

Rodrigo Bronze de Martino

**Avaliação do emprego da pentoxifilina na
regeneração hepática em ratos submetidos à
hepatectomia parcial**

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

Área de concentração: Clínica Cirúrgica

Orientador: Prof. Dr. Telesforo Bacchella

**São Paulo
2010**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Bronze de Martino, Rodrigo

Avaliação do emprego da pentoxifilina na regeneração hepática em ratos submetidos
à hepatectomia parcial / Rodrigo Bronze de Martino. -- São Paulo, 2010.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Departamento de Cirurgia.

Área de concentração: Clínica Cirúrgica.

Orientador: Telésforo Bacchella.

Descritores: 1.Regeneração hepática 2.Hepatectomia 3.Citocinas 4.Ratos

USP/FM/SBD-389/10

Aos meus pais, José Roberto e Marcia, meus primeiros e mais importantes professores, pelo amor, dedicação, incentivo... Obrigado por marcar em minha vida os valores que a norteiam.

À minha Juliana pelo amor, carinho, compreensão...
Obrigado por me proporcionar tanta felicidade.

Ao meu Tiago pelo ano e 6 meses mais cheios de alegria das nossas vidas. Espero que quando puder ler isso saiba o quanto te amamos.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Telesforo Bacchella, pelos ensinamentos não apenas relacionados a esse estudo, mas pelo exemplo de vida e ética. É um privilégio tê-lo como orientador.

Ao Prof. Dr. Marcel Cerqueira Cesar Machado, pelos ensinamentos científicos, técnicos e tantos outros, sem os quais esse estudo não teria sequer iniciado e minha formação seria repleta de lacunas. Sua dedicação inigualável à ciência torna prazerosa, incansável, porém interminável a busca por respostas na medicina.

Ao Prof. Dr. Luiz Augusto Carneiro D'Albuquerque, pelo incentivo e sugestões. Minha gratidão pelas oportunidades e confiança que tenho recebido.

Às amigas Ana Maria de Mendonça Coelho, Sandra Nassa Sampietre e Nilza Aparecida Trindade Molan pelo carinho e dedicação, pela colaboração fundamental sem a qual não seria possível a realização deste estudo.

À Dra. Regina Leitão pela dedicação na análise histológica, que com grande competência, trouxe maior valor a esse estudo.

À Carolina Dal Ben Padua e Juliana Dal Ben Padua de Martino pela colaboração gráfica no texto.

À Ana Lúcia Bernardes, Alcione S. Alexandre e Tatiana Zanesco pela colaboração na dosagem das transaminases e no início deste trabalho.

Aos grandes amigos do Serviço de Transplante de Fígado do Hospital das Clínicas da FMUSP, Drs. André Cosme de Oliveira, Edson Abdala, Estela Regina Ramos Figueira, Fábio Ferrari Makdissi, Maurício Fernandes de Almeida Barros, Patrícia Bonazzi, Rafael Pécora, Roberto Ferreira Meirelles Júnior, Rodrigo Canada Trofo Surjan, Vinícius Rocha Santos, Vincenzo Pugliese, Wellington Andraus pela alegria na convivência, incentivo, colaborações das mais variadas e coberturas no serviço para que esse trabalho pudesse ser finalizado.

Aos amigos Antonio Roberto Teixeira, Márcia Saldanha Kubrusly e Marcel Autran César Machado pelo apoio e valorosas opiniões e sugestões.

Às enfermeiras Adriana Cortez, Karina Tiemi Osaki e Valdecy Miranda Barbosa pela compreensão e dedicação ao trabalho.

A todos os funcionários e amigos do Serviço de Transplante de Fígado do Hospital das Clínicas da FMUSP.

Esta tese está de acordo com:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals* (Vancouver)

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

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*

Sumário

Lista de siglas

Lista de abreviaturas e símbolos

Resumo

Summary

1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVO.....	8
3	MÉTODOS	10
3.1	Aspectos éticos.....	11
3.2	Material	12
3.3	Métodos	12
3.3.1	Grupos do experimento	12
3.3.2	Procedimento cirúrgico	14
3.3.3	Administração de Pentoxifilina e solução salina	14
3.3.4	Coleta do material para análise	15
3.3.5	Análise dos materiais coletados	15
3.3.5.1	Histologia	15
3.3.5.2	Análise bioquímica	16
3.3.5.3	Dosagem das citocinas	16
3.3.6	Análise estatística	16
4	RESULTADOS	18
4.1	Transaminases	19
4.2	Citocinas	23
4.2.1	TNF- α	23
4.2.2	IL- 6.....	28
4.3	Histologia	31
5	DISCUSSÃO	35
6	CONCLUSÃO.....	49
7	ANEXOS	51
8	REFERÊNCIAS.....	58

Lista de siglas

ALT	alanina aminotransferase
ANOVA	análise de variância
Anti-PAA	anticorpo monoclonal reconhecedor de PAA (antígeno expresso em células humanas em proliferação)
AST	aspartato aminotransferase
BrdU	bromodeoxiuridina
CCl ₄	tetracloroeto de carbono
DHL	desidrogenase láctica
DNA	ácido desoxirribonucléico
EGF	fator de crescimento epidérmico
ELISA	ensaio imuno-enzimático
EUA	Estados Unidos da América
G0	fase de repouso do ciclo celular
G1	fase G1 do ciclo celular (G=gap) intervalo entre o término da mitose e o começo da síntese de DNA
G2	fase G2 do ciclo celular (G=gap) intervalo entre o final da síntese de DNA e o início da mitose
H&E	hematoxilina e eosina
HGF	fator de crescimento de hepatócitos
ICAM-1	moléculas de adesão
IL-1	interleucina 1
IL-1 β	interleucina 1 β
IL-6	interleucina 6
Ki-67	proteína nuclear encontrada em todas as partes ativas do ciclo celular
LIM-37	Laboratório de Investigação Médica 37
M	fase M (mitótica) do ciclo celular
mRNA	RNA mensageiro
NFkB	fator nuclear kappa B

PCNA	antígeno nuclear de proliferação celular
RNA	ácido ribonucléico
S	fase S (síntese) do ciclo celular
SOCS3	supressor da citocina sinalizadora 3
STAT3	sinal de transdução e ativação de transcrição 3
TGF- α	fator de crescimento transformador α
TGF- β 1	fator transformador de crescimento beta-1
TNF- α	fator de necrose tumoral- α
TNFR1	receptor 1 do fator de necrose tumoral

Lista de abreviaturas e símbolos

C	controle
Cols	colaboradores
°C	graus Celsius
ed	edição
hs	horas
g	gramas
Lap	laparotomia
mg/ml	miligramas por mililitro
pg/mg	picogramas por miligramas
pg/ml	picogramas por mililitro
Ptx	pentoxifilina
U/L	unidades por litro

Resumo

Martino RB. *Avaliação do emprego da pentoxifilina na regeneração hepática em ratos submetidos à hepatectomia parcial* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2010. 64p.

A cirurgia do fígado apresentou extraordinário avanço desde a primeira ressecção planejada realizada por Langenbuch em 1888, e o primeiro transplante de fígado realizado por Starzl em 1963, até atualmente quando extensas ressecções e transplantes de partes do fígado são possíveis. Isso se deve graças, entre outros fatores, ao reconhecimento da grande capacidade regenerativa do fígado. A regeneração hepática tem sido objeto de estudo por quase 100 anos, no entanto, o mecanismo pelo qual o hepatócito é estimulado à replicação não foi completamente elucidado. As citocinas têm papel fundamental no mecanismo de regeneração do fígado, destacando-se entre elas o TNF- α e a IL-6. Elas favorecem a indução de outras citocinas e estimulam a regeneração. Elas, no entanto, contribuem também no mecanismo de lesão do hepatócito em situações como a da isquemia e reperfusão. Alguns dados da literatura são conflitantes e mostram respostas diferentes na regeneração hepática provocadas pela inibição do TNF- α . A pentoxifilina é um derivado da metilxantina que tem uma potente ação inibidora da síntese de TNF- α . O presente estudo visa a avaliar o efeito da administração de pentoxifilina na regeneração hepática em ratos submetidos a ressecção de 70% do parênquima hepático. Os animais foram divididos em 4 grupos: Controle, grupo I (laparotomia), Grupo II (hepatectomia + salina) e grupo III (hepatectomia + pentoxifilina). Foram realizadas dosagens de transaminases (AST e ALT) 2, 6 e 48 horas após o procedimento, de citocinas (TNF- α e IL-6) no soro e no tecido hepático 2 e 6 horas após a operação, e realizado estudo histológico para avaliação do índice mitótico e do PCNA com o intuito de quantificar a regeneração hepática 48 horas após o procedimento. Os resultados mostraram que a pentoxifilina foi efetiva no bloqueio do TNF- α e da IL-6 no soro, mas não no tecido hepático dos animais, e que esse bloqueio melhorou a regeneração hepática documentada pelo índice mitótico e pelo PCNA. Pudemos então concluir que a pentoxifilina, nas condições do presente estudo, melhorou a regeneração do fígado após ressecção de 70% do parênquima hepático por mecanismo relacionado a redução das citocinas séricas e manutenção das citocinas do tecido hepático.

Descritores: 1.Regeneração hepática 2.Hepatectomia 3.Citocinas 4.Ratos

Summary

Martino RB. *Effect of pentoxifylline in liver regeneration in rats submitted to partial hepatectomy* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2010. 64p.

Liver surgery has grown extraordinarily from the first planned resection performed by Langenbuch in 1888, and the first successful orthotopic liver transplantation by Starzl in 1963 to the extended liver resections and living donors liver transplantations currently performed in many centers. It occurred, among others factors, because of the recognition of the great liver regenerative capacity. Liver regeneration has been object of study for almost 100 years. However the mechanism by which hepatocytes replication is stimulated is not completely elucidated. Cytokines, mainly TNF- α and IL-6, play a pivotal role in liver regeneration mechanism. However they also contribute to hepatocytes damage mechanisms, like in ischemia-reperfusion injury. Indeed some studies are conflicting, and show different effects of TNF- α inhibition in liver regeneration. Pentoxifylline is a methylxanthine compound known to inhibits TNF- α production by monocytic cells. The present study aims to evaluate the effect of pentoxifylline in liver regeneration in rats submitted to 70% hepatectomy. The animals were randomized into 4 groups: Control, group I (sham), Group II (hepatectomy + saline) and group III (hepatectomy + pentoxifylline). AST and ALT serum levels were determined at 2, 6 and 48 hours after the procedure, TNF- α and IL-6 serum levels and liver tissue levels were determined at 2 and 6 hours after the operation. Mitotic index and PCNA were performed to quantify liver regeneration 48 hours after the procedure. We found that pentoxifylline reduces TNF- α and IL-6 serum levels, without changes in the liver tissue levels. These results were associated with an improvement liver regeneration evaluated by the mitotic index and the PCNA. We concluded that pentoxifylline improved liver regeneration after 70% hepatectomy by a mechanism that comprises blood but not hepatic cytokines reduction.

Descriptors: 1.Liver regeneration 2.Hepatectomy 3.Cytokines 4.Rats

1 INTRODUÇÃO

A cirurgia do fígado apresentou extraordinário avanço desde a primeira ressecção planejada realizada por Langenbuch em 1888, passando pela primeira hepatectomia com controle vascular realizada por Lortat-Jacob em 1952, pelos estudos de Couinaud em 1957, e pelo primeiro transplante de fígado realizado por Starzl em 1963, até os dias de hoje, quando realizamos ressecções hepáticas extensas e transplantes de segmentos de fígado com bons resultados^{1, 2, 3, 4}.

Isso se deve graças a três importantes fatores: aos avanços tecnológicos na técnica cirúrgica, na anestesia e no tratamento intensivo pós-operatório; aos conhecimentos da anatomia segmentar hepática e ao reconhecimento da grande capacidade regenerativa do fígado.

Atualmente, nos EUA são realizados, em torno de 6.000 transplantes de fígado por ano, com sobrevida global de 86,49% no primeiro ano. Desse total cerca de 300 transplantes/ano são realizados pela modalidade intervivos⁵. Na Europa são realizados cerca de 5000 transplantes/ano, com sobrevida semelhante, em torno de 80% no primeiro ano. Nos centros europeus são realizados cerca de 200 transplantes intervivos por ano, com sobrevida de 76% no primeiro ano. Em adultos a sobrevida de enxertos provenientes de lobo direito foi de 77%, e de lobo esquerdo de 52%⁶. Essa diferença de sobrevida provavelmente ocorre porque, entre outros motivos,

nos transplantes intervivos, fígado reduzido ou bipartido para receptores adultos o tamanho do enxerto tem fundamental importância. Um fígado com massa hepática insuficiente, em um receptor com regime de pressão portal muito aumentada pode, no pós transplante, levar a manutenção da hipertensão portal e congestão do enxerto. Essa entidade, conhecida como “small for size”, se apresenta através de colestase, coagulopatia, ascite e frequentemente leva à perda do enxerto^{7, 8, 9}.

Estima-se que cerca de 10 a 15 mil casos/ano tem indicação de ressecção hepática para metástases de câncer colorretal nos EUA¹⁰. A hepatectomia é o tratamento de escolha para as metástases de câncer colorretal restritas ao fígado. A literatura tem mostrado que a ressecção de até 80% do fígado pode ser realizada com morbidade e mortalidade menores do que 5%¹¹. Em todo o mundo alargam-se as indicações de hepatectomias, particularmente, para tumores não colorretais e não neuroendócrinos¹². No entanto, com o aumento nas indicações e nos limites das ressecções, passamos cada vez mais a nos preocuparmos com o risco de insuficiência hepática pós-operatória.

Dificuldades como essas estimularam inúmeros estudos em regeneração hepática e a busca por métodos que possam melhorar o pós-operatório desses pacientes.

A regeneração hepática tem sido objeto de estudo por quase 100 anos^{13,14,15}, no entanto, o mecanismo pelo qual o hepatócito é estimulado à replicação ainda não foi completamente elucidado.

Inicialmente, acreditava-se que o fator desencadeador desse processo fosse o aumento do fluxo sanguíneo hepático, mas trabalhos como o de Glinos e Gey em 1952, que demonstraram que culturas de fibroblastos e hepatócitos proliferaram após o estímulo dado por soro de animais submetidos à hepatectomia parcial, levaram à conclusão de que fatores tróficos tenham fundamental importância na regeneração hepática¹⁶.

O aumento do influxo portal voltou a ser objeto de estudo após o advento do transplante de fígado parcial em adultos (transplante intervivos)^{17,18}, quando a síndrome de “small for size”, já referida anteriormente, se tornou um problema. Procedimentos para diminuir a hipertensão portal, como a esplenectomia, passaram a ser propostos por alguns autores, para diminuir o influxo portal, resultando em melhora no funcionamento desses enxertos^{19,20}.

Com efeito a literatura tem demonstrado que a esplenectomia promove a regeneração tanto em modelos de ratos cirróticos, como em hepatectomizados^{21,22}. Ueda e cols. em 2003, demonstraram que o TGF- β 1, um fator inibidor da regeneração hepática é produzido no baço, e mais uma vez fatores tróficos e inibitórios voltam a ser objetos de estudo²³.

As citocinas têm papel fundamental no mecanismo de regeneração do fígado²⁴. TNF- α e IL-1 parecem exercer papel fundamental na lesão hepática conseqüente à isquemia e reperfusão e após hepatectomia²⁵. O TNF- α , liberado de células de Kupffer ou de células endoteliais, estimula a expressão de moléculas de adesão (ICAM-1) e o acúmulo de neutrófilos nos sinusóides, acelera a lesão pós isquemia/reperfusão e estimula a produção de várias citocinas, entre elas a IL-6²⁶.

A IL-6 é um forte indutor da regeneração em ratos após hepatectomia a 70%, no entanto, a sua produção excessiva após hepatectomia a 90%, tem sido associada a efeitos adversos na microcirculação hepática e na regeneração do fígado ^{27, 28}.

Em ratos, tem sido demonstrado que os níveis séricos de TNF- α e de IL-6 estão elevados após as primeiras horas, enquanto a síntese de DNA no hepatócito se inicia 24 horas após a hepatectomia. Com a elevação dos níveis séricos da IL-6, forte ativação dos fatores de transcrição tem sido descrita, resultando em aumento da transcrição dos genes alvo. Esses resultados indicam que esses fatores podem estar envolvidos na mudança da fase G0 para G1 do hepatócito após a hepatectomia ^{29, 30}.

Para estudar a regeneração hepática adequadamente é necessário um método objetivo e confiável para quantificá-la. Vários são os métodos descritos para avaliação da regeneração hepática: determinação da massa hepática (peso do fígado), contagem de mitoses, estudo da síntese de DNA (incorporação de timidina e bromodeoxiuridina - BrdU) e métodos imunohistoquímicos para detecção de moléculas endógenas como a "proliferating cell nuclear antigen" (PCNA), DNA polimerase alfa, Ki-67, anti-PAA, anti-ribonucleotídeo redutase, entre outros ³¹.

A PCNA (proliferating cell nuclear antigen) é uma proteína auxiliar da DNA polimerase delta. Em células eucariontes é essencial na replicação do DNA. A sua expressão é dependente do ciclo celular, sendo primeiro detectada tardiamente na fase G1 e tem sua máxima expressão na fase S. Técnicas de imunohistoquímica são usadas para demonstrar

PCNA em hepatócitos e a forte presença do PCNA no núcleo representa a fase G1-S ou G2 ³¹.

A pentoxifilina (1-[5-oxohexil]-3,7-dimetilxantina) é um derivado da metilxantina, com ação hemorreológica, usada no tratamento de doença vascular periférica, cerebrovascular e outras condições envolvendo déficits da microcirculação ^{32,33}. Ela age primariamente aumentando o potencial de deformidade das hemácias, reduzindo a viscosidade do sangue e diminuindo a agregação plaquetária e a ocorrência de micro-trombos ³².

A pentoxifilina tem sido relatada como potente inibidor de síntese de TNF- α por monócitos e macrófagos ³⁴. A droga reduz a lesão pulmonar provocada por endotoxina e melhora a evolução do choque séptico provavelmente através da redução da produção de TNF- α por macrófagos ³⁵. Ela também atenua a lesão pulmonar do choque hemorrágico ^{36,37}. Em estudo realizado em nosso meio Matheus e colaboradores demonstraram que o uso da droga em modelo de pancreatite aguda experimental reduziu a resposta inflamatória sistêmica e local, as complicações infecciosas e diminuiu a mortalidade ³⁸.

Moser e cols. ³⁹ estudaram três drogas: pentoxifilina, ciprofloxacina e uma erva medicinal chinesa, como métodos de intervenção pré-operatória de ressecção hepática, em ratos com cirrose induzida por CCl₄. Após hepatectomia a 70%, os autores observaram um aumento na atividade proliferativa nos ratos tratados com pentoxifilina, melhora na sobrevida no período de indução da cirrose, mas não no período pós-operatório, e melhora no índice de fibrose hepática.

Tsutsumi e cols.²⁷ utilizando uma droga (FR167653) inibidora seletiva da produção de IL-1 β e TNF- α , após hepatectomia a 90% obtiveram melhora na proliferação dos hepatócitos e na regeneração do fígado. Da mesma maneira Hou e cols.⁴⁰ observaram melhora na regeneração hepática com a mesma droga após hepatectomia a 70%. No entanto Rudier e cols.⁴¹ estudando TNF- α como mediador de apoptose na isquemia/reperfusão em fígado de ratos, utilizaram a pentoxifilina em um modelo de isquemia em 70% do fígado associado à ressecção dos 30% restantes. No estudo, a pentoxifilina mostrou-se eficiente no bloqueio do TNF- α no tecido, na diminuição do nível de transaminases e na melhora da sobrevivência dos animais, mas a inibição do estímulo pelo TNF- α reduziu a proliferação dos hepatócitos.

Esses dados são conflitantes mostrando respostas diferentes na regeneração hepática, provocadas pela inibição do TNF- α . Sabemos da importância do TNF- α como citocina reguladora da fase inicial da regeneração hepática. Por outro lado é uma citocina envolvida na lesão hepática induzida por galactosamina, endotoxina, isquemia/reperfusão e na ressecção hepática^{42, 27}.

Considerando-se que a pentoxifilina é droga capaz de bloquear a síntese de TNF- α , e que o esse último atua na regeneração hepática tanto como estimulador do processo como indutor de lesão hepática, é possível que essa droga interfira, de algum modo, na resposta regenerativa do fígado.

2 OBJETIVO

O objetivo deste estudo é avaliar a influência da pentoxifilina na regeneração hepática em ratos submetidos à hepatectomia a 70%.

3 MÉTODOS

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Investigação Médica (LIM-37) da Disciplina de Transplante e Cirurgia do Fígado da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

3.1 Aspectos éticos

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAPPesq HC-FMUSP), sob o número: 1036/06. Foram respeitadas as normas de proteção e cuidados aos animais de experimentação segundo o Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Institute of Laboratory Animal Resources, Commission on Life Sciences, National Research Council. National Academy Press. 7th ed. Washington, D.C., 1996.

3.2 Material

Foram utilizados 70 ratos Wistar machos, pesando entre 225 e 260 g, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e mantidos no laboratório da Disciplina de Transplante e Cirurgia do Fígado, alimentados com ração comercial (Nuvilab CR1-Nuvital Nutrientes LTDA), hidratados com água filtrada *ad libitum* e submetidos a períodos de 12 horas de claro e escuro e a temperatura ambiente de 23°C.

3.3 Métodos

3.3.1 Grupos do experimento

Os animais foram divididos em 4 grupos (Figura 1):

Grupo Controle – Animais sacrificados para dosagem das transaminases no sangue (AST e ALT) e citocinas no sangue e no tecido hepático (TNF- α e IL-6), totalizando 6 ratos.

Grupo I – Animais submetidos à laparotomia e manipulação do fígado, sem hepatectomia. Estes animais foram sacrificados em 2 e 6 horas para dosagem das transaminases no sangue (AST e ALT) e citocinas (IL-6 e TNF- α) no sangue e no tecido hepático, totalizando 12 animais.

Grupo II – Animais submetidos à hepatectomia a 70% e administração de solução salina por via intraperitoneal. Destes, 20 animais foram sacrificados em 2 e 6 horas para dosagem das transaminases no sangue

(AST e ALT) e citocinas (IL-6 e TNF- α) no sangue e no tecido hepático, e 6 animais foram sacrificados 48hs após a hepatectomia para estudo histológico com avaliação do índice mitótico e estudo imunohistoquímico com determinação do PCNA, totalizando 26 animais.

Grupo III – Animais submetidos à hepatectomia a 70% e administração de pentoxifilina 25mg/kg por via intraperitoneal. Destes, 20 animais foram sacrificados em 2 e 6 horas para dosagem das transaminases no sangue (AST e ALT) e citocinas (TNF- α e IL-6) no sangue e no tecido hepático, e 6 animais foram sacrificados 48hs após a hepatectomia para estudo histológico com avaliação do índice mitótico e imunohistoquímico com determinação do PCNA, totalizando 26 animais.

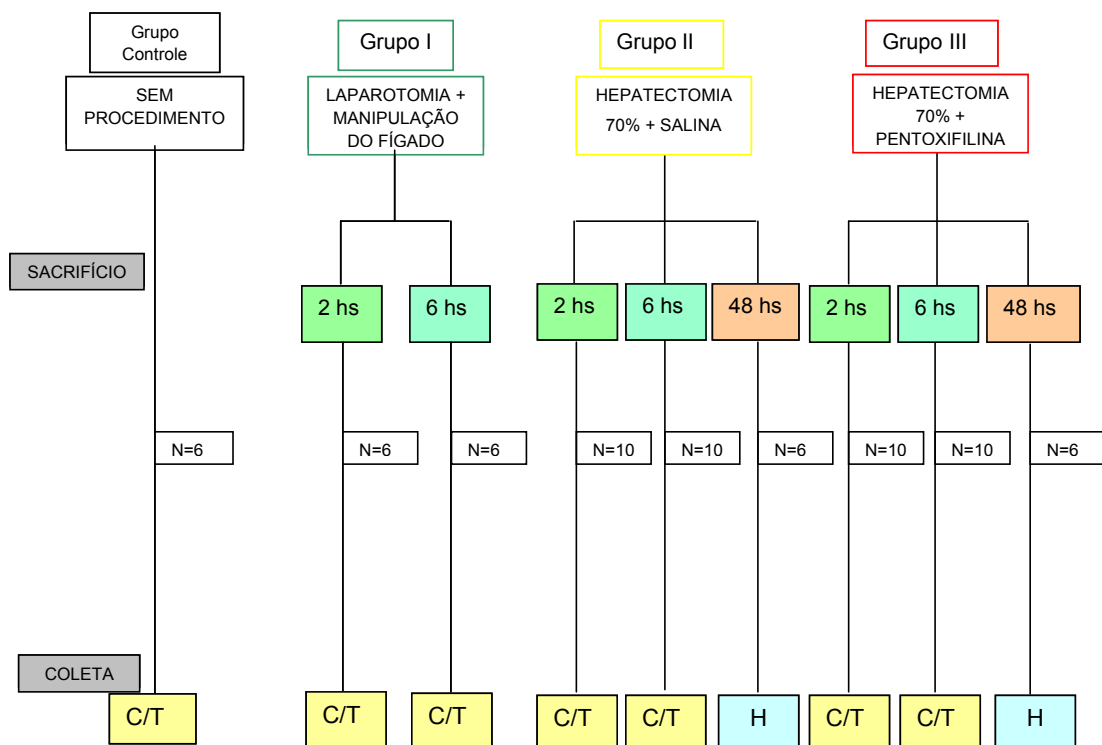


Figura 1. Grupos do experimento

- C/T Citocinas no sangue e tecido hepático (TNF- α e IL-6) / transaminases (AST e ALT);
- H Histologia (PCNA e índice mitótico)

3.3.2 Procedimento cirúrgico

Os animais foram anestesiados com cloridrato de cetamina 5% (Ketalar®, Cristália) na dose 100 mg/kg de peso e submetidos a laparotomia mediana, estendendo-se por aproximadamente 4cm, a partir do apêndice xifóide. Após a liberação dos ligamentos do fígado, os lobos mediano e ântero-lateral esquerdo foram removidos com ligadura única de seus pedículos e veias, para a remoção de 70% da massa hepática dos animais, conforme técnica descrita por Higgins e Anderson em 1931¹³. As incisões foram então fechadas com sutura contínua com mononylon® 4.0.

3.3.3 Administração de Pentoxifilina e solução salina

A administração da pentoxifilina foi realizada na dose de 25mg/Kg e volume de 1,25 ml/kg por via intraperitoneal imediatamente após o término da hepatectomia.

A administração de solução salina a 0,9% foi realizada em volume de 1,25 ml/kg por via intraperitoneal imediatamente após o término da hepatectomia.

Os animais que foram mantidos vivos por 48 horas para estudo histológico, receberam nova administração da droga, ou salina, a cada 12hs, até o sacrifício.

3.3.4 Coleta do material para análise

Todos os animais foram submetidos à laparotomia ou reabertura da parede abdominal e a coleta de sangue por punção cardíaca. Foram, então, sacrificados por secção da aorta e veia cava inferior. Nos animais do grupo Controle e aqueles sacrificados com 2 e 6 horas nos demais grupos foram realizadas: 1) dosagem de TNF- α e IL-6 no fígado remanescente; 2) dosagem das transaminases hepáticas (aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase) e das citocinas (IL-6 e TNF- α) no sangue coletado. No fígado remanescente dos animais sacrificados com 48 horas foi realizada dosagem de transaminases e estudo histológico (PCNA e índice mitótico).

3.3.5 Análise dos materiais coletados

3.3.5.1 Histologia

Os fragmentos do tecido hepático, fixados em solução de formol a 2% e corados com hematoxilina e eosina, foram submetidos à análise histológica por microscopia óptica por um único patologista sem conhecimento dos grupos estudados. Foi avaliado e quantificado o índice mitótico (contagem de núcleos de hepatócitos em mitose em 20 campos do maior aumento - 400x). Os fragmentos foram então submetidos a estudo imunohistoquímico pela técnica de PCNA, para quantificação da regeneração hepática (contagem de núcleos positivos em 20 campos no maior aumento - 400x).

3.3.5.2 Análise bioquímica

As transaminases, aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), foram avaliadas como indicadores de lesão hepática. A quantificação de AST e ALT foi realizada pelo método ultravioleta otimizado (COBAS MIRA, Roche) de acordo com a *International Federation of Clinical Chemistry*. Os resultados foram expressos em unidades por litro (U/L).

3.3.5.3 Dosagem das citocinas

O sangue coletado foi imediatamente centrifugado por 10 minutos a 0°C, 5000rpm, e o sobrenadante foi estocado a -20°C para dosagem de TNF- α e IL-6.

O tecido hepático foi homogeneizado em solução salina, centrifugado por 10 minutos a 0°C, 5000 rpm e o sobrenadante estocado a -20°C para dosagem de TNF- α , IL-6 e proteínas totais ⁴³.

A quantificação dos mediadores foi realizada por ensaio imunoenzimático (ELISA) através da utilização dos kits da *Biosource International Cytoscreen* (Camarillo, Califórnia, EUA) e expressa em pg/ml no soro e pg/mg de proteína no tecido hepático.

3.3.6 Análise estatística

O número de experimentos baseou-se nos trabalhos de Tsutsumi e cols.²⁷ e Hou e cols.⁴⁰ que estudaram outra droga inibidora de TNF- α (FR 167653) em modelo semelhante de regeneração hepática.

Os resultados das dosagens das transaminases hepáticas (AST e ALT) e mediadores inflamatórios (TNF- α e IL-6) foram analisados pelo teste ANOVA. Quando houve diferença estatística foi aplicado o teste de Tukey^{44, 45}.

Os resultados da histologia (índice mitótico e PCNA) foram analisados pelo teste de Mann Whitney.

Em todas as análises estatísticas o nível de significância considerado foi de $p < 0,05$ e utilizou-se o Programa Estatístico Graph Pad Prism 2.0.

4 RESULTADOS

4.1 Transaminases

Não se observou após 2 horas diferença estatisticamente significativa entre os níveis de AST do grupo laparotomia (AST: 129 ± 18 U/L) e os do grupo controle (AST: 125 ± 17 U/L). Verificou-se, no entanto, diferença significativa entre os níveis de ALT do grupo laparotomia (ALT 139 ± 17 U/L) e o grupo controle (ALT: 62 ± 21 U/L). (Figuras 2 e 3)

Duas horas após a hepatectomia as transaminases séricas tanto no grupo salina (AST: 207 ± 41 U/L; ALT: 101 ± 30 U/L) como no grupo pentoxifilina (AST: 240 ± 33 U/L; ALT: 108 ± 46 U/L) não diferiram entre si e dos grupos controle e laparotomia. (Figuras 2 e 3).

Seis horas após a hepatectomia observou-se elevação estatisticamente significativa dos níveis de AST nos grupos salina (AST: 387 ± 96 U/L) e no grupo pentoxifilina (390 ± 89 U/L) em comparação com o grupo controle. Não houve, no entanto, diferença significativa entre os grupos salina e pentoxifilina.

Seis horas após o procedimento, no grupo laparotomia não observamos diferença significativa dos níveis de AST (217 ± 21 U/L) quando comparados com o grupo controle (Figura 4).

Com relação aos níveis séricos de ALT, seis horas após a hepatectomia observamos diferenças significativas nos grupos salina (268 ± 87 U/L) e no grupo pentoxifina (250 ± 101 U/L) quando comparados com o grupo controle. Não se observou diferença significativa entre os grupos salina e pentoxifilina quando comparados ao grupo laparotomia (Figura 5). No grupo laparotomia após 6 horas também observamos elevação significativa nos níveis de ALT (231 ± 52 U/L) quando comparados com o grupo controle.

Após 48 horas os níveis de transaminases nos grupos hepatectomia com salina (AST: 197 ± 16 U/L; ALT: 71 ± 10 U/L) e pentoxifilina (AST: 199 ± 19 U/L; ALT: 62 ± 7 U/L) não diferiram entre si e nem do grupo controle (Figura 6 e 7).

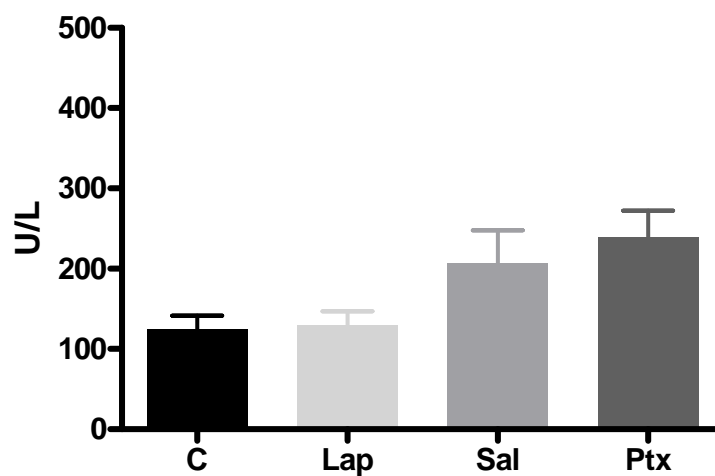


Figura 2. Níveis séricos de AST 2 horas após a hepatectomia – resultados expressos em média \pm desvio padrão

C x Lap = $p > 0,05$ C x Ptx = $p > 0,05$ Lap x Ptx = $p > 0,05$

C x Sal = $p > 0,05$ Lap x Sal = $p > 0,05$ Sal x Ptx = $p > 0,05$

C: controle; Lap: laparotomia; Sal: salina; Ptx: pentoxifilina

C e Lap - N=6; Sal e Ptx: - N=10

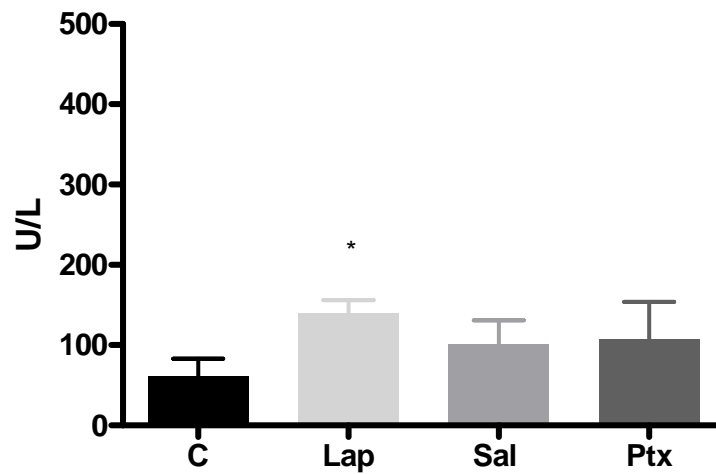


Figura 3. Níveis séricos de ALT 2 horas após a hepatectomia – resultados expressos em média \pm desvio padrão

C x Lap = $p < 0,05$ C x Ptx = $p > 0,05$ Lap x Ptx = $p > 0,05$
C x Sal = $p > 0,05$ Lap x Sal = $p > 0,05$ Sal x Ptx = $p > 0,05$
C: controle; Lap: laparotomia; Sal: salina; Ptx: pentoxifilina
C e Lap - N=6; Sal e Ptx: - N=10

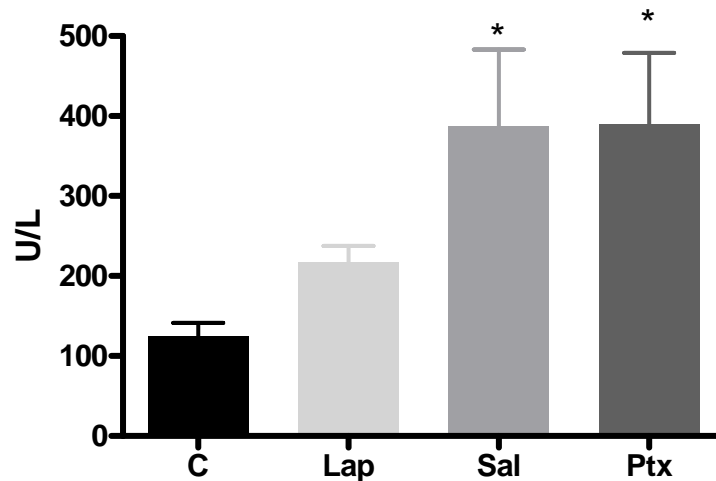


Figura 4. Níveis séricos de AST 6 horas após a hepatectomia – resultados expressos em média \pm desvio padrão

C x Lap = $p < 0,05$ C x Ptx = $p < 0,05$ Lap x Ptx = $p < 0,05$
C x Sal = $p < 0,05$ Lap x Sal = $p < 0,05$ Sal x Ptx = $p > 0,05$
C: controle; Lap: laparotomia; Sal: salina; Ptx: pentoxifilina
C e Lap - N=6; Sal e Ptx: - N=10

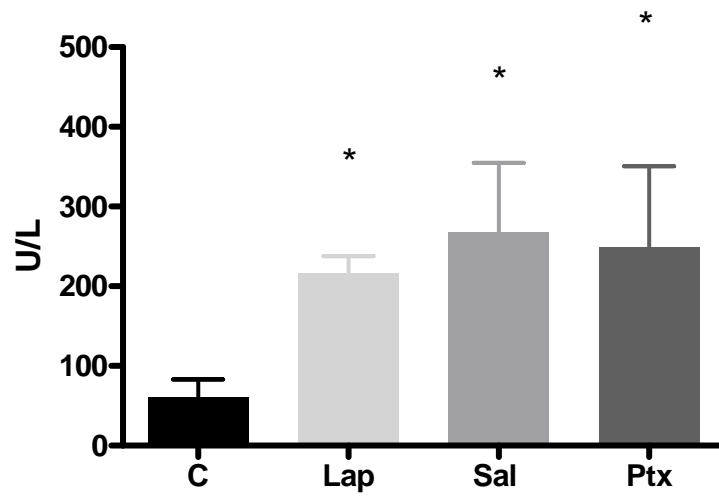


Figura 5. Níveis séricos de ALT 6 horas após a hepatectomia – resultados expressos em média \pm desvio padrão

C x Lap = $p < 0,05$ C x Ptx = $p < 0,05$ Lap x Ptx = $p > 0,05$

C x Sal = $p < 0,05$ Lap x Sal = $p > 0,05$ Sal x Ptx = $p > 0,05$

C: controle; Lap: laparotomia; Sal: salina; Ptx: pentoxifilina

C e Lap - N=6; Sal e Ptx: - N=10

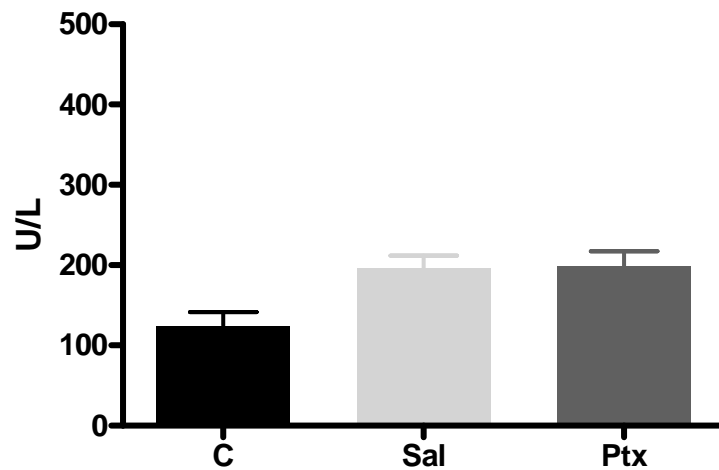


Figura 6. Níveis séricos de AST 48 horas após a hepatectomia – resultados expressos em média \pm desvio padrão

C x Sal = $p > 0,05$ C x Ptx = $p > 0,05$ Sal x Ptx = $p > 0,05$

C: controle; Sal: salina; Ptx: pentoxifilina

C - N=6; Sal e Ptx: - N=10

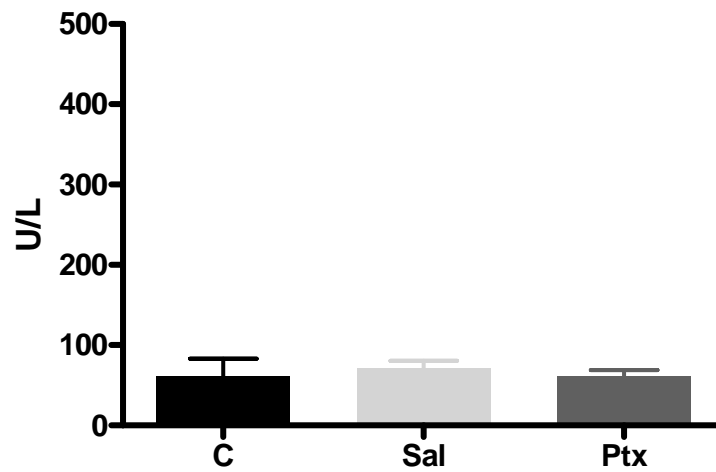


Figura 7. Níveis séricos de ALT 48 horas após a hepatectomia – resultados expressos em média \pm desvio padrão

C x Sal = $p > 0,05$ C x Ptx = $p > 0,05$ Sal x Ptx = $p > 0,05$

C: controle; Sal: salina; Ptx: pentoxifilina

C - N=6; Sal e Ptx: - N=10

4.2 Citocinas

4.2.1 TNF- α

O TNF- α determinado no soro dos grupos controle e nos grupos laparotomia em 2 e 6 horas após os procedimentos foram indetectáveis (tabelas 1 e 2; Figuras 8 e 9).

Duas horas após hepatectomia no grupo salina houve elevação significativa dos níveis séricos de TNF- α (43 ± 47 pg/ml). No grupo hepatectomia com pentoxifilina os níveis séricos de TNF- α se mantiveram

significativamente mais baixos (8 ± 11 pg/ml) quando comparados com o grupo salina (Tabela 1; Figura 8).

Seis horas após a hepatectomia os níveis de TNF- α se mantiveram elevados no grupo salina (58 ± 92 pg/ml). No grupo pentoxifilina os níveis séricos de TNF- α mostraram-se mais baixos (24 ± 19 pg/ml) mas não foram significativamente diferentes do grupo salina (Tabela 2; Figura 9).

A determinação de TNF- α no tecido hepático do grupo controle ($15,47 \pm 2,49$ pg/mg de proteína) não diferiu dos níveis encontrados em 2 e 6 horas no grupo laparotomia (2hs: $12,88 \pm 2,65$ pg/mg de proteína e 6hs: $13,37 \pm 2,15$ pg/mg de proteína). Duas horas após a hepatectomia os níveis de TNF- α do tecido estão elevados em relação ao grupo controle, tanto no grupo salina ($29,67 \pm 7,71$ pg/mg de proteína) como no grupo pentoxifilina ($28,73 \pm 9,96$ pg/mg de proteína). Contudo não se observaram diferenças significativas entre os grupos com salina e com pentoxifilina (Tabela 1; Figura 10).

Seis horas após os procedimentos os níveis no tecido hepático de TNF- α foram significativamente mais elevados nos grupos com salina ($32,35 \pm 9,50$ pg/mg de proteína) quando comparados com os grupos controle e laparotomia. No grupo pentoxifilina os níveis de TNF- α no tecido hepático ($26,78 \pm 17,30$ pg/mg de proteína) não diferiram estatisticamente do grupo salina, porém foram diferentes dos níveis de TNF- α dos grupos controle e laparotomia (Tabela 2; Figura 11).

Tabela 1. Mediadores inflamatórios 2 horas após hepatectomia

	TNF- α soro pg/ml	IL-6 soro pg/ml	TNF- α tecido pg/mg proteína *	IL-6 tecido pg/mg proteína
Controle N=6	0	0	15,47 \pm 2,49	25,10 \pm 2,08
Laparotomia N=6	0	0	12,88 \pm 2,65	40,74 \pm 7,08
Salina N=10	* 43 \pm 47	* 59 \pm 32	29,67 \pm 7,71	46,52 \pm 10,24
Pentoxifilina N=10	8 \pm 11	10 \pm 17	28,73 \pm 9,96	47,23 \pm 10,06

Valores das médias \pm desvio padrão das dosagens de TNF- α e IL-6 no tecido hepático e no soro. * $p < 0,05$

Tabela 2. Mediadores inflamatórios 6 horas após hepatectomia

	TNF- α soro pg/ml	IL-6 soro pg/ml	TNF- α tecido pg/mg proteína	IL-6 tecido pg/mg proteína
Controle N=6	0	0	* 15,47 \pm 2,49	25,10 \pm 2,08
Laparotomia N=6	0	0	13,37 \pm 2,15	41,29 \pm 8,97
Salina N=10	58 \pm 92	* 97 \pm 56	32,35 \pm 9,50	36,45 \pm 4,85
Pentoxifilina N=10	24 \pm 19	39 \pm 45	26,78 \pm 17,30	36,79 \pm 6,35

Valores das médias \pm desvio padrão das dosagens de TNF- α e IL-6 no tecido hepático e no soro. * $p < 0,05$

Os resultados individuais por grupo da determinação dos mediadores inflamatórios estão descritos nos anexos 1 e 2.

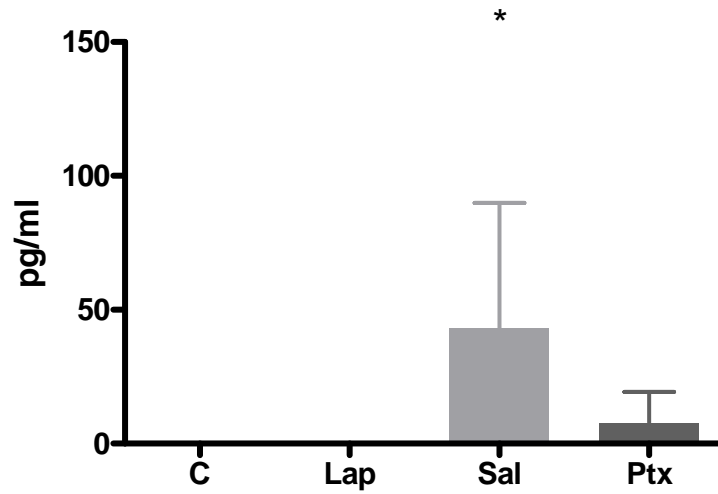


Figura 8. Dosagem de TNF- α no soro 2 horas após a hepatectomia – resultados expressos em média \pm desvio padrão

C x Lap = $p > 0,05$ C x Ptx = $p > 0,05$ Lap x Ptx = $p > 0,05$
 C x Sal = $p < 0,05$ Lap x Sal = $p < 0,05$ Sal x Ptx = $p < 0,05$
 C: controle; Lap: laparotomia; Sal: salina; Ptx: pentoxifilina
 C e Lap - N=6; Sal e Ptx: - N=10

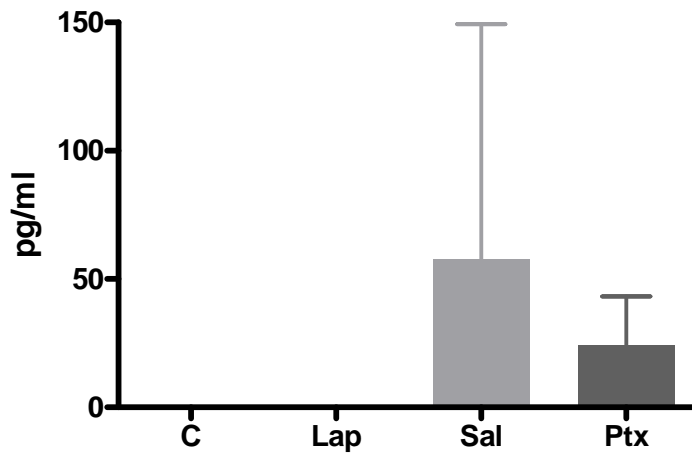


Figura 9. Dosagem de TNF- α no soro 6 horas após a hepatectomia – resultados expressos em média \pm desvio padrão

C x Lap = $p > 0,05$ C x Ptx = $p > 0,05$ Lap x Ptx = $p > 0,05$
 C x Sal = $p > 0,05$ Lap x Sal = $p > 0,05$ Sal x Ptx = $p > 0,05$
 C: controle; Lap: laparotomia; Sal: salina; Ptx: pentoxifilina
 C e Lap - N=6; Sal e Ptx: - N=10

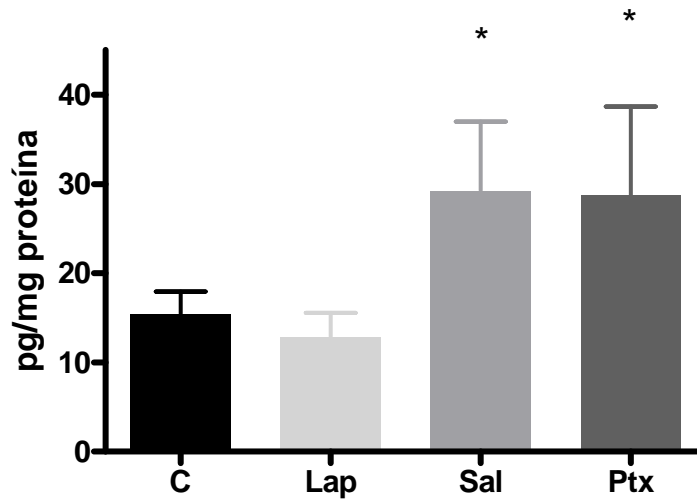


Figura 10. Dosagem de TNF- α no tecido 2 horas após a hepatectomia – resultados expressos em média \pm desvio padrão

C x Lap = $p > 0,05$ C x Ptx = $p < 0,05$ Lap x Ptx = $p < 0,05$
C x Sal = $p < 0,05$ Lap x Sal = $p < 0,05$ Sal x Ptx = $p > 0,05$
C: controle; Lap: laparotomia; Sal: salina; Ptx: pentoxifilina
C e Lap - N=6; Sal e Ptx: - N=10

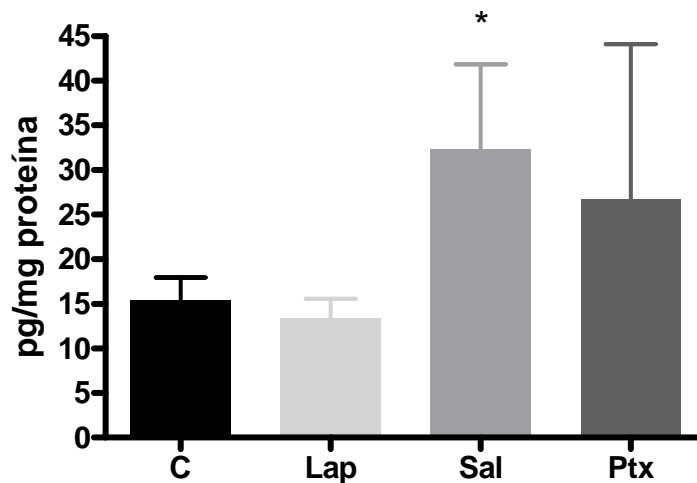


Figura 11. Dosagem de TNF- α no tecido 6 horas após a hepatectomia – resultados expressos em média \pm desvio padrão

C x Lap = $p > 0,05$ C x Ptx = $p > 0,05$ Lap x Ptx = $p > 0,05$
C x Sal = $p < 0,05$ Lap x Sal = $p < 0,05$ Sal x Ptx = $p > 0,05$
C: controle; Lap: laparotomia; Sal: salina; Ptx: pentoxifilina
C e Lap - N=6; Sal e Ptx: - N=10

4.2.2 IL- 6

Os níveis séricos de IL-6 nos grupos controle e com laparotomia 2 e 6 horas foram indetectáveis (Tabela 1; Figura 12).

Duas horas após a hepatectomia no grupo salina houve elevação significativa dos níveis séricos de IL-6 (59 ± 32 pg/ml). No grupo pentoxifilina os níveis séricos de IL-6 (10 ± 17 pg/ml) foram significativamente mais baixos quando comparados com o grupo salina ($p < 0,05$) (Tabela 1; Figura 12).

Seis horas após a hepatectomia os níveis séricos de IL-6 mantiveram-se elevados no grupo salina (97 ± 56 pg/ml). No grupo pentoxifilina os níveis de IL-6 foram significativamente mais baixos (39 ± 45 pg/ml) quando comparados com os do grupo salina (Tabela 2; Figura 13).

Duas horas após os procedimentos os níveis de IL-6 no tecido hepático após laparotomia ($40,74 \pm 7,08$ pg/mg de proteína), no grupo hepatectomia (salina: $46,52 \pm 10,24$ pg/mg de proteína) e no grupo hepatectomia com pentoxifilina ($47,23 \pm 10,06$ pg/mg de proteína) não diferiram entre si e foram significativamente mais elevados do que no grupo controle ($25,10 \pm 2,08$ pg/mg de proteína) (Tabela 1; Figura 14).

Seis horas após os procedimentos os níveis no tecido hepático de IL-6 nos grupos laparotomia ($41,29 \pm 8,97$ pg/mg de proteína), hepatectomia com salina ($36,45 \pm 4,83$ pg/mg de proteína), hepatectomia com pentoxifilina ($36,79 \pm 6,35$ pg/mg de proteína) não diferiram entre si, porém foram significativamente mais elevados que no grupo controle ($25,10 \pm 2,08$ pg/mg de proteína) (Tabela 1; Figura 15).

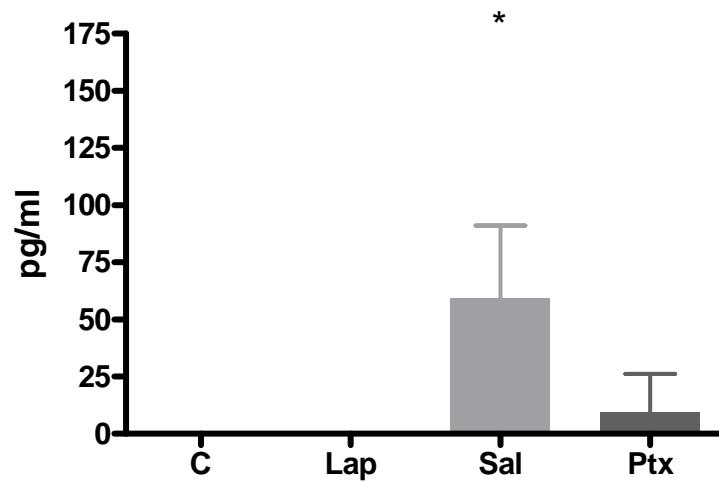


Figura 12. Dosagem de IL-6 no soro 2 horas após a hepatectomia – resultados expressos em média \pm desvio padrão

C x Lap = $p > 0,05$ C x Ptx = $p > 0,05$ Lap x Ptx = $p > 0,05$

C x Sal = $p < 0,05$ Lap x Sal = $p < 0,05$ Sal x Ptx = $p < 0,05$

C: controle; Lap: laparotomia; Sal: salina; Ptx: pentoxifilina

C e Lap - N=6; Sal e Ptx: - N=10

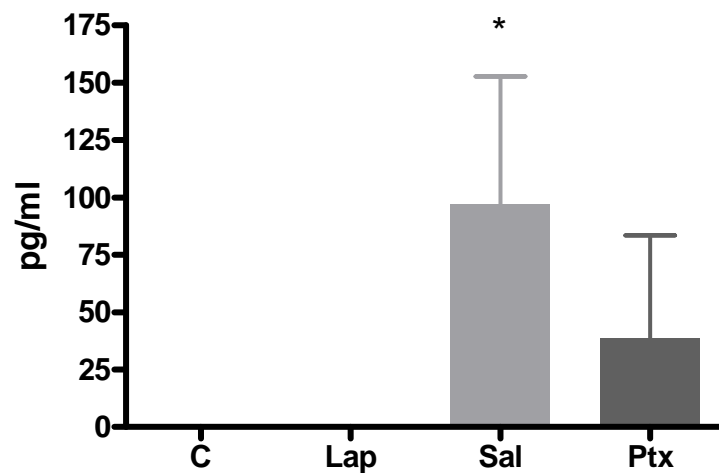


Figura 13. Dosagem de IL-6 no soro 6 horas após a hepatectomia – resultados expressos em média \pm desvio padrão

C x Lap = $p > 0,05$ C x Ptx = $p > 0,05$ Lap x Ptx = $p > 0,05$

C x Sal = $p < 0,05$ Lap x Sal = $p < 0,05$ Sal x Ptx = $p < 0,05$

C: controle; Lap: laparotomia; Sal: salina; Ptx: pentoxifilina

C e Lap - N=6; Sal e Ptx: - N=10

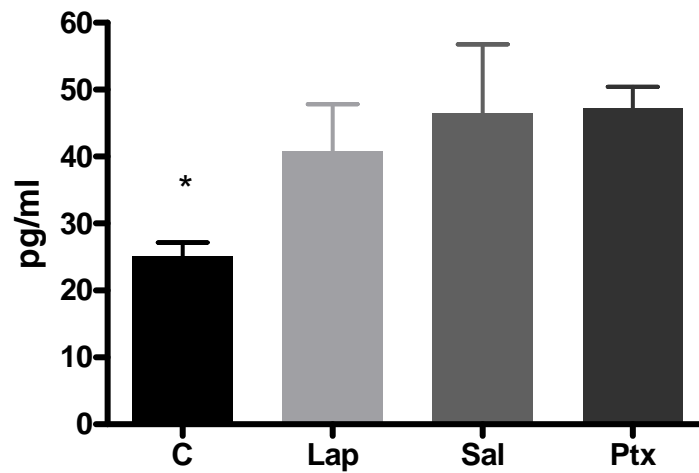


Figura 14. Dosagem de IL-6 no tecido 2 horas após a hepatectomia – resultados expressos em média \pm desvio padrão

C x Lap = $p < 0,05$ C x Ptx = $p < 0,05$ Lap x Ptx = $p > 0,05$

C x Sal = $p < 0,05$ Lap x Sal = $p > 0,05$ Sal x Ptx = $p > 0,05$

C: controle; Lap: laparotomia; Sal: salina; Ptx: pentoxifilina

C e Lap - N=6; Sal e Ptx: - N=10

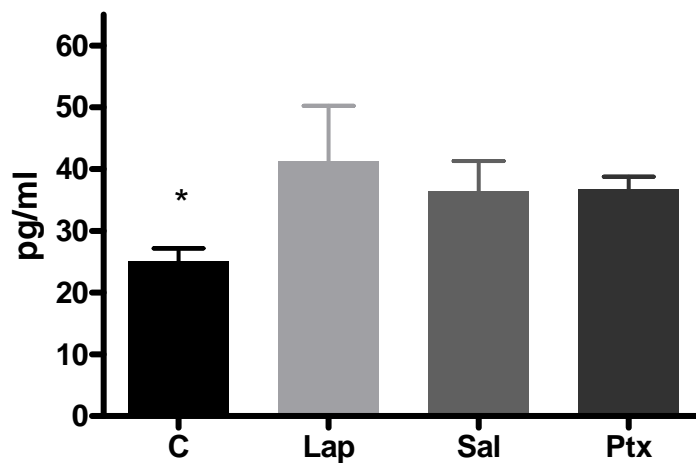


Figura 15. Dosagem de IL-6 no tecido 6 horas após a hepatectomia – resultados expressos em média \pm desvio padrão.

C x Lap = $p < 0,05$ C x Ptx = $p < 0,05$ Lap x Ptx = $p > 0,05$

C x Sal = $p < 0,05$ Lap x Sal = $p > 0,05$ Sal x Ptx = $p > 0,05$

C: controle; Lap: laparotomia; Sal: salina; Ptx: pentoxifilina

C e Lap - N=6; Sal e Ptx: - N=10

4.3 Histologia

Os resultados obtidos pelo estudo histopatológico 48 horas após a hepatectomia mostraram elevação significativa do índice mitótico ($2,9 \pm 1,2$ núcleos/20 campos) e do PCNA ($12,1 \pm 3,8$ núcleos/20 campos) no grupo de animais tratados com pentoxifilina, quando comparados com o do grupo salina (índice mitótico: $1,7 \pm 0,5$ núcleos/20 campos; PCNA: $6,1 \pm 2,2$ núcleos/20 campos) (tabela 3; Figuras 16 e 17).

Tabela 3. Parâmetros utilizados para análise da regeneração hepática 48 horas após hepatectomia

	PCNA por hepatócito (núcleos/20 campos)	Índice mitótico (núcleos/20 campos)
Salina	*	*
N=6	$6,1 \pm 2,2$	$1,7 \pm 0,5$
Pentoxifilina N=6	$12,1 \pm 3,8$	$2,9 \pm 1,2$

Valores das médias \pm desvio padrão das determinações do índice mitótico e do PCNA nos fígados regenerados. * $p < 0,05$ (Mann-Whitney)

Os resultados individuais por grupo da determinação do índice mitótico e do PCNA estão descritos nos anexo 3.

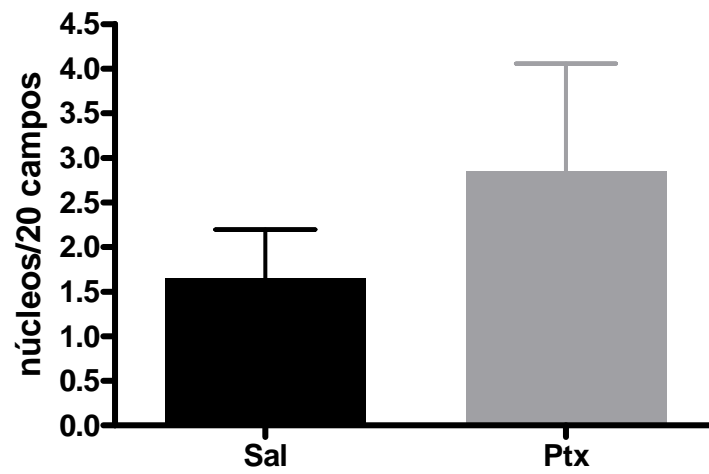


Figura 16. Índice mitótico 48 horas após a hepatectomia – resultados expressos em média \pm desvio padrão

Sal x Ptx = $p < 0,05$ Sal: salina; Ptx: pentoxifilina N=6

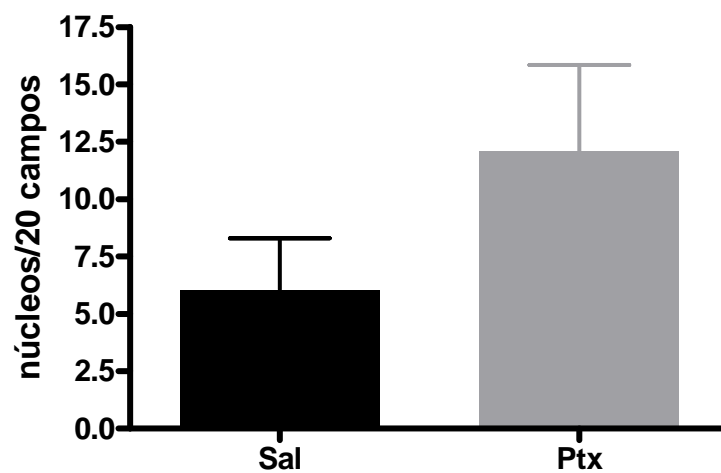


Figura 17. PCNA 48 horas após a hepatectomia – resultados expressos em média \pm desvio padrão

Sal x Ptx = $p < 0,05$ Sal: salina; Ptx: pentoxifilina N=6

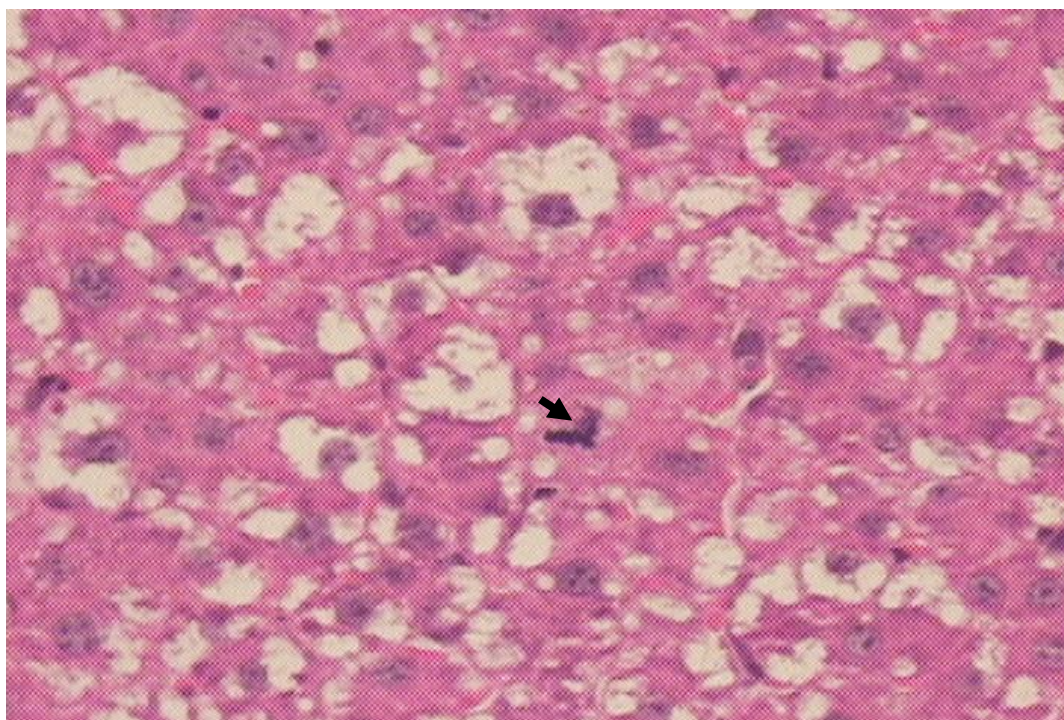


Figura 18. Baixo índice mitótico no grupo II (hepatectomia + salina – H&E 400x)

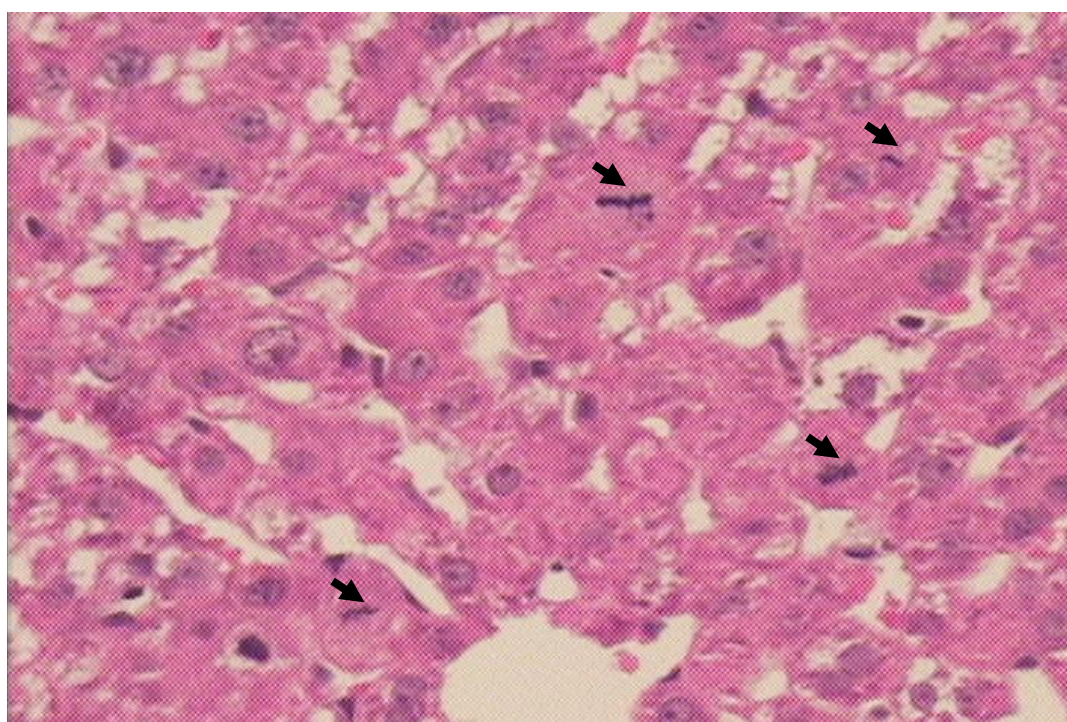


Figura 19. Alto índice mitótico no grupo III (hepatectomia + pentoxifilina – H&E 400x)

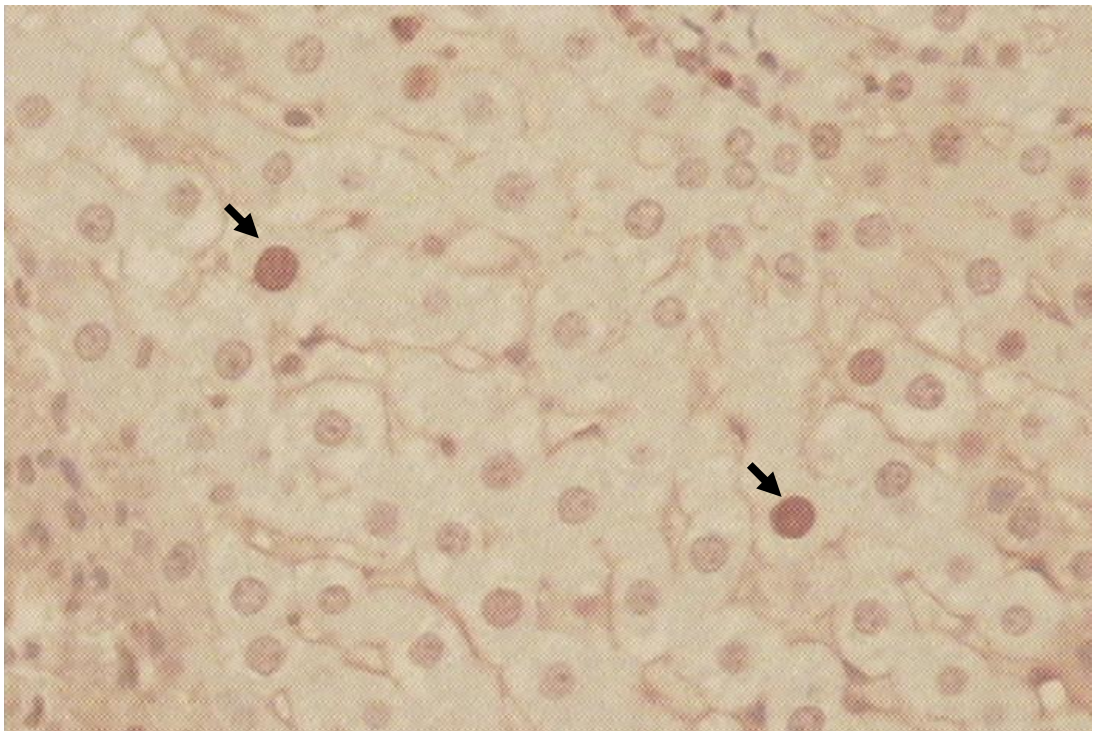


Figura 20. Baixo índice do PCNA, poucos núcleos positivos (Grupo II – hepatectomia + salina – 400x)

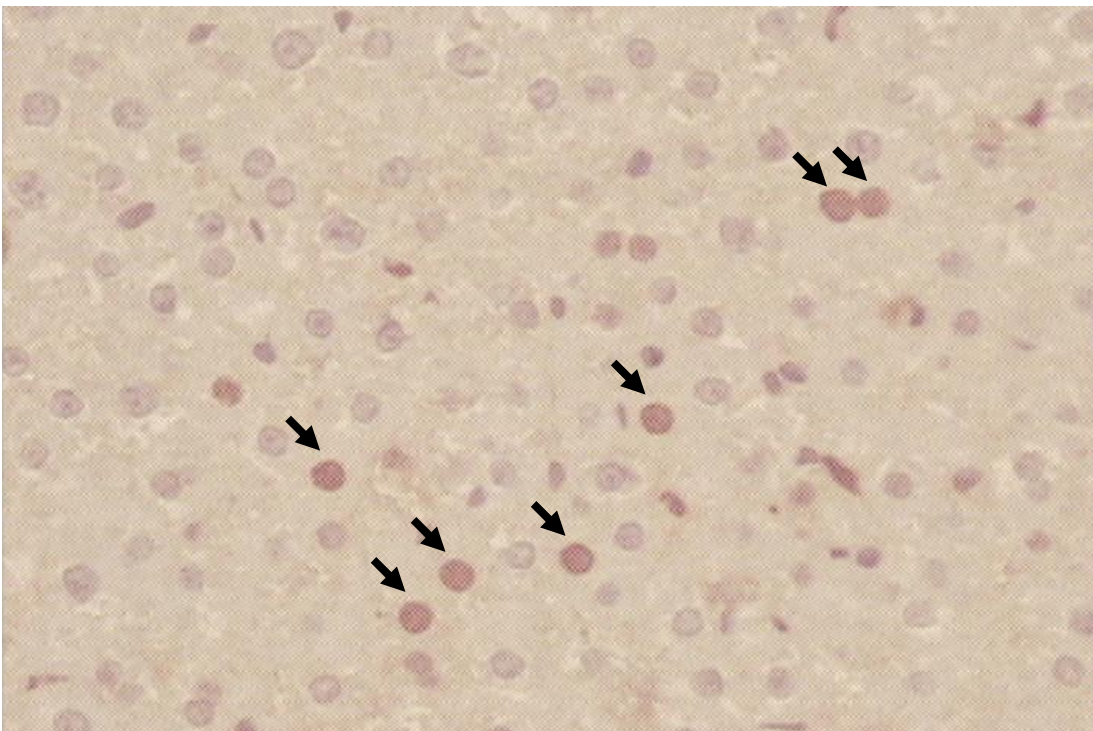


Figura 21. Alto índice mitótico do PCNA, numerosos núcleos positivos (Grupo III – hepatectomia + Pentoxifilina – 400x)

5 DISCUSSÃO

A cirurgia hepática sofreu extraordinário progresso nas últimas décadas graças a três pontos fundamentais: 1) melhor conhecimento da anatomia hepática, 2) aperfeiçoamento técnico e 3) conhecimento do processo de regeneração hepática.

O conhecimento de que o fígado pode regenerar-se vem desde a mitologia grega, no entanto foi somente em 1931 que se conseguiu demonstrar experimentalmente a capacidade regenerativa do fígado ¹³.

Desde então numerosos trabalhos demonstraram a capacidade regenerativa do fígado e expuseram condições e fatores que podem modificar tal processo ^{46,47,48,49}. Esse processo pôde inclusive ser comprovado através de diversos estudos clínicos e mesmo na prática cirúrgica diária ^{11, 12, 14}.

A resposta do organismo à ressecção hepática se faz não através da regeneração dos segmentos ressecados, mas sim através de hiperplasia dos remanescentes ⁵⁰.

Para a quantificação da regeneração hepática, durante a confecção desse estudo utilizamos o índice mitótico e o método imunohistoquímico: PCNA (“proliferating cell nuclear antigen”). Esses são métodos aceitos pela literatura e os mais freqüentemente utilizados ^{51, 31}.

O peso do fígado para quantificar a massa hepática é um método facilmente aplicável, de baixo custo e, embora de pouca utilização na prática

clínica, a não ser pelo uso de métodos de imagens que avaliam o volume hepático, é ainda bastante utilizado em trabalhos experimentais. O problema deste método é que o peso do fígado varia com o grau de deposição de lipídios, glicogênio e células inflamatórias não residentes, que pode não estar relacionado ao processo regenerativo ou a atividade hiperplásica. Além disso, o fígado é um grande reservatório de sangue, e variações no fluxo sanguíneo hepático podem alterar as medidas.

Outros métodos bastante utilizados na literatura são a incorporação de timidina e da bromodeoxiuridina (BrdU: um análogo da timidina) no DNA. Estes são métodos que avaliam a síntese de DNA. Seu uso, porém, requer pré-injeção com isótopos radioativos ou nucleotídeos, que os torna impraticáveis para estudos em humanos, porém úteis em estudos experimentais. Outras limitações a esse método de estudo são: o fato de que a incorporação da timidina refletir não só a síntese de DNA, mas também o reparo do DNA e possivelmente a síntese de RNA; a incorporação não específica de timidina nos lipídios; a possibilidade de reutilização da timidina do DNA de células necróticas vizinhas e perturbações da replicação do DNA e da progressão do ciclo celular pela própria timidina³¹.

O índice mitótico é método largamente utilizado na literatura e de fácil aplicabilidade, mas também tem suas desvantagens. Como a fase de mitose constitui-se em um segmento muito curto do ciclo celular, a observação de mitoses no microscópio de luz é infreqüente e variável de acordo com a amostra, e sua contagem como método de mensurar a regeneração

hepática está sujeita a erros. Por isso a utilização de outro método bastante confiável se fez necessário.

A maioria das técnicas imunohistoquímicas é baseada no uso de anticorpos contra moléculas endógenas contidas nos tecidos como a “proliferating cell nuclear antigen” (PCNA), e outras como: DNA polimerase alfa, Ki-67, anti-PAA, anti-ribonucleotídeo redutase, entre outros. A mais comumente utilizada é a técnica do PCNA. Trata-se de uma proteína auxiliar da DNA polimerase delta. Em células eucariontes é essencial na replicação do DNA. A sua expressão é dependente do ciclo celular, sendo primeiro detectada tardiamente na fase G1 e tem sua máxima expressão na fase S. Técnicas de imunohistoquímica são usadas para demonstrar PCNA em hepatócitos e a forte presença do PCNA no núcleo representa a fase G1-S ou G2. Embora tenham sido descritas limitações ao uso desta técnica ^{31, 51}, ela apresenta diversas vantagens como boa correlação com outros marcadores de proliferação celular, incluindo incorporação de timidina e atividade da timidinaquinase e o fato de poder ser usada em materiais de arquivo. O índice do PCNA dado por técnica de imunohistoquímica mostra um pequeno aumento documentado após 12 horas da hepatectomia, que aumenta em 24 horas e passa a ser estatisticamente significativa, mas tem seu pico em 36 a 48 horas após o procedimento ⁵¹. Por essa razão nesse estudo realizamos o sacrifício dos animais que foram para estudo histológico 48 horas após a hepatectomia.

O início do processo de regeneração depende da extensão da ressecção ou da lesão e envolve mediadores similares a aqueles encontrados na inflamação aguda.

No fígado normal os hepatócitos estão na fase quiescente G0. Após ressecção ou lesão os hepatócitos remanescentes entram na fase G1. Citocinas derivadas das células de Kupffer entre elas TNF- α e a seguir IL-6 agem contribuindo para o início do ciclo celular.

TNF- α e IL-6 são citocinas da fase inicial da resposta inflamatória sistêmica secundária à infecção ou lesão tecidual ²⁵.

A infusão de TNF- α é capaz de induzir a proliferação das células de Kupffer, já que hepatócitos do fígado intacto raramente ou pouco proliferam ⁴². O TNF- α é reconhecido como regulador da fase inicial de regeneração hepática após ressecção parcial e após lesão hepática ^{25, 52}, sendo capaz de aumentar a atividade da DNA polimerase e a incorporação de [H₃] timidina no DNA dos hepatócitos ⁴².

Se, como vimos, o TNF- α é capaz de promover a regeneração hepática, de outro lado pode ser também responsável por lesão hepatocitária como foi demonstrado nas lesões induzidas por galactosamina, por endotoxina, após ressecção e por isquemia/reperfusão ^{42, 27}.

A IL-6 é uma citocina de fase aguda que tem papel central na hematopoiese, na defesa imunológica e na inflamação ⁵³. A IL-6 tem sido descrita como tendo uma potente ação anti-inflamatória, particularmente em lesões relacionadas à endotoxemia. Apresenta um efeito hepatoprotetor

quando empregada antes da indução da lesão hepática²⁸. Esses efeitos têm sido relacionados a uma provável inibição da produção do TNF- α .

Camargo e cols.²⁸ estudaram o papel da IL-6 em um modelo de isquemia e reperfusão com ratos e camundongos deficientes em IL-6 (IL-6 -/-), Estes autores verificaram um efeito protetor da IL-6 na lesão de isquemia e reperfusão, com níveis de transaminases e grau de necrose hepática menores para os animais que receberam IL-6 recombinante. Observaram também, nesses animais, um bloqueio da produção de TNF- α . Os autores concluíram que o efeito protetor da IL-6 está em suas propriedades anti-inflamatórias e no bloqueio do TNF- α . Nesse estudo os autores também avaliaram o bloqueio do TNF- α através da administração de anticorpos anti-TNF- α obtendo a redução da lesão pós isquemia e reperfusão.

Diversos trabalhos^{26,27,54} demonstram que TNF- α e IL-6 são as principais citocinas envolvidas no processo de regeneração hepática. Elas induzem o hepatócito a entrar no ciclo de divisão celular e a responder aos estímulos mitogênicos dos fatores de crescimento. Elas aumentam muito rapidamente após a hepatectomia e são componentes da via TNF α →TNFR1→NF κ β→IL-6→STAT3⁵⁴.

A via de transdução de sinal através do TNFR-1 é uma das inúmeras vias que envolvem citocinas, óxido nítrico e endotoxinas após ressecção hepática^{55, 56, 57, 58}.

Reconhece-se que NF κ β e IL-6 tem função protetora no fígado e estão aumentadas após a hepatectomia mas não está claro qual o seu real

papel na regeneração ou mesmo se elas têm algum efeito direto na proliferação celular ⁵⁴.

Recentemente observou-se efeito supressor de IL-6 sobre a SOCS3 (supressor da citocina sinalizadora 3). Esta última substância age como regulador negativo da regeneração hepática. Em camundongos geneticamente modificados que não produzem SOCS3 a regeneração hepática está acelerada ⁵⁹.

É possível que uma das ações de IL-6 na regeneração hepática seja através de supressão do SOCS3 indiretamente acelerando o processo de regeneração hepática.

As citocinas induzem o hepatócito a responder aos fatores de crescimento como o fator de crescimento de hepatócitos (HGF). O HGF é produzido por células não parenquimatosas do fígado e em outros tecidos, e pode agir nos hepatócitos de forma parácrina ou endócrina. Estudo recente demonstrou que a resposta mitogênica do hepatócito aos fatores de crescimento aumenta significativamente quando precedido de infusão de TNF- α ⁵⁴. O TNF- α portanto não funciona como um completo mitogênico, mas aumenta substancialmente a sensibilidade do hepatócito aos efeitos dos fatores de crescimento.

Além do HGF outros fatores de crescimento como o fator de crescimento epidérmico (EGF) e fator de crescimento transformador alfa (TGF- α) estão envolvidos na regeneração hepática ⁶⁰.

Akerman e cols. ⁴² estudaram ratos tratados com anticorpos anti-TNF- α e submetidos à hepatectomia a 70%. Embora não tenham conseguido

dosar o TNF- α sérico nem nos animais tratados e nem no grupo controle, observaram uma diminuição significativa no aumento de IL-6 nos ratos tratados com anti-TNF- α e uma inibição da incorporação da [H³] timidina no DNA, assim como na expressão do PCNA. Kimura e cols.⁶¹ estudaram um inibidor de TNF- α (E3330) em ratos submetidos à hepatectomia a 70%, e também encontraram uma inibição do índice de BrdU (incorporação de Bromodeoxiuridina) mostrando uma diminuição da regeneração hepática. Estes dados sugerem que embora o TNF- α tenha sido referido como mediador de lesão hepática, esta citocina possa ter papel importante na resposta regenerativa do fígado.

Por outro lado outros estudos como o de Hou e cols.⁴⁰ e Tsutsumi e cols.²⁷ que empregaram outra droga com efeito inibidor do TNF- α e IL-1 β : o FR167653 em ratos submetidos à hepatectomia a 70 e 90%, respectivamente, encontraram uma melhora na regeneração hepática documentada através do PCNA, após efetiva inibição do TNF- α e conseqüentemente de IL-6.

Reconhece-se paralelamente que o TNF- α é uma citocina reguladora da fase inicial da regeneração hepática, e que estimula a elevação de IL-6. Como, no entanto, explicar que diferentes maneiras de inibir o TNF- α levem a efeitos contraditórios na regeneração hepática? Hou e cols.⁴⁰ discutem que a droga usada FR167653 foi capaz de inibir a expressão gênica de IL-1 β , mas não foi capaz de reduzir a expressão do TNF- α mRNA. Portanto os animais tratados com essa droga podem ter tido capacidade de produzir TNF- α suficiente para iniciar a regeneração hepática, e a ação protetora da droga tenha ocorrido no bloqueio da expressão do IL-1 β , um conhecido

inibidor da síntese de DNA do hepatócito. Já Tsutsumi e cols.²⁷ argumentam que o bloqueio do TNF- α levou a uma supressão da IL-6, citocina associada a efeitos protetores da injúria hepática, mas que em hepatectomia a 90%, tem seus níveis persistentemente elevados, ao contrário do que ocorre na hepatectomia a 70%. Isso poderia estar associado a uma menor atividade proliferativa.

Assim TNF- α tanto pode exibir uma ação favorecedora como danosa à regeneração hepática.

A pentoxifilina é um derivado da metilxantina (1-[5-oxohexil]-3,7-dimetilxantina) e um inibidor não específico da fosfodiesterase, e que tem sido relatada como potente inibidor de síntese de TNF- α por monócitos e macrófagos³⁴. A droga reduz a lesão pulmonar provocada por endotoxina e melhora a evolução do choque séptico diminuindo a produção de TNF- α por macrófagos³⁵. Ela também atenua a lesão pulmonar do choque hemorrágico^{36, 37}. Em estudo realizado em nosso laboratório demonstrou-se que o uso da droga em modelo de pancreatite experimental reduziu os níveis séricos de IL-6 e TNF- α , a resposta inflamatória sistêmica e local, as complicações infecciosas e diminuiu a mortalidade³⁸. Foi, também, demonstrado que a pentoxifilina diminui a ativação neutrofílica e subseqüentemente a inflamação em pacientes submetidos à cirurgia cardíaca^{22, 62}. Deree e cols.⁶³ demonstraram que a droga atenua a ativação neutrofílica e a síntese de TNF- α observada em transfusão alogênica de sangue e pode ter potencial benefício terapêutico nas lesões orgânicas relacionadas à transfusão.

A pentoxifilina apresenta também ação inibidora sobre a expressão de RNAm de IL-1 β no fígado ⁶⁴. Esta droga, portanto, poderia ter ação importante na regeneração hepática.

No trabalho experimental de Kimura e cols.⁶¹, já referido anteriormente, a utilização de droga inibidora da produção do TNF- α , o E3330, em ratos submetidos à hepatectomia a 70%, observou-se inibição da incorporação da bromodeoxiuridina, ou seja uma diminuição da regeneração hepática. Nesse trabalho a droga foi incapaz de bloquear o TNF- α dosado no sangue, mas diminuiu o TNF- α dosado no tecido hepático. Estes dados são opostos aos do presente estudo, onde a inibição proporcionada pela pentoxifilina se deu no TNF- α e IL-6, dosados no soro (tabelas 1 e 2, Figuras 8, 9, 12 e 13) e não no TNF- α e IL-6 dosados no tecido hepático (tabelas 1 e 2, Figuras 10, 11, 14 e 15). Ao mesmo tempo o resultado na regeneração hepática também foi contrário ao de Kimura e cols.⁶¹, pois o emprego da pentoxifilina foi efetivo na melhora do índice mitótico e do PCNA (tabela 3, Figuras 16 e 17).

A interpretação desses dados nos levou a especular que a ação da pentoxifilina tenha um alcance sistêmico, agindo no TNF- α liberado fora do fígado, possivelmente por ação de endotoxinas provenientes de bactérias intestinais, e de ação provavelmente lesiva à regeneração hepática. Por outro lado a droga tem menor ação no fígado, sendo incapaz de bloquear a produção local das citocinas que iniciam a resposta inflamatória, e que estimulam a regeneração hepática (Figura 22).

TNF- α e Il-6 nos animais que receberam a droga não diferiram significativamente dos níveis teciduais dos animais que não a receberam.

É possível que os níveis séricos elevados de citocinas pró-inflamatórias possam influenciar a regeneração hepática de modo indireto, estimulando algum fator inibidor da regeneração.

Em trabalho realizado em nosso laboratório foi comprovado que, na pancreatite aguda experimental, existe uma elevação concomitante dos níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, ambas reduzidas pela ação da pentoxifilina³⁸.

Sendo a TGF β -1 uma citocina anti-inflamatória e inibidora da regeneração hepática²³ é possível que seus níveis se modifiquem, paralelamente aos das citocinas pro-inflamatórias.

Deste modo a elevação das citocinas pró-inflamatórias poderia reduzir a regeneração hepática pela elevação concomitante da TGF β -1, e a inibição desta pela redução dos níveis de citocinas pró-inflamatórias estimular a regeneração de modo indireto (figura 22).

Há, no entanto necessidade de novos estudos para se avaliar o mecanismo da ação benéfica da pentoxifilina na regeneração hepática.

No pós-operatório de ressecções hepáticas ou transplante de fígado observamos comumente a elevação de AST e ALT. Ela é usada frequentemente como marcador da lesão hepática após o procedimento e pode orientar inclusive a indicação de um re-transplante de fígado. Neste trabalho as transaminases foram estudadas para mensurar a lesão hepática no fígado remanescente. Pudemos observar uma tendência de elevação de

AST e ALT em 2 horas (não significativa $p>0,05$) após a hepatectomia em relação ao controle, com pico em 6 horas (elevação significativa $p<0,05$) após o procedimento, e retorno aos níveis normais em 48 horas (Figuras 2-7). A administração de pentoxifilina não levou à redução dos níveis de transaminases em comparação com o grupo salina. Kimura e cols.⁶¹ também não encontraram diferença nos níveis de transaminases com o uso de outra droga: E3330. Hou e cols.⁴⁰ utilizando outra droga inibidora do TNF- α encontraram diferença nos níveis de transaminases em relação ao grupo controle, mas apenas de 24 a 72 horas após o procedimento, não encontrando diferença em 12 horas após a operação. Tsutsumi e cols.²⁷ estudando a mesma droga em ratos submetidos à hepatectomia a 90% encontraram uma diminuição dos níveis de AST, ALT e DHL em 2, 6 e 12 horas após o procedimento, nos ratos que receberam a droga.

Estes dados reforçam o fato de que níveis excessivos de TNF- α possam ter efeito lesivo sobre os hepatócitos.

Pode-se especular, portanto que o bloqueio das citocinas pró-inflamatórias circulantes é benéfico não só ao reduzir a lesão hepática como ao favorecer a regeneração. Por outro lado as citocinas produzidas localmente no tecido hepático são fundamentais para a regeneração hepática e sua inibição pode prejudicá-la ou mesmo bloqueá-la.

Os resultados do presente trabalho demonstram que a administração de pentoxifilina após hepatectomia a 70% em ratos, reduz os níveis séricos de TNF- α e IL-6 sem, contudo alterar as citocinas no tecido hepático, portanto mantendo seu efeito benéfico na regeneração hepática justificando

estudos clínicos. Estes estudos clínicos ainda são favorecidos pelo fato da pentoxifilina já ser droga há longo tempo utilizada para tratamento de doenças vasculares, de grande segurança e com poucos efeitos colaterais.

6 CONCLUSÃO

Nas condições do presente trabalho pode-se concluir que a administração de pentoxifilina melhorou a regeneração do fígado após hepatectomia a 70% por mecanismo relacionado à redução de citocinas (TNF- α e IL-6) séricas e manutenção das citocinas (TNF- α e IL-6) no tecido hepático.

7 ANEXOS

ANEXO 1: Resultados dos mediadores inflamatórios e das transaminases nos grupos controle e laparotomia.

TNF- α e IL-6 fígado: pg/mg proteína

TNF- α e IL-6 soro: pg/ml

AST e ALT: U/L

GRUPO CONTROLE

Ratos	TNF-α fígado	TNF-α soro	IL-6 fígado	IL-6 soro	AST	ALT
Rato 1	14,87	0	25,94	0	139	58
Rato 2	19,55	0	23,71	0	127	42
Rato 3	17,27	0	23,82	0	98	81
Rato 4	14,49	0	28,98	0	145	92
Rato 5	12,89	0	24,46	0	121	37
Rato 6	13,72	0	23,70	0	119	59
N=6						
Média	15,47	0	25,10	0	125	62
DP=	2,49		2,08		17	21

LAPAROTOMIA
2 horas

Ratos	TNF- α fígado	TNF soro	IL-6 fígado	IL-6 soro	AST	ALT
Rato 1	15,12	0	50,56	0	120	152
Rato 2	15,20	0	46,92	0	115	147
Rato 3	14,94	0	35,57	0	130	142
Rato 4	8,87	0	42,67	0	154	140
Rato 5	10,89	0	35,72	0	146	148
Rato 6	112,28	0	32,97	0	110	106
N=6						
X=	12,88	0	40,74	0	129	139
DP=	2,65		7,08		18	17

LAPAROTOMIA
6 horas

Ratos	TNF- α fígado	TNF soro	IL-6 fígado	IL-6 soro	AST	ALT
Rato 1	16,20	0	49,19	0	202	220
Rato 2	14,32	0	25,67	0	215	235
Rato 3	12,21	0	38,06	0	207	216
Rato 4	10,40	0	48,25	0	194	156
Rato 5	14,98	0	47,08	0	250	244
Rato 6	12,13	0	39,46	0	232	316
N=6						
X=	13,37	0	41,29	0	217	231
DP=	2,15		8,97		21	52

ANEXO 2: Resultados dos mediadores inflamatórios e das transaminases nos grupos hepatectomia (salina e pentoxifilina) 2 e 6 horas.

TNF- α e IL-6 fígado: pg/mg proteína

TNF- α e IL-6 soro: pg/ml

AST e ALT: U/L

**GRUPO HEPATECTOMIA
SALINA 2 horas**

Ratos	TNF-α fígado	TNF-α soro	IL-6 fígado	IL-6 soro	AST	ALT
Rato 1	26,76	0	48,64	61	240	113
Rato 2	32,05	31	56,36	0	185	107
Rato 3	33,75	30	45,21	95	152	73
Rato 4	32,74	0	70,98	74	189	52
Rato 5	34,33	33	39,77	37	188	146
Rato 6	44,53	134	39,36	104	184	80
Rato 7	19,19	0	39,39	74	165	113
Rato 8	23,56	20	38,54	22	229	145
Rato 9	25,59	80	40,94	60	273	87
Rato 10	20,18	103	45,96	65	261	95
N=10						
Média	29,67	43	46,52	59	207	101
DP=	7,71	47	10,24	32	41	30

**GRUPO HEPATECTOMIA
SALINA 6 horas**

Ratos	TNF-α fígado	TNF-α soro	IL-6 fígado	IL-6 soro	AST	ALT
Rato 1	35,24	32	35,95	84	480	352
Rato 2	26,88	18	41,40	190	239	210
Rato 3	31,19	15	40,78	58	450	350
Rato 4	41,09	303	44,03	55	470	345
Rato 5	35,40	109	37,31	102	492	310
Rato 6	51,06	17	30,26	96	325	127
Rato 7	29,50	20	28,18	75	355	135
Rato 8	31,57	10	36,16	189	474	231
Rato 9	15,30	53	34,97	16	286	308
Rato 10	26,25	0	35,49	107	300	314
N=10						
Média	32,35	58	36,45	97	387	268
DP=	9,50	92	4,85	56	96	87

**GRUPO HEPATECTOMIA
PENTOXIFILINA 2 horas**

Ratos	TNF-α fígado	TNF-α soro	IL-6 fígado	IL-6 soro	AST	ALT
Rato 1	44,79	0	61,52	0	288	86
Rato 2	22,79	32	57,82	10	291	98
Rato 3	17,00	0	53,62	0	235	143
Rato 4	40,87	0	43,50	0	198	70
Rato 5	40,82	9	49,81	0	231	114
Rato 6	20,73	0	54,52	0	229	96
Rato 7	19,13	0	31,42	0	266	222
Rato 8	28,53	0	34,41	21	241	83
Rato 9	26,76	17	39,18	12	217	64
Rato 10	25,87	20	46,54	52	200	102
N=10						
Média=	28,73	8	47,23	10	240	108
DP=	9,96	11	10,06	17	33	46

**GRUPO HEPATECTOMIA
PENTOXIFILINA 6 horas**

Ratos	TNF-α fígado	TNF-α soro	IL-6 fígado	IL-6 soro	AST	ALT
Rato 1	44,78	34	29,23	0	553	342
Rato 2	36,80	30	42,07	100	418	215
Rato 3	63,92	0	41,31	23	302	111
Rato 4	17,89	0	37,20	22	423	267
Rato 5	16,93	49	29,20	134	425	201
Rato 6	19,83	15	45,79	0	268	138
Rato 7	30,69	15	42,44	30	462	169
Rato 8	9,34	10	27,53	27	426	430
Rato9	11,81	39	36,68	0	316	304
Rato10	15,76	51	35,96	49	310	322
N=10						
Média=	26,78	24	36,79	39	390	250
DP=	17,30	19	6,35	45	89	101

ANEXO 3: Resultados dos parâmetros utilizados para análise da regeneração hepática e das transaminases nos grupos salina e pentoxifilina 48 horas após hepatectomia.

PCNA:

Índice Mitótico:

AST e ALT: U/L

**GRUPO HEPATECTOMIA
SALINA 48 horas**

Ratos	PCNA	Índice mitótico	AST	ALT
Rato 1	4,2	1,0	184	77
Rato 2	9,1	2,5	187	66
Rato 3	8,7	2,0	225	80
Rato 4	4,7	1,5	186	82
Rato 5	5,2	1,7	202	60
Rato 6	4,5	1,2	195	62
N=6				
Média	6,1	1,7	197	71
DP=	2,2	0,5	16	10

**GRUPO HEPATECTOMIA
PENTOXIFILINA 48 horas**

Ratos	PCNA	Índice mitótico	AST	ALT
Rato 1	8,3	1,7	176	58
Rato 2	8,9	2,2	212	68
Rato 3	18,0	5,1	225	50
Rato 4	15,0	3,2	180	62
Rato 5	11,8	2,5	200	70
Rato 6	10,5	2,4	199	62
N=6				
Média	12,1	2,9	199	62
DP=	3,8	1,2	19	7

8 REFERÊNCIAS

1. Hardy KJ. Liver surgery: the past 2000 years. *Aust N Z J Surg.* 1990;60:811-7.
2. Starzl TE, Marchioro TL, Vonkaulla KN, Hermann G, Brittain RS, Waddell WR. Homotransplantation of the Liver in Humans. *Surg Gynecol Obstet.* 1963;117:659-76.
3. Lortat-Jacob JL, Robert HG, Henry C. [Excision of the right lobe of the liver for a malignant secondary tumor.]. *Arch Mal Appar Dig Mal Nutr.* 1952;41:662-7.
4. Couinaud C. Le Foie: Études Anatomiques et Chirurgicales. New York: Masson Publishers, 1957.
5. UNOS. OPTN – Organ Procurement and transplantation network [on-line]. Data. Available from: <http://www.optn.org/latestData/rptData.asp>., 2007.
6. ELTR. European Liver Transplant Registry [on-line]. Available from: <http://www.eltr.org/publi/>. . 2007.
7. Ito T, Kiuchi T, Yamamoto H, Oike F, Ogura Y, Fujimoto Y, Hirohashi K, Tanaka AK. Changes in portal venous pressure in the early phase after living donor liver transplantation: pathogenesis and clinical implications. *Transplantation.* 2003;75:1313-7.
8. Rela M, Vougas V, Muiesan P, Vilca-Melendez H, Smyrniotis V, Gibbs P, Karani J, Williams R, Heaton N. Split liver transplantation: King's College Hospital experience. *Ann Surg.* 1998;227:282-8.
9. Smyrniotis V, Kostopanagiotou G, Kondi A, Gamaletsos E, Theodoraki K, Kehagias D, Mystakidou K, Contis J. Hemodynamic interaction between portal vein and hepatic artery flow in small-for-size split liver transplantation. *Transpl Int.* 2002;15:355-60.
10. Scheele J A-HA. Surgical Treatment of Liver Metastases. In: Blumgart LH FY, ed. *Surgery of the Liver and Biliary Tract.* Third ed. Londres, 2000:1475-1502.

11. Fong Y, Fortner J, Sun RL, Brennan MF, Blumgart LH. Clinical score for predicting recurrence after hepatic resection for metastatic colorectal cancer: analysis of 1001 consecutive cases. *Ann Surg.* 1999;230:309-18; discussion 318-21.
12. Adam R, Chiche L, Aloia T, Elias D, Salmon R, Rivoire M, Jaeck D, Saric J, Le Treut YP, Belghiti J, Manton G, Mentha G. Hepatic resection for noncolorectal nonendocrine liver metastases: analysis of 1,452 patients and development of a prognostic model. *Ann Surg.* 2006;244:524-35.
13. Higgins G, Anderson R. Experimental pathology of the liver: Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch Pathol.* 1931;12:186-202.
14. Milne L. The histology of liver tissue regeneration. *J Pathol Bacteriol.* 1909;3:127-160.
15. Wang HH, Lautt WW. Evidence of nitric oxide, a flow-dependent factor, being a trigger of liver regeneration in rats. *Can J Physiol Pharmacol.* 1998;76:1072-9.
16. Glinos AD, Gey GO. Humoral factors involved in the induction of liver regeneration in the rat. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1952;80:421-5.
17. Eguchi S, Yanaga K, Sugiyama N, Okudaira S, Furui J, Kanematsu T. Relationship between portal venous flow and liver regeneration in patients after living donor right-lobe liver transplantation. *Liver Transpl.* 2003;9:547-51.
18. Niiya T, Murakami M, Aoki T, Murai N, Shimizu Y, Kusano M. Immediate increase of portal pressure, reflecting sinusoidal shear stress, induced liver regeneration after partial hepatectomy. *J Hepatobiliary Pancreat Surg.* 1999;6:275-80.
19. Troisi R, Cammu G, Militerno G, De Baerdemaeker L, Decruyenaere J, Hoste E, Smeets P, Colle I, Van Vlierberghe H, Petrovic M, Voet D, Mortier E, Hesse UJ, de Hemptinne B. Modulation of portal graft inflow: a necessity in adult living-donor liver transplantation? *Ann Surg.* 2003;237:429-36.
20. Cescon M, Sugawara Y, Takayama T, Seyama Y, Sano K, Imamura H, Makuuchi M. Role of splenectomy in living-donor liver transplantation for adults. *Hepatogastroenterology.* 2002;49:721-3.
21. Murata K, Shiraki K, Sugimoto K, Takase K, Nakano T, Furusaka A, Tameda Y. Splenectomy enhances liver regeneration through tumor necrosis factor (TNF)-alpha following dimethylnitrosamine-induced cirrhotic rat model. *Hepatogastroenterology.* 2001;48:1022-7.

22. Suzuki S, Nakamura S, Serizawa A, Sakaguchi T, Konno H, Muro H, Kosugi I, Baba S. Role of Kupffer cells and the spleen in modulation of endotoxin-induced liver injury after partial hepatectomy. *Hepatology*. 1996;24:219-25.
23. Ueda S, Yamanoi A, Hishikawa Y, Dhar DK, Tachibana M, Nagasue N. Transforming growth factor-beta1 released from the spleen exerts a growth inhibitory effect on liver regeneration in rats. *Lab Invest*. 2003;83:1595-603.
24. Miyazawa Y, Tsutsui H, Mizuhara H, Fujiwara H, Kaneda K. Involvement of intrasinusoidal hemostasis in the development of concanavalin A-induced hepatic injury in mice. *Hepatology*. 1998;27:497-506.
25. Tracey KJ, Cerami A. Tumor necrosis factor: a pleiotropic cytokine and therapeutic target. *Annu Rev Med*. 1994;45:491-503.
26. Yamada Y, Kirillova I, Peschon JJ, Fausto N. Initiation of liver growth by tumor necrosis factor: deficient liver regeneration in mice lacking type I tumor necrosis factor receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94:1441-6.
27. Tsutsumi R, Kamohara Y, Eguchi S, Azuma T, Fujioka H, Okudaira S, Yanaga K, Kanematsu T. Selective suppression of initial cytokine response facilitates liver regeneration after extensive hepatectomy in rats. *Hepatogastroenterology*. 2004;51:701-4.
28. Camargo CA, Jr., Madden JF, Gao W, Selvan RS, Clavien PA. Interleukin-6 protects liver against warm ischemia/reperfusion injury and promotes hepatocyte proliferation in the rodent. *Hepatology*. 1997;26:1513-20.
29. Streetz KL, Luedde T, Manns MP, Trautwein C. Interleukin 6 and liver regeneration. *Gut*. 2000;47:309-12.
30. Coelho MC, Tannuri U, Tannuri AC, Mello ES, dos Santos NA. Expression of interleukin 6 and apoptosis-related genes in suckling and weaning rat models of hepatectomy and liver regeneration. *J Pediatr Surg*. 2007;42:613-9.
31. Assy N, Minuk GY. Liver regeneration: methods for monitoring and their applications. *J Hepatol*. 1997;26:945-52.
32. Ward A, Clissold SP. Pentoxifylline. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and its therapeutic efficacy. *Drugs*. 1987;34:50-97.
33. Schroer RH. Antithrombotic potential of pentoxifylline. A hemorheologically active drug. *Angiology*. 1985;36:387-98.

34. Bernard C, Barnier P, Merval R, Esposito B, Tedgui A. Pentoxifylline selectivity inhibits tumor necrosis factor synthesis in the arterial wall. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1995;25 Suppl 2:S30-3.
35. Doherty GM, Jensen JC, Alexander HR, Buresh CM, Norton JA. Pentoxifylline suppression of tumor necrosis factor gene transcription. *Surgery*. 1991;110:192-8.
36. Yada-Langui MM, Anjos-Valotta EA, Sannomiya P, Rocha e Silva M, Coimbra R. Resuscitation affects microcirculatory polymorphonuclear leukocyte behavior after hemorrhagic shock: role of hypertonic saline and pentoxifylline. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2004;229:684-93.
37. Yada-Langui MM, Coimbra R, Lancellotti C, Mimica I, Garcia C, Correia N, Jr., Rocha e Silva M. Hypertonic saline and pentoxifylline prevent lung injury and bacterial translocation after hemorrhagic shock. *Shock*. 2000;14:594-8.
38. Matheus A, Coelho A, Morioka C, Sampietre S, Machado M. Effect of inhibition of TNF- α in experimental acute pancreatitis: a study of systemic inflammatory process, pancreatic infection, and mortality rate. *Journal of gastrointestinal surgery*. 2005;9:547-8.
39. Moser M, Zhang M, Gong Y, Johnson J, Kneteman N, Minuk GY. Effect of preoperative interventions on outcome following liver resection in a rat model of cirrhosis. *J Hepatol*. 2000;32:287-92.
40. Hou Z, Yanaga K, Kamohara Y, Eguchi S, Tsutsumi R, Furui J, Kanematsu T. A new suppressive agent against interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha enhances liver regeneration after partial hepatectomy in rats. *Hepatol Res*. 2003;26:40-46.
41. Rudiger HA, Clavien PA. Tumor necrosis factor alpha, but not Fas, mediates hepatocellular apoptosis in the murine ischemic liver. *Gastroenterology*. 2002;122:202-10.
42. Akerman P, Cote P, Yang SQ, McClain C, Nelson S, Bagby GJ, Diehl AM. Antibodies to tumor necrosis factor-alpha inhibit liver regeneration after partial hepatectomy. *Am J Physiol*. 1992;263:G579-85.
43. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;193:265-75.
44. Altman D. Practical statistics for medical research, 1991.
45. Numro B. Statistical methods for health care research, 2001.
46. Fausto N. Liver regeneration. *J Hepatol*. 2000;32:19-31.

47. Wibber E, Yamada Y, Bruix J, Pierce R, Fausto N. Initiation of liver regeneration by tumor necrosis factor. In: Fleig W, ed. Normal and Malignant liver cell growth Dachecht: Kluwer, 1999:56-61.
48. Michalopoulos GK, DeFrances MC. Liver regeneration. *Science*. 1997;276:60-6.
49. Bucher M, Farne S. Liver regeneration following partial hepatectomy genes and metabolism. In: Strain A, Diehl A, eds. Liver Growth and repair London: Chapman C & Hall, 1998:3-27.
50. Taub R. Liver regeneration: from myth to mechanism. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2004;5:836-47.
51. Assy N, Gong Y, Zhang M, Pettigrew NM, Pashniak D, Minuk GY. Use of proliferating cell nuclear antigen as a marker of liver regeneration after partial hepatectomy in rats. *J Lab Clin Med*. 1998;131:251-6.
52. Teoh N, Field J, Farrell G. Interleukin-6 is a key mediator of the hepatoprotective and pro-proliferative effects of ischaemic preconditioning in mice. *J Hepatol*. 2006;45:20-7.
53. Hirano T, Akira S, Taga T, Kishimoto T. Biological and clinical aspects of interleukin 6. *Immunol Today*. 1990;11:443-9.
54. Fausto N, Riehle KJ. Mechanisms of liver regeneration and their clinical implications. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*. 2005;12:181-9.
55. Cornell RP. Restriction of gut-derived endotoxin impairs DNA synthesis for liver regeneration. *Am J Physiol*. 1985;249:R563-9.
56. Cornell RP, Liljequist BL, Bartizal KF. Depressed liver regeneration after partial hepatectomy of germ-free, athymic and lipopolysaccharide-resistant mice. *Hepatology*. 1990;11:916-22.
57. Rai RM, Lee FY, Rosen A, Yang SQ, Lin HZ, Koteish A, Liew FY, Zaragoza C, Lowenstein C, Diehl AM. Impaired liver regeneration in inducible nitric oxide synthasedeficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:13829-34.
58. Diehl AM. Cytokine regulation of liver injury and repair. *Immunol Rev*. 2000;174:160-71.
59. Riehle KJ CB, Campbeell J, Fausto N. Regulation of liver regeneration by suppressors of cytokine signaling-3. *J Am Coll Surg*. 2006;203:S12.
60. Webber EM, Godowski PJ, Fausto N. In vivo response of hepatocytes to growth factors requires an initial priming stimulus. *Hepatology*. 1994;19:489-97.

61. Kimura T, Sakaida I, Terai S, Matsumura Y, Uchida K, Okita K. Inhibition of tumor necrosis factor- α production retards liver regeneration after partial hepatectomy in rats. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997;231:557-60.
62. Coimbra R, Melbostad H, Hoyt DB. Effects of phosphodiesterase inhibition on the inflammatory response after shock: role of pentoxifylline. *J Trauma*. 2004;56:442-9.
63. Deree J, Lall R, Melbostad H, Loomis W, Hoyt DB, Coimbra R. Pentoxifylline attenuates stored blood-induced inflammation: A new perspective on an old problem. *Surgery*. 2006;140:186-91.
64. Gutierrez-Reyes G, Lopez-Ortal P, Sixtos S, Cruz S, Ramirez-Iglesias MT, Gutierrez-Ruiz MC, Sanchez-Avila F, Roldan E, Vargas-Vorackova F, Kershenobich D. Effect of pentoxifylline on levels of pro-inflammatory cytokines during chronic hepatitis C. *Scand J Immunol*. 2006;63:461-7.
65. Dahm F, Georgiev P, Clavien PA. Small-for-size syndrome after partial liver transplantation: definition, mechanisms of disease and clinical implications. *Am J Transplant*. 2005;5:2605-10.
66. Helling TS. Liver failure following partial hepatectomy. *HPB (Oxford)*. 2006;8:165-74.