequência de uma instabilidade entre a necessidade e oferta de energia ao FR.^{67, 90, 91, 94, 99,100} Com a adaptação hepatocelular, essas alterações mitocondriais encontradas vão se normalizando com o passar das horas após a ressecção, quando o FR vai adquirindo novo *status* metabólico, constatado pela normalização da maioria dos parâmetros mitocondriais, num mecanismo de crescimento compensatório do RH.^{90,91,93,99,100} Como mostra os dados da literatura^{29,46,63,64,66,75,114}, todo este processo certamente é de natureza multifatorial o que é reforçado pela resposta variável da função mitocondrial à ação da luz LASER, sabidamente um estabilizador de membranas celulares^{58,68,93,111,112}, nos diferentes tempos após a hepatectomia parcial. Com relação ao estado 3 o LASER leva a diminuição significativa da respiração ativada por ADP após 4 horas, mas não após 6 horas após a HP. O LASER não alterou o estado 4 da respiração mitocondrial em relação aos controles e mesmo reduzindo os níveis de RCR, não causou desacoplamento mitocondrial. Em suma, numa análise global, o LASER, na dose utilizada no presente estudo, não induziu lesão adicional ao FR e parece ter retardado o surgimento do *stress* metabólico hepatocelular do fígado remanescente. Na seqüência, outros estudos deverão ser programados para se estabelecer com melhor precisão os eventos metabólicos que ocorrem pós - hepatectomia parcial e a possível ação da luz LASER sobre o fígado, após as ressecções hepáticas parciais.

VII - CONCLUSÃO

Neste trabalho evidenciou-se que a sobrecarga metabólica, medida pelo consumo de O₂, na fase aguda da regeneração hepática, foi significativa no intervalo entre 4 e 6 horas tendendo a uma estabilização subsequente. Quanto aos grupos bioestimulados com a luz de LASER, obteve-se respostas variáveis.

VIII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AKERMAN, P.; COTE, P.; YANG, S.Q.; MCCLAIN, C.; NELSON, S.; BAGBY, G.J.; DIEHL, A.M. – Antibodies to tumor necrosis factor-alpha inhibit liver regeneration after partial hepatectomy. *Am. J. Physiol.* 263: G579-85, 1992.
2. ALISON, M.R. - Regulation of hepatic growth. *Physiol. Rev.*, 66: 499-541, 1986.
3. ANDERSON, W.R.; ZIEVE, L.; LINDBLAD, S. Ultrastructural study of hepatic regeneration following one-lobe, two-lobe, and subtotal hepatectomy *in the rat. Exp. Pathol.*, 38: 61-72, 1990.
4. BAGNATO, V.S.; LIRACJO, C.; FERREIRA, J.; SANKARANKUTTY, A.K.; ZUCOLOTO, S.; CASTO E SILTVA, O. ; New photonic technologies for the treatment and diagnosis of hepatic diseases: An overview of the experimental work performed in collaboration, between Physics Institute of São Carlos and Ribeirão Preto Faculty of Medicine of University of São Paulo: *Acta Cir Bras* [serial on the Internet] 2006; 21 Suppl 1. Available from URL: <http://www.scielo.br/acb>.
5. BATANDIER, C.; LEVERVE, X. Opening of the mitochondrial permeability transition pore induces reactive oxygen species production at the level of the respiratory chain complex I. *J. Biol. Chem.*, v. 279, p. 17197-17204, 2004.
6. BEAL, S.L. *Fatal hepatic hemorrhage: an unresolved problem in the management of complex liver injuries. J Trauma* 1990; 30: 163-9.
7. BEDIRLI A, KEREM M, PASAOGLU H, ERDEM O, OFLUOGLU E, SAKRAK O. Effects os Ischemic Precontitioning on Regenerative Capacity of Hepatocyte in the Ischemically Damaged Rat Livers. *Journal of Surgical Research* 125, 42-48 (2005).
8. BRIZOTTI, J.L; CENTURION, S; REIS, J. M. C; PACHECO E.G; SANKARANKUTTY, A. K; MENTE, E. E; SILVA JUNIOR, O. C. Aspecto do Remanesc ente Hepático em Condições de isquemia e Reperfusão após Hepatectomia Parcial. *Acta Cirúrgica Brasileira*, v. 16 n. supl 1, p 88-89, 2001.
9. BUCHER, N.L.R. - Regeneration of the mammalian liver. *Int. Rev. Cytol.*, 15: 245-300, 1963.
10. BUCHER, N.L.R. & SWAFFIELD, M.N. - Rate of incorporation of labeled thymidine into deoxyribonucleic acid of regenerating rat liver in relation to amount of liver excised. *Cancer Res.*, 24: 1611-25, 1964.
11. BUCHER, N.L.R.; SWAFFIELD, M.N.; DI TROIA, J.F. - Influence of age upon incorporation of thymidine-2-C¹⁴ into DNA of regenerating rat liver. *Cancer Res.*, 24: 509-12, 1964.

12. CHANCE, B; WILLIAMS, G.R. The respiratory chain and oxidative phosphorylation. Adv. Enzymol. BEAL, S.L. *Fatal hepatic hemorrhage: an unresolved problem in the management of complex liver injuries. J Trauma* 1990; 30: 163-9.
- v.17, p. 65-134, 1956.
13. CHANCE, B. Quantitative aspects of the control of oxygen utilization. In: WOLSTENHOLME, G. E. N. & CONNOR, C. M. (eds.) *Regulation of cell metabolism*. 2nd. Edition. Boston, Little Brown Ed., 1959.
14. CHANCE, B.; WILLIAMS, G. R. Respiration enzymes in oxidative phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 1956, 217: 409-427
15. CLAVIEN, P.-A. – IL-6, a key cytokine in liver regeneration. *Hepatology*, 25: 1294-96, 1997.
16. CARRILLO, E.H.; SPAIN, D.A.; WOHLTMANN, C.D.; SCHMIEG, R.E. ; BOAZ, P.W.; MILLER, F.B. *et al.*, *Interventional techniques are useful adjuncts in nonoperative management of hepatic injuries. J. Trauma* 46 (1999), pp. 619–622 discussion 622-4 .
17. COGBILL, T.H.; MOORE, E.E.; JURKOVICH, G.J.; FELICIANO, D.V.; MORRIS, J.A. AND MUCHA, P. *Severe hepatic trauma: a multi-centre experience with 1335 liver injuries. J Trauma* 28 (1988), pp. 1433–1438
18. COLLONNA, R.; MASSARI, S.; AZZONE G.F. The problem of cation binding sites in the energized membrane of the intact mitochondria. *Eur J Biochem* 1973 May 2;34(3):577-85.
19. COURT, F.G.; WEMYSS-HOLDEN, S.A.; DENNISON A.R.; MADDERN, G.J. *The mystery of liver regeneration. British Journal of Surgery* 2002, 89, 1089-1095
20. CROCE MA, FABIAN TC, MENKE PG, WADDLE-SMITH L, MINARD G, KUDSK KA ET AL. *Nonoperative management of blunt hepatic trauma is the treatment of choice for hemodynamically stable patients: results of a prospective trial. Ann Surg* 1995; 221: 744-55.
21. CRUISE, J.L.; COTECCHIA, S.; MICHALOPOULOS, G.K. *Norepinephrine decreases EGF binding in primary rat hepatocyte cultures. J. Cell. Physiol.*, 127: 39-44, 1986.
22. EDWARDS, J.L. & KOCH, A. - Parenchymal and littoral cell proliferation during liver regeneration. *Lab. Invest.*, 13: 32-43, 1964.
23. FABRIKANT, J.I. - Kinetics of cellular proliferation in regenerating liver. *J. Cell Biol.* 36: 551-65, 1968.

24. FAUSTO, N. Hepatic regeneration. IN: ZAQUIM, D. & BOYER, T.D. – *Hepatology. A Textbook of Liver Disease*. Philadelphia, W.B. Saunders, p. 49-65, 1990. HIGGINS, G.M.; ANDERSON, R.M. Experimental pathology of the liver: I. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch. Pathol.* 12: 186-202, 1931.
25. FAUSTO, N. *New perspectives on liver regeneration. Hepatology* 6: 326-7, 1986.
26. FAUSTO, N. - Liver regeneration. *J. Hepatol.*, 32 (suppl. 1): 19-31, 2000.
27. FAUSTO, N.; MEAD, J.E.; GRUPPUSO, P.A.; BRAUN, L. - TGF β in liver development, regeneration and carcinogenesis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 593: 231-42, 1990
28. FELICIANO, D.V., PACHTER, H.L. *Hepatic trauma revisited. Curr Probl Surg* 1989; 26: 453-524
29. FLEIG, W.E. & HOSS, G. Partial purification of rat hepatic stimulator substance and characterization of its action on hepatoma cells and normal hepatocytes. *Hepatology*, 9:240-8, 1989.
30. FOUAD, F.M; MAMER, O. A; SHAHIDI, F. Bio genesis of Hepatic Acute-Phase Response to Trauma. *Medical Hypotheses*, 47, 157-177, 1996.
31. FRANK, E.D.; FRANK, H.A.; FINE, J. Traumatic shock. Plasma fibrinogen in hemorrhagic shock in dog. *Am J Physiol* 162:619, 1950.
32. FRANK, E.D.; FRANK, H.A.; FINE, J. *Traumatic shock. Protrombin activity in hemorrhagic shock in dog. Am J Physiol.* 167:499, 1951.
33. FREIRE, E.C.S. *Traumatismos do Fígado. In Vinhaes JC. Clínica e Terapêutica Cirúrgicas. Ed Guanabara, Rio de Janeiro, pp 839-851, 1997.*
34. FULCERI, R.; BELLOMO, G.; MIRABELLI, F.; GAMBERUCCI, A.; BENEDETTI, A. Measurement of mitochondrial and nonmitochondrial Ca⁺⁺ in isolated intact hepatocytes: a critical reevaluation of the use of mitochondrial inhibitors. *Cell Calcium* 1991 Jun;12(6):431-9.
35. GERBER, M.A.; THUNG, S.N.; SHEN, S.; STROHMEYER, F.W. & ISHAK, K.G. - Phenotypic characterization of hepatic proliferation. Antigenic expression by proliferating epithelial cells in fetal liver, massive hepatic necrosis and nodular transformation of the liver. *Am. J. Pathol.* 110: 70-4, 1983.
36. GRISHAM, J.W. - A morphologic study of deoxyribonucleic acid syntesis and cell proliferation in regenerating liver; autoradiography with thymidine-H3. *Cancer Res.*, 22: 842-9, 1962.

37. GUERRIERI F; VENDEMIALE G; GRATAGLIANO I; COCCO T; PELLECHIA G; ALTOMARE E. Mitochondrial oxidative alterations following partial hepatectomy. *Free Radical Biology & Medicine* 26:34-41 1999.

38. GUERRIERI, F.; PALLECCHIA, G.; LOPRIORE, B.; PAPA, S.; LIQUORI, G. E.; FERRI, D.; MORO, L.; MARRA, E.; GRECO, M. Changes in ultrstructure and the occurrence of permeability transition in mitochondrial during rat liver regeneration. *Eur J. Biochem.* 269, 3304-3312, 2002.

39. HAMMOND JC, CANAL DF, BROADIE TA. *Non-operative management of adult blunt hepatic trauma in a municipal trauma centre.* *Am Surg* 1992; 58: 551-5.

40. HELLING, T. S. *The liver and hemorrhagic shock.* *J Am Coll Surg* 2005;201(5);774-783

41. HIGGINS, G.M. & ANDERSON, R.M.; Experimental pathology of the liver: I. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch. Pathol.*, 12: 186-202, 1931.

42. HOGEBROOM, G. H.; SCHNEIDER, W. C.; PALLADE, G. E. Isolation of intact mitochondria from rat liver; some biochemical properties of mitochondria and submicroscopic particulate material. *J. Biol. Chem.* 1948, 172: 619-630.

43. HUME, D.M. *Endocrine and metabolic responses to injure.* In *Schwartz SL and others. Principles of Surgery. McGraw-Hill Book, pg 2, 1974*

44. HUNTER, D.R.; HARDMAN, R.A. The Ca⁺²- induced membrane transition in mitochondria: Transitional Ca⁺² release. *Arch. Biochem. Biophys.*, v.195, p. 468-477, 1979.

45. KAJIWARA, J.K.; LIMA, S.O.; CASTRO E SILVA JR., O. de; MARTINELLI, A. de L.C.; CENEVIVA, R.; ZUCOLOTO, S. - Importance of the hepatic branch of the left vagus. Influence on lipid levels of regenerating liver in the rat. *Int. Hepatol. Commun.* 2: 223-6, 1994.

46. KAPLAN, I. & PELEDERSEN, I. The carbon dioxide LASER in treatment of superficial teleangiectasias. *Br. J. Plast. Surg.* 1975, 28 (Número 3): 215-225

47. KARAVIAS, D.D; TSAMANDAS, A.C; TEPETES, K; KRITIKOS, N. KORELIS, T. RAVAZOULA, P. VAGENAS, K; SIASOS, N; MIRRA, N. BOLIKOS, D.S. BCL-2 and BAX Expression and Cell Proliferation, after Partial Hepatectomy with and without ischemia, on Cholestatic Liver in Rats An Experimental Study. *Journal of Surgical Research*, 110, 390-408, 2003.

48. KARRAN, S. & EAGLES, C. Regeneration. Part 1. Physical aspects. IN: WRIGHT, R.; ALBERTI, K.G.M.M.; KARRAN, S. et al (eds), *Liver and Biliary Disease.* Philadelphia, W.B. Saunders, pp 197, 1983.

49. KARU, T. Photobiology of low-power laser effects. *Health Phys* 56:691-704, 1989.
50. KAWASAKI T, MORIYASU F, KIMURA T, SOMEDA H, FUKUDA Y, OZAWA K. Changes in portal blood flow consequent to partial hepatectomy: Doppler estimation. *Radiology* 1991; 180: 373-7.
51. KNUDSON M.M., LIM R.C. JR, OAKES D.D., JEFFREY R.B. Jr. Nonoperative management of blunt liver injuries in adults: the need for continued surveillance. *J Trauma* 1990; 30: 1494-500.
52. KNUDSON, M.M. AND MAULL, K.I. Nonoperative management of solid organ injuries. Past, present, and future. *Surg. Clin. North Am.* 79 (1999), pp. 1357-1371.
53. KOWALTOWSKI, A.J.; CASTILHO, R.F.; VERCESI, A.E. Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. *FEBS Lett.*, v. 495, p. 12-15, 2001
54. KOWALTOWSKI, A.J.; VERCESI, A.E. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. *Free Radc. Biol. Med.*, v. 26, p.463-471, 1999.
55. KOALTOWSKI, A.J. E COLS. Opening the mitochondrial permeability transition pore by uncoupling or inorganic phosphate in the presence of Ca²⁺ is dependent of mitochondrial generated reactive oxygen species. *FEBS Letters*, 378: 150-152, 1996.
56. LABRECQUE, D. – Liver regeneration: a picture emerges from the puzzle. *Am. J. Gastroenterol.* 89: S86-96, 1994.
57. LEFFERT, H.L.; KOCH, K.S.; LAD, P.J.; SHAPIRO, I.P.; SKELLY, H. & HEMPTINNE, B. Hepatocyte regeneration, replication, and differentiation. in: Arias, I.M.; Jakoby, W.B.; Popper, H.; Schachter, D.; Shafritz, D.A. *The liver: Biology and Patology. Sec. Ed. New York, Raven Press. 833-50, 1998*
58. LEHNINGER, A. L. *Princípios da Bioquímica.* 7^a ed. São Paulo: Sarvier Editora, 1991, 725
59. LIMA, A.A.L.A.; MELO, C.A.S.M.; BRASIL, I.R.C; RAMALHO, L.N.Z; ZUCOLOTO, S; BAGNATO, V.S; SILVA JÚNIOR, O.C. Efeitos do Laser sobre a Cirrose Hepática. *Acta Cirúrgica Brasileira*, v. 15, n supl 2, p. 21-22, 2000.
60. LIMA, S.O.; CENEVIVA, R.; MARTINELLI, A.L.C.; ZUCOLOTO, S. - Truncal vagotomy influence on hepatocytes DNA syntesis following partial hepatectomy, assessed by autoradiography. *Dig. Dis. Sci.*, 31: 397S, 1986.
61. LIMA, S.O.; CENEVIVA, R.; ZUCOLOTO, S.; MARTINELLI, A.L.C. - Rat liver regeneration after 70% partial hepatectomy plus vagotomy with and without preservation on the hepatic branches of the anterior vagus nerve. *Dig. Dis. Sci.*, 31: 398S, 1986.

62. MACKENZIE, S., KORTBEEK, J. B.; MULLOY, R. AND HAMEED, S. *M. Recent experiences with a multidisciplinary approach to complex hepatic trauma, Injury, In Press, Corrected Proof, Available online 19 January 2004.*
63. MALHOTRA, A.K.; FABIAN, T.C.; CROCE, M.A.; GAVIN, T.J.; KUDSK, K.A.; MINARD, G.; *et al.*, *Blunt hepatic injury: a paradigm shift from operative to nonoperative management in the 1990s. J. Trauma* 231 (2000), pp. 804–813.
64. MANN, D.V; LAM; W.W.M.; HJELM, M.; SO, M.C; YEUNG, D.K.W.; METREWELI, C; LAU, W.Y. *Metabolic Control Patterns in Acute Phase and Regenerating Human Liver Determined In Vivo by ³¹ – Phosphorus Magnetic Resonance Spectroscopy. Annals of Surgery. Vol. 235, n° 3.408-416, 2002.*
65. MARUYAMA, H. HARADA, A. KUROKAWA. T; KORAYASHI, H. NONAMI, T. NAKAO, A; TAKAGI, H. *Duration of Liver Ischemia and Hepatic Regeneration after Hepatectomy in Rats. Journal of Surgical Research, 58, 290-294, 1995.*
66. MCALLISTER, N.S.; LEEB-LUNDBERG, F.; MELLONING, J.T.; OLSON, M.S. *The function interaction of ECF and PDGF with bradykinin in the proliferation of human gingival fibroblasts. J. Periodontol. 66: 429-37, 1995*
67. MEIJER, C; WIEZER, M.J; DIEHL, A.M; YANG, S.Q; SCHOUTEN, H.J; MEIJER S. VAN ROOIJEN N; VAN LAMBALGEM, A.A; DIJKSTRA, C.D.; VAN LEEUVEN, P.A.M. *Kupffer cell depletion by CI2MDP-liposomes alters hepatic cytokine expression and delays liver regeneration after partial hepatectomy. Munksgaard: Liver 2000, v. 20, 66-77, 2000.*
68. MELLO, G.B.; SILVA, R.L.; MELO, V.A; LIMA S.O; ANTONIOLLI, A.R. CASTRO E SILVA, T.; MARCASSA, L.G; BAGNATO, V.S; ZUCOLOTO, S; RAMALHO, L.N.Z; RAMALHO, F.S; SILVA JÚNIOR, O.C. *Enhancement of Liver Regeneration by the Association of Hyptis pectinata with Laser Therapy. Digestive Diseases and Sciences, Estados Unidos, Vol 50, n. 5, may 2005, p. p. 949-954, 2005*
69. MELO, C.A.S; LIMA, A.A. L.A; BRASIL, I.R.C; SILVA JUNRIOR, O.C; MAGALHÃES, D.V; MARCASSA, L.G; BAGNATO, V.S. *Characterization of Light Penetration in Rat Tissues. Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery, v. 19, p. 175-179, 2001. (19)*
70. MELO, G.B; SILVA, R.L.; ANTONIOLLI, A.R; MELO, V.A; LIMA S.O; SILVA, P.M; JÚNIOR, O.C. *Efeitos do Extrato Aquoso da Hyptis Pectinata Após Hepatectomia Parcial de 70% Resultados Preliminares. Acta Cirúrgia Brasileira, v. 16, n. sup 1, pp 13-15, 2001.*
71. MEREDITH J.W.; YOUNG J.S; BOWLING, J.; ROBOUSSIN, D. *Nonoperative management of blunt hepatic trauma: the exception or the rule? J Trauma* 1994; 36: 529-35.

72. MICHALOPOULOS, G.K. & DEFRANCES, M.C. – Liver regeneration. *Science*, 276: 60-6, 1997.
73. MICHALOPOULOS, G. *Liver regeneration and growth factors: old puzzles and new perspectives*. *Lab. Invest.* 67: 413-5, 1992.
74. MICHALOPOULOS, G. *Liver regeneration: molecular mechanisms of growth control*. *FASEB J.* 4: 176-87, 1990.
75. MITCHELL, P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism. *Nature*, v. 191, p.144-148, 1961.
76. MILLONI, W. & EVERY, J.H. Some laser applications. In: *LASER*. New York, Wiley intescience publ., 618-619, 1988.
77. MILNE, L.S. The histology of liver tissue regeneration. *J. Path. Bact.*, 13: 127-60, 1909.
78. MORO, L.; MARRA, E.; CAPUANO, F.; GRECO, N. Thyroid Hormone Treatment of Hypothyroid Rats Restores the Regenerative Capacity and the Mitochondrial Membrane Permeability Properties of the Liver after Partial Hepatectomy. *Endocrinology* is published monthly by The Endocrine Society ([http://www. Endo-society.org](http://www.Endo-society.org)), p. 5121-27, 2004. Acesso realizado em 15/08/2006.
79. NISHIHARA, T.; TANAKA, J.; NISHIKAWA, K.; JIKKO, A.; TAKI, Y.; MORIMOTO, T.; KOIZUMI, K.; KAMIYAMA, Y.; OZAWA, K.; TOBE, T. Biological significance of enhanced mitochondrial membrane potential in regenerating liver. *Hepatectology*, 1986, Mar-Apr; 6(2): 220-4.
80. NISHIKIMI, M. NIMURA, Y; KUBOTA, H; KANAI, M; KATO, T; OZAWA, T. Stimulated rat liver mitochondrial biogenesis after partial hepatectomy. Disponível na internet em: *MEDLINE_1966-1995 PMID: 2758420*.
81. OZAWA, k. The role of liver mitochondrial compensatory ability. In: OZAWA, K. *Liver surgery approached thorough the mitochondrial*. Tokyo Medical Tribune, 27-55, 1992.
82. OVERTURF, K.; AL-DHALIMY, M.; OU, C.; FINEGOLD, M.; GROMPE, M. – Serial transplantation reveals the stem-cell-like regenerative potential of adult mouse hepatocytes. *Am. J. Pathol.*, 151: 1273-80, 1997.
83. PACHTER HL, FELICIANO DV. *Complex hepatic injuries*. *Surg Clin North Am* 1996; 76: 763-82.
84. PACHTER HL, SPENCER FC. *The management of complex hepatic trauma*. In: *Delaney JP, Varco RL, eds. Controversies in Surgery II*. Philadelphia, Pennsylvania: WB Saunders, 1983: 241-9.
85. PACHTER, H.L. AND FELICIANO, D.V., *Complex hepatic injuries*. *Surg. Clin. North Am.* 76 (1996), pp. 763–782.

86. PANIS, Y.; MCMULLAN, D. M.; EMOND, J. C. Progressive necrosis after hepatectomy and the pathophysiology of liver failure after massive resection. *Surgery*, vol. 121, number 2, February, 1997.

87. PARKS, R. W.; CHRYSOS, E.; DIAMOND, T. *Management of liver trauma. British Journal of Surgery*, Vol. 86(9), September 1999 pp 1121-1135

88. PEDERSEN, P. L.; GREENAWALT, J. W.; REYNAFARJE, B.; HULLIHEN, J.; DECKER, G. L.; SOPER, J. W.; BUSTAMANTE, E. Preparation and characterization of mitochondrial and submitochondrial particles of rat liver and liver-derived tissues. *Meth. Cell. Biol.* 1978, 20: 411-481.

89. PETENUSCI, S. O.; FREITAS, T. C.; ROSELINO, E. S.; MIGLIORINI, R. H. Glucose homeostasis during the early stages of liver regeneration in fasted rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 61: 222-8, 1983.

90. RABES, H. M.; WIRSHING, R.; TUCZEK, H. V.; ISELER, G. - Analysis of cell cycle compartments of hepatocytes after partial hepatectomy. *Cell Tissue Kinet.*, 6: 517-32, 1976.

91. RAMALHO, L. N. Z.; ZUCOLOTO, S.; RAMALHO, F. S.; SILVA JÚNIOR, O. C.; CORRÊA, F. M. A. Effect of antihypertensive agents on stellate cells during liver regeneration in rats. *Arquivos de Gastroenterologia*, v. 40, n. 1, p. 40-44, 2003.

92. RAMALHO, F. S.; RAMALHO, L. N. Z.; S.; SILVA JÚNIOR, O. C.; ZUCOLOTO, S.; CORRÊA, F. M. A. Effect of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors on Liver Regeneration in Rats. *Hepato-Gastroenterology*, Estados Unidos, v. 49, p. 1347-1351, 2002.

93. RAMALHO, F. S.; RAMALHO, L. N. Z.; S.; SILVA JÚNIOR, O. C.; ZUCOLOTO, CORRÊA, F. M. A. Angiotensin – Converting Enzyme Inhibitor by Lisinopril Enhances Liver Regeneration in Rats. *Brazil Journal of Medical and Biological Research*, v. 34, p. 125-127, 2001.

94. RAMALHO, F. S.; RAMALHO, L. N. Z.; S.; SILVA JÚNIOR, O. C.; ZUCOLOTO, CORRÊA, F. M. A.; ELIAS JR, J.; MAGALHÃES, J. F. G. Effect of Losartan, an Angiotensin II antagonist, on Secondary Biliary Cirrhosis. *Hepato-Gastroenterology*, Estados Unidos, v. 49, p. 1499-1502, 2002.

95. RAMALHO, F. S.; RAMALHO, L. N. Z.; ZUCOLOTO, S.; CASTRO E SILVA JR. Regeneração hepática: algumas definições num universo de incertezas. *Acta Cir. Bras.* 8: 177-89, 1993

96. REED, R. L.; MERRELL, R. C.; MEYERS, W. C.; FISCHER, R. P. II, Continuing evolution in the approach to severe liver trauma. *Ann. Surg.* 216 , pp. 524–538. 1992.

97. RICHARDSON, J. D.; FRANKLIN, G. A.; LUKAN, J. K.; CARRILLO, E. H.; SPAIN, D. A.; MILLER, F. B. et al., Evolution in the management of hepatic trauma: a 25-year perspective. *J. Trauma* 232 , pp. 324–330, 2000

98. ROUS, P. & LARIMORE, L.D. Relation of the portal blood to liver maintenance: a demonstration of liver atrophy conditional on compensation. *J. Exp. Med.*, 31: 609-32, 1920.

99. SHERMAN HF, SAVAGE BA, JONES LM, BARRETTE RR, LATENSER BA, VARCELOTTI JR ET AL. Nonoperative management of blunt hepatic injuries: safe at any grade? *J Trauma* 1994; 37: 616-21.

100. SILVA JÚNIOR, O. C. ; ZUCOLOTO, S. MARCASSA, L.G.; MARCASSA, J.; KURACHI, C.; MELO, C.A.S.; RAMALHO, F.S. RAMALHO, L.N.Z.; BAGNATO, V.S. Spectral Response for LASER Enhancement in Hepatic Regeneration for Hepatectomized Rats. *LASER in Surgery and Medicine*. 32:50-53, 2003.

101. SILVA JÚNIOR, O.C; SILVA, R.L; MELO, G.R; MELO, V.A; LIMA, S.O; ANTONIOLL, A.R.; BRAGNATO, V.S. Proliferative effect of medicinal plants and laser on liver regeneration. A considerable experimental model: from an experimental model to clinical applications. *Acta Cirúrgia Brasileira*, v. 18, n. 5, p. 6-8, 2003.

102. SILVA JÚNIOR, O.C; SILVA, T. C; RAMALHO, F.S; RAMALHO. L.N.Z; ZUCOLOTO. S; MARCASSA. L.G; BAGNATO. V.S. Led enhancement in mitochondrial oxidative phosphorylation for hepatecomized rats. *Acta Cirúrgia Brasileira*, v. 17, n. 3, p. 92-95, 2002.

103. SILVA JÚNIOR, O. C; ZUCOLOTO, S. MENEGAZZO, L.A.G.; GRANATO, R. G.; MARCASSA, L.G.; BAGNATO, V.S. Laser Enhancement in Hepatic Reneration for Partially Hepatectomized Rats. *LASER in Surgery and Medicine*. 29:73-77, 2001.

104. SILVA JÚNIOR, O. C; PROZILLO, L.C.; POTENCIANO, O, G.; MUCCILLO, G.; ZUCOLOTO, S. The effect of low-energy He-Ne laser irradiation on liver regeneration. *Res. Surg.*; 3: 192-4, 1991. *Cech*; 68(2):112-6, 2001.

105. SILVA JÚNIOR, O. C.; CENEVIVA, R.; FRANCO, C.F.F.; PICCINATO, M.A.N.C.; ROSELINO, J.E.S.; SOUZA, M.E.J.; POTENCIANO, O.; ZUCOLOTO, S. - Impaired liver regeneration in extrahepatic cholestatic rats. *Res. Surg.*, 4: 32-4, 1992.

106. SILVA JÚNIOR, O. C.; MELO FILHO, A. A.; RAMALHO, L. Z.; MRUÉ, F.; CENEVIVA, R. – Perfil sérico de enzimas hepáticas em ressecções do fígado. *Acta Cirúrgica Brasileira – Suplemento* lpg. 22-26, 1996.

107. SILVA JÚNIOR, O. C. Função mitocondrial do fígado durante a obstrução biliar extra-hepática e após drenagem cirúrgica das vias biliares. Efeito da clorpromazina. Ribeirão Preto, 1986. *Tese (Doutorado)* – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

108. SILVA, R.L; MELO, G.B; ANTONIOLLI, A.R; LIMA, S.O; MELO, V.A; RAMALHO, F.S; RAMALHO, L.N.Z; ZUCOLOTO, S; SILVA JÚNIOR, O.C. Efeitos do Extrato da *Hyptis Pectinata* sobre Hepatectomizados Após Aplicação de Laser. *Acta Cirúrgia Brasileira*, v. 17, n. 3, p. 101-105, 2002 (15)

109. SIMPSON, G.E.C. & FINCKH, E.S. - Pattern of regeneration of rat liver after repeated partial hepatectomies. *J. Path. Bact.*, 86: 361-70, 1963.
110. SUBRATO D., MARTIN, B.; SUN, L.; RUFF, P.; BURRIS, D.; RICH, N.; DEBREUX, S.; AUSTIN, B.; RHEE, P. Resuscitation with Lactated Ringer's solution in rats with hemorrhagic shock induces immediate apoptosis. *The J. of Trauma*. 46: 582-88, 1999.
111. SUSIN, S.A.; ZAMZAMI, N.; KROEMER, G. Mitochondria as regulators of apoptosis: doubt no more. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1366, p. 151-165, 1998.
112. TRUNKEY, D.D. *Hepatic trauma: contemporary management. Surg Clin N Am* 84 (2004) 437-450
113. VAPTZAROVA, K.I.; POPOV, P.G.; VESELY, J.; CIHAK, A. - Depressed synthesis of DNA in regenerating rat liver after spinal cord (C₇) transection. *Experientia*, 29: 1505-6, 1973.
114. VERCESI, A. E. & HOFFMANN, M. E. Geeneration of reactive oxygen metabolites and oxidative damage in mitochondria: The role of calcium. In Jones, D. P, & Lash, L. H. Eds. New York, Academic Press. *Methods in toxicology* 2: 256-65, 1993.
115. VERCESI, A.E. E COLS. *Degitonin permeabilization dose not affect mitochondrial function and allows the determination of the mitochondrial membrane potential of Trypanosoma cruzi in situ. The J of Biol Chemistry*, col 266, p 14.431-14.434, 1991.
116. YANG, S.; TAN, T.M.C.; WEE, A.; LEOW, C.K. Mitochondrial respiratory function and antioxidant capacity in normal and cirrhotic livers following partial hepatectomy. *CMLS. Cell Mot, Life Sei*. 61, 2004: 220-229.
117. WATANABE, A; NAKASHIMA, S; ADACHI, T; SAH, S; NORAWA, Y.. Changes in the Expression of Lipid-Mediated Signal-Transducing Enzymes in the Rat Liver After Partial Hepatectomy. *Surg Today*, v 30, 622-630, 2000.
118. WEINBREN, K. & WOODWARD, E. Delayed incorporation of 32P from orthophosphate into deoxyribonucleic acid of rat liver after subtotal hepatectomy. *Br. J. Exp. Path*, 45: 442-9, 1964..
119. WRIGHT, N. & ALISON, M. - The liver. In: *The biology of the epithelial cell population*. v.2. Oxford, Clarendon Press, p.880-1229, 1984.
120. ZANOTTI, A. E AZZONE, G.F. *Safranin as membrane potential probe in rat liver mitochondria. Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 201, p 255-265, 1980.
121. ZELENAK, J.; HUTAN, M.; KALIG, K. - *Acta Chir Orthop Traumatol*. 2001; 68(2):112-6

122. ZORATTI, M.; SZABÒ, I. The mitochondrial permeability transition. *Biochem. Biophys. Acta*, v. 1241, p. 139-176, 1995
123. ZUCOLOTO, S.; SILVA, J.C.; CASTRO E SILVA JR., O.; GONZAGA, E.Z.S.; FABBRO, A.L.D. - Hepatic regeneration after hepatectomy in schistosomatic fibrosis. *Int. J. Exp. Path.*, 71: 465-8, 1990.
124. ZUCOLOTO, S.; SILVA, J.C.; FIGUEIREDO, F. Fatores envolvidos na regeneração hepática na fibrose esquistossomótica. *Medicina*, 24: 105-10, 1991.

IX - APÊNDICE

Estado 3

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
C	68.2	55.1	61.2	86.1	50.8	66.3	80.0	73.1	54.6	105.1	88.1	80.0	82.4	58.2
2'	88.4	88.1	69.7	94.0	66.5	79.9								
5'	32.6	73.1	141.2	111.4	106.8	68.3								
10'	45.9	78.1	100.2	74.1	66.4	79.3								
15'	85.1	107.8	111.5	78.8	130.3	78.7								
20'	51.4	84.1	85.6	105.6	110.7	123.1								
30'	106.6	118.1	86.2	197.3	183.4	99.6	100.0	108.7						
1h	170.3	163.7	84.9	120.9	108.2	98.1								
2h	167.0	181.2	104.4	137.2	119.2	60.3	98.0	174.3						
4h	155.0	136.6	111.9	161.1	160.0	171.0								
8h	79.8	177.1	156.2	125.9	144.0	162.1	149.4							
12h	114.8	97.8	94.9	121.8	105.4	149.6	119.7							
1d	88.7	83.2	103.6	86.8	81.3	71.4								
2ds	91.3	106.4	116.2	124.4	106.4	80.9	89.2							
3ds	75.1	84.5	101.9	80.9	127.5	81.9	94.7							
6ds	99.1	77.0	97.2	925.8	82.1	95.7								
10ds	65.9	73.9	71.8	75.3	60.0	62.9	70.3							

Tabela 1: Valores individuais do Estado 3 nos grupos submetidos e HP a 70%.

Estado 4

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
C	15.6	11.6	10.3	11.9	.6	14.4	12.7	10.0	10.5	19.7	20.1	15.7	9.9	14.2
2'	20.360	11.860	10.280	15.950	15.220	16.190								
5'	10.900	18290	25.610	20.370	16.530	15.910								
10'	8.870	20.730	21.130	17.910	11.460	13.030								
15'	20.180	23.390	16.790	18.570	13.480	16.980								
20'	12.820	17.840	17.960	14.760	17.740	24.700								
30'	21.19	21.04	20.81	23.03	19.01	17.42								
1h	23.200	30.160	13.360	20.430	27.520	23.030								
2h	32.4	42.8	23.6	30.4	22.2	50.9	30.7							
4h	43.620	33.680	35.530	35.900	38.200	40.970								
8h	32.830	45.050	43.160	30.850	33.390	35.940								
12h	21.5	18.21	17.44	23.84	15.64	21.46	16.45							
1d	20.66	22.57	26.11	22.280	22.59	16.89								
2ds	25.40	22.12	20.10	31.28	202.58	15.80								
3ds	21.14	17.97	25.01	16.60	29.25	11.96	18.57							
6ds	21.39	15.91	21.09	18.13	16.04	19.36								
10ds	13.05	17.26	15.60	17.94	12.42	13.89	17.24							

Tabela 2: Valores individuais do Estado 4 nos grupos submetidos e HP a 70%.

Razão de Controle Respiratório

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
C	4.40	4.70	6.00	7.20	7.70	4.60	5.70	5.80	5.20	5.30	4.00	5.60	4.60	5.90
2'	4.3	7.0	6.8	5.9	4.4	4.9								
5'	3.00	4.00	5.50	5.00	6.50	4.30								
10'	5.20	3.80	4.70	4.10	5.80	6.10								
15'	4.20	4.60	6.60	5.80	7.00	4.60								
20'	4.0	4.60	6.60	5.80	7.00	4.60								
30'	5.00	5.60	4.10	4.60	4.80	4.30	5.20	6.20						
1h	7.30	5.40	6.30	5.90	3.90	4.30								
2h	5.2	4.2	4.4	4.5	5.4	6.2	5.7							
4h	3.50	4.00	3.10	4.50	4.20	4.20								
8h	2.40	3.90	3.60	4.10	4.90	4.20								
12h	5.4	5.4	5.4	5.1	6.7	7.0	7.3							
1d	4.3	3.7	4.0	3.9	3.6	4.2								
2ds	3.6	4.8	5.8	4.0	4.7	5.1								
3ds	3.6	4.7	4.1	4.7	4.4	6.8	5.1							
6ds	4.6	4.8	4.7	5.1	5.1	4.9								
15ds	5.0	4.3	4.6	4.2	4.8	4.5	4.1							

Tabela 3: Valores individuais da Razão de Controle Respiratório nos grupos submetidos a HP a 70%.

Potencial de Membrana

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
C	127.0	131.0	132.0	132.0	130.0	126.0	131.0	124.0	134.0	125.0	130.0	133.0	127.0	
2'	132.0	133.0	135.0	125.0	134.0	131.0								
5'	123.0	128.0	127.0	125.0	123.0	133.0								
10'	132.0	123.0	133.0	133.0	133.0	132.0	123.0							
15'	133.0	123.0	132.0	132.0	122.0									
20'	133.0	127.0	132.0	124.0	122.0	122.0								
30'	128.0	132.0	122.0	122.0	128.0	126.0	129.0							
1h	126.0	122.0	130.0	130.0	124.0	123.0								
2h	122.0	122.0	131.0	125.0	127.0	122.0	131.0	125.0						
4h	122.0	120.0	127.0	124.0	122.0	115.0								
8h	123.0	124.0	124.0	126.0	127.0	127.0	125.0							
12h	128	132	132	130	132	127	130							
1d	131	128	128	131	133	133								
2ds	132	133	131	131	130	133	128							
3ds	131	133	128	129	131	131	130							
6ds	134	134	133	134	134	133								
15ds	135	135	133	135	134	134	134							

Tabela 4: Valores individuais do Potencial de Membrana nos grupos submetidos a HP a 70%.

Intumescimento Osmótico Mitochondrial (Swelling)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
0'	0.120	0.070	0.120	0.130	0.110	0.120	0.190	0.190	0.110	0.170	0.180	0.130	0.100	0.140
2'	0.110	0.160	0.120	0.160	0.100	0.110								
5'	0.080	0.100	0.140	0.190	0.210	0.100								
10'	0.090	0.160	0.120	0.100	0.110	0.120								
15'	0.120	0.160	0.140	0.190	0.120									
20'	0.170	0.150	0.150	0.160	0.160									
30'	0.130	0.180	0.120	0.230	0.260	0.120	0.140	0.60						
1h	0.150	0.180	0.160	0.170	0.160	0.120								
2h	0.170	0.180	0.150	0.90	0.100	0.190	0.130							
4h	0.140	0.190	0.140	0.210	0.140	0.170								
6h	0.120	0.210	0.200	0.160	0.110	0.170	0.90							
12h	0.08	0.07	0.11	0.11	0.10	0.05	0.11							
1d	0.12	0.12	0.16	0.11	0.11	0.10	0.05	0.11						
2ds	0.08	0.08	0.07	0.10	0.09	0.07	0.09							
3ds	0.09	0.09	0.10	0.08	0.10	0.09	0.10							
6ds	0.11	0.10	0.11	0.09	0.09	0.10								
16ds	0.07	0.05	0.06	0.06	0.06	0.05	0.05							

Tabela 5. Valores individuais do Intumescimento Osmótico Mitochondrial (Swelling) nos grupos submetidos a HP a 70%.

Estado 3

		1	2	3	4	5	6	7
C		74.00	66.00	61.20	66.30	79.70	73.10	84.39
2'	s/ Bioest.L	88.4	88.1	69.7	94.0	66.5	80.0	
	c/Bioest. L	68.5	61.1	65.0	77.2	84.6	54.3	
6h	s/ Bioest.L	97.4	88.9	60.8	82.2	73.8	67.9	
	c/Bioest. L	154.9	136.6	111.9	161.1	159.6	171.0	
12h	s/ Bioest.L	134.3	177.1	156.2	125.9	162.1	149.3	
	c/Bioest. L	164.8	150.8	131.1	141.0	121.7	140.8	
24h	s/ Bioest.L	88.73	83.22	103.60	86.76	81.26	81.38	
	c/Bioest. L	71.40	72.11	81.82	85.06	92.26		

Tabela 6: Comparativo dos valores individuais do Estado 3 nos grupos submetidos a HP a 70% com e sem bioestimulação com LASER.

Estado 4

		1	2	3	4	5	6	7
C		10.3	14.6	14.0	12.7	15.6	19.2	23.6
2'	s/ Bioest.L	18.0	13.6	15.9	24.1	26.6	19.8	
	c/Bioest. L	20.4	11.9	10.3	16.0	15.2	16.2	
6h	s/ Bioest.L	43.9	42.8	32.0	31.9	30.8	33.8	
	c/Bioest. L	43.6	33.7	35.5	35.9	38.2	40.9	
12h	s/ Bioest.L	44.7	42.7	48.7	56.6	34.4	43.8	
	c/Bioest. L	32.8	45.1	43.2	30.8	33.4	36.0	
24h	s/ Bioest.L	18.27	20.66	20.78	22.42	23.06		
	c/Bioest. L	20.66	22.57	26.11	22.28	22.59	16.89	

Tabela 7: Comparativo dos valores individuais do Estado 4 nos grupos submetidos a HP a 70% com e sem bioestimulação com LASER.

Razão de Controle Respiratório

		1	2	3	4	5	6
C		3.9	6.0	4.6	5.7	5.8	4.2
2'	s/ Bioest.L	3.4	5.0	4.1	3.2	3.2	2.7
	c/Bioest. L	4.9	4.3	7.4	6.8	5.9	4.4
6h	s/ Bioest.L	2.2	2.1	1.9	2.6	2.4	2.0
	c/Bioest. L	3.5	4.0	3.1	4.5	4.2	4.2
12h	s/ Bioest.L	3.7	3.1	3.1	3.5	2.5	3.2
	c/Bioest. L	3.3	3.9	3.6	4.1	4.9	4.2
24h	s/ Bioest.L	3.9	3.5	3.9	3.8	4.0	
	c/Bioest. L	4.3	3.7	4.0	3.9	3.6	4.2

Tabela 8: Comparativo dos valores individuais da Razão de Controle Respiratório nos grupos submetidos a HP a 70% com e sem bioestimulação com LASER.

Potencial de Membrana

		1	2	3	4	5	6
0		132	126	131	124	127	130
2'	s/ Bioest.L	132	133	135	125	134	131
	c/Bioest. L	132	130	131	130	125	126
6h	s/ Bioest.L	122	122	127	124	122	115
	c/Bioest. L	125	123	125	126	127	128
12h	s/ Bioest.L	124	124	126	127	125	124
	c/Bioest. L	123	125	118	126	123	123
24h	s/ Bioest.L	131	128	128	131	133	133
	c/Bioest. L	136	134	134	134	133	

Tabela 9: Comparativo dos valores individuais do Potencial de Membrana Mitocondrial nos grupos submetidos a HP a 70% com e sem bioestimulação com LASER.

Intumescimento Osmótico Mitocondrial (Swelling)

		1	2	3	4	5	6
0		0.15	0.12	0.19	0.19	0.14	0.14
2'	s/ Bioest.L	0.11	0.16	0.12	0.16	0.10	0.11
	c/Bioest. L	0.10	0.14	0.12	0.13	0.13	0.15
6h	s/ Bioest.L	0.14	0.19	0.14	0.21	0.14	0.17
	c/Bioest. L	0.23	0.14	0.17	0.16	0.13	0.13
12h	s/ Bioest.L	0.18	0.21	0.20	0.16	0.17	0.09
	c/Bioest. L	0.17	0.18	0.21	0.22	0.18	0.19
24h	s/ Bioest.L	0.12	0.12	0.16	0.11	0.11	0.10
	c/Bioest. L	0.06	0.08	0.10	0.07	0.09	0.07

Tabela 10: Comparativo dos valores individuais do Intumescimento Osmótico Mitocondrial (Swelling), nos grupos submetidos a HP a 70% com e sem bioestimulação com LASER.