

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

**EDIMAR LEANDRO TODERKE**

**EFEITO DO SIROLIMUS NA REGENERAÇÃO HEPÁTICA  
INDUZIDA POR HEPATECTOMIA NO RATO**

**CURITIBA**

**2009**

**EDIMAR LEANDRO TODERKE**

**EFEITO DO SIROLIMUS NA REGENERAÇÃO HEPÁTICA  
INDUZIDA POR HEPATECTOMIA NO RATO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Clínica Cirúrgica, Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Eduardo Fouto Matias

Coordenador: Prof. Dr. Antônio Carlos L. Campos

**CURITIBA**

**2009**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SISTEMA DE BIBLIOTECAS / BIBLIOTECA CENTRAL  
COORDENAÇÃO DE PROCESSOS TÉCNICOS

Toderke, Edimar Leandro

Efeito do sirolimus na regeneração hepática induzida por hepatectomia no rato / Edimar Leandro Toderke. – Curitiba, 2009.

80f. : il. algumas color., grafs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Eduardo Fouto Matias

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica.

Inclui referências e apêndices

1. Fígado - Regeneração. 2. Fígado - Transplante. 3. Fígado – Cirurgia. 4. Sirolimus. I. Matias, Jorge Eduardo Fouto. II. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica. III. Título.

CDD 616.362

Aos meus pais, Ditmar e Bernardete,  
Por todo o amor e carinho dedicados a minha formação.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao PROF. DR. JORGE EDUARDO FOUTO MATIAS, por acreditar neste projeto, por orientar-me em todas as fases de sua realização, pelo relacionamento amigável e respeitoso e, principalmente, pela enorme contribuição para minha formação acadêmica e profissional.

Ao PROF. DR., ANTÔNIO CARLOS LIGOCKI CAMPOS pela seriedade e grande dedicação dispendida na coordenação do Programa de Pós-graduação em Cirurgia da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

À secretária do Departamento de Pós-graduação em Cirurgia da UFPR, REGINA SASS, pelas orientações e ajuda quanto aos compromissos e normas de funcionamento do Programa.

À patologista DR<sup>a</sup>. DANIELE SAKAMOTO e ao Serviço de Anatomia Patológica do Hospital de Clínicas da UFPR, pela valiosa contribuição para as análises histológicas.

Aos amigos e cirurgiões do aparelho digestivo GIORGIO ALFREDO PEDROSO BARETA E OZIMO PEREIRA GAMA FILHO por colaborarem na pesquisa e por dividirem sua experiência científica relacionada ao tema do presente estudo. À médica IVANA ROSEIRA GOMES pela revisão gramatical do texto.

À minha noiva CLARISSA, pela paciência e compreensão nos períodos de dedicação a realização do projeto e pela grande ajuda na digitação de parte do texto da dissertação e revisão gramatical.

À minha família como formadora de meu caráter e personalidade. Os meus exemplos de honestidade, perseverança, dedicação e profissionalismo são inspirados nos meus pais, DITMAR e BERNARDETE. Devo a eles toda a minha formação pessoal e profissional. Ao meu irmão ALEXANDRE pelo apoio e carinho.

“O conhecimento amplia a vida.  
Conhecer é viver uma realidade que a ignorância impede desfrutar”

Carlos Bernardo González Pecotche

## RESUMO

A capacidade regenerativa do fígado tem atraído diversas pesquisas na tentativa de elucidar este complexo sistema. A regeneração hepática ocorre após insultos ao fígado de diversas etiologias como, por exemplo, a hepatectomia. O sirolimus, que foi recentemente introduzido na prática clínica, pode apresentar efeitos na regeneração hepática. Este estudo objetivou avaliar a influência do sirolimus no processo de regeneração hepática de ratos adultos submetidos à modelo experimental de hepatectomia a 70% com ressecção dos lobos hepáticos mediano e lateral esquerdo. Quarenta ratos machos foram aleatoriamente divididos em 4 grupos: controle 24 horas (**GC<sub>24h</sub>**), estudo 24 horas (**GE<sub>24h</sub>**), controle sete dias (**GC<sub>7d</sub>**) e estudo sete dias (**GE<sub>7d</sub>**). Nos grupos de estudo (**GE<sub>24h</sub>** e **GE<sub>7d</sub>**) foram administrado sirolimus na dose de 1mg/kg/dia e nos grupos controle (**GC<sub>24h</sub>** e **GC<sub>7d</sub>**) 1ml de soro fisiológico por gavagem. As soluções foram administradas três dias precedentes a hepatectomia e até a morte do rato. A morte do rato para retirada do fígado regenerado foi realizada em 24 horas após a hepatectomia (**GC<sub>24h</sub>** e **GE<sub>24h</sub>**) e sete dias após (**GC<sub>7d</sub>** e **GE<sub>7d</sub>**). A análise da regeneração hepática foi mensurada pela aferição do percentual de regeneração pela fórmula de KWON, número de figuras de mitose pela técnica de hemotoxilina - eosina e pela percentagem de positividade pelos marcadores imunohistoquímicos PCNA e Ki-67. Foi adotado nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ) no estudo estatístico. Houve perda ponderal significativa nos grupos comparando-se o peso inicial com o peso no dia da morte. Foi demonstrada variação estatisticamente significativa quando comparado os grupos 24h com os sete dias (**GE<sub>24h</sub> X GE<sub>7d</sub>**) (**GC<sub>24h</sub> X GC<sub>7d</sub>**) pelos métodos de análise. Quando comparado os grupos de estudo e controle no mesmo período (**GE<sub>24h</sub> X GC<sub>24h</sub>**) (**GE<sub>7d</sub> X GC<sub>7d</sub>**) não foi demonstrada variação estatisticamente significativa pelos métodos de análise, exceto pelo Ki-67 no qual foi verificado aumento do número de hepatócitos fora do período  $G_0$  no grupo de estudo de sete dias (**GE<sub>7d</sub>**) quando comparado com o grupo controle (**GC<sub>7d</sub>**) ( $p=0,04$ ). Este estudo não demonstrou influência negativa do sirolimus na regeneração hepática e demonstrou efeito parcial positivo pela imunohistoquímica utilizando Ki-67.

Palavras-chave: Regeneração hepática. Sirolimus. Hepatectomia. Transplante hepático.

## ABSTRACT

The liver's regenerating properties have drawn the attention of several researchers in the attempt of elucidating this complex system. The liver regeneration occurs after several injuries of different etiologies, like hepatectomy. Sirolimus, which was recently inserted in clinical practice, is able to present effect in the liver regeneration. This study aimed to evaluate the influence of sirolimus in the process of liver regeneration of adult rats undergoing an experimental model of hepatectomy to 70% with resection on the medium and left hepatic lobes. Forty male rats were randomly divided in four groups (**GC<sub>24h</sub>**, **GE<sub>24h</sub>**, **GC<sub>7d</sub>** and **GE<sub>7d</sub>**). In the study groups (**GE<sub>24h</sub>** and **GE<sub>7d</sub>**) sirolimus was administered in a dose of 1mg/kg/day and in the control groups (**GC<sub>24h</sub>** and **GC<sub>7d</sub>**) 1ml of saline solution by gavage. The solutions were administered three days prior to the hepatectomy and until the rats's death. The death of the rats took place for liver removal 24 hour after hepatectomy for groups (**GC<sub>24h</sub>** e **GE<sub>24h</sub>**) and seven days for the groups (**GC<sub>7d</sub>** e **GE<sub>7d</sub>**). Liver regeneration analysis was measured by assessing the percentage of increase liver weight (Kwon's formula); number of mitosis figures in hematoxylin-eosin technique and percentage of positivity of the immune histochemical markers PCNA and Ki-67. A significance level of 5% ( $p < 0.05$ ) was adopted in the statistical analyses. There was significant height loss in the groups comparing the initial weight with the weight in the day of death. Significant statistical variation was shown when comparing groups at 24h and seven days (**GE<sub>24h</sub> X GE<sub>7d</sub>**) (**GC<sub>24h</sub> X GC<sub>7d</sub>**) through the methods of analysis. When compared to the groups in the same period (**GE<sub>24h</sub> X GC<sub>24h</sub>**) (**GE<sub>7d</sub> X GC<sub>7d</sub>**) a statistically significant variation was not present according to the methods of analysis, except for the Ki67 in which was observed an increase in the number of hepatocytes out of the G<sub>0</sub> period in the seven day study group (**GE<sub>7d</sub>**) when compared to the control group (**GC<sub>7d</sub>**) ( $p=0.04$ ). This experiment showed no negative interference of sirolimus on liver regeneration and a partial positive effect as showed by Ki-67 stain

Keywords: Liver Regeneration. Sirolimus. Liver Transplantation.



## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – REPRESENTAÇÃO DIAGRAMÁTICA DO MODELO CONCEITUAL DA ESTRUTURA INTERNA DO FÍGADO .....	18
FIGURA 2 – ILUSTRAÇÃO DO EFEITO REGULATÓRIO DO SISTEMA IMUNE SOBRE A REGENERAÇÃO HEPÁTICA .....	24
FIGURA 3 – DESENHO DEMONSTRANDO AS VIAS DE INTERAÇÕES DAS CITOCINAS E FATORES NA REGENERAÇÃO HEPÁTICA.....	26
FIGURA 4 – DISTRIBUIÇÃO PERCENTUAL DO PESO DOS LOBOS DO FÍGADO DO RATO .....	33
FIGURA 5 – DESENHO ESQUEMÁTICO DE RESSECÇÃO DE 70% DA MASSA HEPÁTICA NO RATO .....	33
FIGURA 6 – FOTOS SEQÜENCIAIS DO FÍGADO DO RATO APÓS HEPATECTOMIA 70% NOS DIAS 0, 1, 3 E 7. ....	34
FIGURA 7 – ESTRUTURA MOLECULAR DO SIROLIMUS.....	36
FIGURA 8 – MECANISMO MOLECULAR DO SIROLIMUS .....	37
FIGURA 9 – AÇÃO DO SIROLIMUS (RAPAMICINA) SOBRE A MTOR .....	38
FIGURA 10 – MATERIAL UTILIZADO PARA ANESTESIA.....	41
FIGURA 11 – BALANÇA UTILIZADA PARA PESAGEM.....	41
FIGURA 12 – SONDA PLÁSTICA MALEÁVEL PARA GAVAGEM, GAVAGEM NO RATO. ....	42
FIGURA 13 – SISTEMA PARA ANESTESIA .....	45
FIGURA 14 – ADMINISTRAÇÃO DA DROGA POR GAVAGEM. ....	45
FIGURA 15 – FASES DA PREPARAÇÃO DO RATO PARA CIRURGIA .....	46
FIGURA 16 – FASES DA PRIMEIRA ETAPA CIRÚRGICA .....	47
FIGURA 17 – FASES DA SEGUNDA ETAPA CIRÚRGICA .....	48
FIGURA 18 – FOTOMICROGRAFIAS REVELANDO FIGURAS DE MITOSE.....	50
FIGURA 19 – FOTOMICROGRAFIAS REVELANDO POSITIVIDADE NUCLEAR PARA PCNA.....	51
FIGURA 20 – FOTOMICROGRAFIAS ANALISANDO IMUNOHISTOQUÍMICA PELO Ki-67 .....	51
FIGURA 21 – GRÁFICO REPRESENTANDO A VARIAÇÃO NA REGENERAÇÃO EM RATOS SUBMETIDOS À HEPATECTOMIA 70% .....	63

## LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 – MÉDIA DOS PESOS INICIAL E NA MORTE DE CADA GRUPO .....	53
GRÁFICO 2 – EVOLUÇÃO PONDERAL NOS GRUPOS CONTROLE E ESTUDO AO LONGO DA PESQUISA.....	54
GRÁFICO 3 – AVALIAÇÃO DA PERCENTAGEM DA REGENERAÇÃO HEPÁTICA PELA FÓRMULA DE KWON.....	56
GRÁFICO 4 – AVALIAÇÃO DA REGENERAÇÃO HEPÁTICA PELO ÍNDICE MITÓTICO .....	57
GRÁFICO 5 – AVALIAÇÃO DA PERCENTAGEM DA REGENERAÇÃO HEPÁTICA PELO PCNA. ...	58
GRÁFICO 6 – AVALIAÇÃO DA PERCENTAGEM DA REGENERAÇÃO HEPÁTICA PELO KI-67. ....	59

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – ANÁLISE ESTATÍSTICA COMPARANDO O GRUPO CONTROLE X ESTUDO, UTILIZANDO AS MÉDIAS DO PESO CORPORAL INICIAL, NO DIA DA HEPATECTOMIA E NO DIA DA MORTE NOS PERÍODOS DE 24 HORAS E SETE DIAS. ....	53
TABELA 2 – ANÁLISE ESTATÍSTICA DAS MÉDIAS DO PESO DO FÍGADO RESSECADO, PESO ESTIMADO DO FÍGADO RESTANTE E DO PESO TOTAL ESTIMADO DO FÍGADO NO DIA DA HEPATECTOMIA ENTRE OS GRUPOS CONTROLE E ESTUDO NOS PERÍODOS DE 24 HORAS E SETE DIAS. ....	54
TABELA 3 – ANÁLISE ESTATÍSTICA DAS MÉDIAS DA RELAÇÃO DO PESO TOTAL ESTIMADO DO FÍGADO NO DIA DA HEPATECTOMIA E DO PESO DO RATO NO MESMO MOMENTO ENTRE OS GRUPOS CONTROLE E ESTUDO NOS PERÍODOS DE 24 HORAS E SETE DIAS. ....	55
TABELA 4 – ANÁLISE ESTATÍSTICA DAS MÉDIAS DO PESO DO FÍGADO NO DIA DA MORTE ENTRE OS GRUPOS CONTROLE E DE ESTUDO NOS PERÍODOS DE 24 HORAS E SETE DIAS.....	55
TABELA 5 – ANÁLISE ESTATÍSTICA DAS MÉDIAS DA RELAÇÃO DO PESO TOTAL DO FÍGADO NO DIA DA MORTE DO RATO E DO PESO CORPORAL NO MESMO MOMENTO ENTRE OS GRUPOS CONTROLE E DE ESTUDO NOS PERÍODOS DE 24 HORAS E SETE DIAS.....	55

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ALR –	augmenter of liver regeneration
Anvisa –	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CEP/SD –	Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde
CNS –	Conselho Nacional de Saúde
COBEA –	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
c-met –	receptor para o fator de crescimento do hepatócito
DNA –	ácido desoxiribonucleico
dp –	desvio padrão
EGF –	Fator de Crescimento Epidérmico
EGFR –	receptor para o fator de crescimento epidérmico e fator de crescimento tumoral alfa
eIFs –	fatores de iniciação eucarióticos
FDA –	Food and Drug Administration
FGF $\alpha$ –	fator de crescimento dos fibroblastos alfa
FKBP –	proteína ligadora de FK506
GC <sub>1</sub> –	Grupo Controle 1 – 24 horas
GC <sub>2</sub> –	Grupo Controle 2 - sete dias
GE <sub>1</sub> –	Grupo de Estudo 1 – 24 horas
GE <sub>2</sub> –	Grupo de Estudo 2 – sete dias
HE –	Hematoxilina-Eosina
HGF –	Fator de Crescimento dos Hepatócitos
HP –	Hepatectomia Parcial
HSS –	Substância Estimuladora Hepática
IL-1 –	Interleucina 1
IL-2 –	Interleucina 2
IL-5 –	Interleucina 5
IL-6 –	Interleucina 6
IL-12 –	Interleucina 12
Inmetro –	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
JNK -	c-Jun-N-terminal cinase
LT $\beta$ –	Linfotoxina Beta
M –	Valores Médios
mTOR –	mammalian target of rapamycin
NF- $\kappa$ B –	Fator Nuclear da Cadeia Kappa das Células B
NK –	células natural killer
NKT –	células natural killer T
p –	nível de significância estatística
PCNA –	Antígeno Nuclear de Proliferação Celular
PVPI –	Polivinilpirrolidona-iodo
R1-TNF –	receptor para o fator de necrose tumoral alfa
STAT3 –	Sinal de Transdução e Ativador da Transcrição
TGF $\alpha$ –	Fator Transformador de Crescimento Alfa
TGF $\beta$ –	Fator Transformador de Crescimento Beta
TNFR1 –	Receptor tipo 1 para o Fator de Necrose Tumoral
TNF $\alpha$ –	Fator de Necrose Tumoral Alfa
UFPR –	Universidade Federal do Paraná

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>14</b>
1.1	OBJETIVOS	16
1.1.1	<i>Objetivos Gerais</i>	16
1.1.2	<i>Objetivos Específicos</i>	16
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>17</b>
2.1	ARQUITETURA HISTO-CELULAR HEPÁTICA	17
2.2	REGENERAÇÃO HEPÁTICA	19
2.2.1	<i>Nível Celular da Regeneração Hepática</i>	21
2.2.2	<i>Nível Molecular na Regeneração Hepática</i>	24
2.2.3	<i>Citocinas</i>	27
2.2.4	<i>Fatores de Crescimento e Hormônios</i>	28
2.3	MODELO EXPERIMENTAL DE ESTUDO DA REGENERAÇÃO	32
2.3.1	<i>Modelo em Ratos</i>	32
2.3.2	<i>Modelo de Cultura de Hepatócitos</i>	34
2.4	IMUNOSSUPRESSÃO	34
2.4.1	<i>Sirolimus</i>	35
2.5	AVALIAÇÃO DA REGENERAÇÃO	38
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODO</b>	<b>40</b>
3.1	MATERIAL	40
3.1.1	<i>Ratos</i>	40
3.1.2	<i>Local do Estudo</i>	40
3.1.3	<i>Drogas e Soluções</i>	40
3.1.4	<i>Outros Materiais</i>	41
3.2	MÉTODO	42
3.2.1	<i>Comissão de Ética em Pesquisa</i>	42
3.2.2	<i>Ambiente</i>	43
3.2.3	<i>Grupos</i>	43
3.2.4	<i>Manipulação</i>	44
3.2.5	<i>Anestesia</i>	44
3.2.6	<i>Gavagem</i>	45
3.2.7	<i>Avaliação da Massa Corpórea do Rato</i>	46
3.2.8	<i>Ato Operatório</i>	46
3.2.9	<i>Morte</i>	48
3.2.10	<i>Avaliação da Regeneração pela Fórmula de Kwon</i>	49
3.2.11	<i>Avaliação da Regeneração pelo Índice Mitótico</i>	49
3.2.12	<i>Avaliação Imunohistoquímica</i>	50
3.2.13	<i>Análise Estatística</i>	52
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>53</b>
4.1	PESO DOS RATOS	53
4.2	PESO DO FÍGADO	54
4.3	REGENERAÇÃO HEPÁTICA PELA FÓRMULA DE KWON	56
4.4	REGENERAÇÃO HEPÁTICA PELO ÍNDICE MITÓTICO	57
4.5	REGENERAÇÃO HEPÁTICA PELO PCNA	58
4.6	REGENERAÇÃO HEPÁTICA PELO KI-67	59
<b>5.</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>60</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>66</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A regeneração hepática é um evento que envolve várias células e uma complexa interação entre citocinas e fatores de crescimento. Pesquisas experimentais em modelos animais vêm progressivamente contribuindo para a elucidação desse processo regenerativo (TARLÁ *et al.*, 2006). HIGGINS e ANDERSON publicaram os primeiros estudos sobre regeneração hepática em 1931, quando notaram uma marcante capacidade do fígado do rato regenerar após hepatectomia parcial. Esse modelo de hepatectomia com ressecção de aproximadamente 70% da massa hepática tem sido largamente utilizado para investigação da regeneração hepática (COURT *et al.*, 2002). O processo regenerativo hepático em ratos assemelha-se ao processo de regeneração do fígado humano, o que justifica seu amplo uso em várias áreas da pesquisa biomédica atual (endócrina, celular, genética e molecular) (ROZGA, 2002).

A regeneração hepática é um componente essencial no mecanismo de proteção orgânica contra a perda de tecido hepático funcionante seja por agressão química, viral, perda traumática, ou por hepatectomia parcial (De JESUS *et al.*, 2000). Na ausência desse processo regenerativo, a morbidade e a mortalidade estão freqüentemente aumentadas. Na falência hepática fulminante, onde uma grande maioria dos hepatócitos é acometida, a sobrevivência não é possível sem a recuperação de suficiente massa hepática (ROZGA, 2002).

O fígado apresenta a característica de ajustar-se ao tamanho proporcional requerido pelo receptor através da capacidade regenerativa. Portanto, a regeneração hepática é crucial para o sucesso do transplante hepático inter-vivos e naqueles em que o órgão implantado é menor que o tamanho ideal para o organismo receptor (LIU *et al.*, 2005).

O fenômeno da regeneração hepática é amplo, complexo e ainda não completamente conhecido. Após o estudo pioneiro proposto por HIGGINS e ANDERSON (1931) vários trabalhos foram realizados na busca do conhecimento sobre os mecanismos celulares e hormonais relacionados ao processo regenerativo. As interferências de medicamentos, do metabolismo intrínseco do organismo e de doenças também é motivo de estudo para a compreensão desta complexa rede de fatores estimuladores e inibidores da regeneração hepática.

O sirolimus é um novo fármaco, recentemente lançado como potente imunossupressor e atualmente proposto como terapêutica após transplantes hepáticos para controlar a rejeição do órgão. Seu efeito imunossupressor interfere na multiplicação de células do sistema imunológico. O sirolimus liga-se a um complexo proteico intracelular denominado FKBP12, postulado como uma via da resposta de regeneração hepática após fatores estimuladores (FRUMAN *et al.*, 1995). O mecanismo de ação é bloquear a resposta imune interferindo na produção de linfócitos. Essa interferência na proliferação celular pode ocasionar alterações no fenômeno de regeneração hepática (NELSEN *et al.*, 2003). Dessa maneira, o estudo do processo de regeneração hepática sob influência do imunossupressor sirolimus pode determinar novas informações pertinentes na prática clínica para uma melhor adequação desse medicamento nos pacientes pós transplantados.

## **1.1 OBJETIVOS**

### **1.1.1 Objetivos Gerais**

Analisar a influência do sirolimus na regeneração hepática desencadeada pela ressecção de 70% do parênquima hepático em ratos plenamente desenvolvidos.

### **1.1.2 Objetivos Específicos**

Para se obter o objetivo geral foram estipulados alguns objetivos específicos:

- Determinar a porcentagem da massa hepática regenerada pela fórmula de Kwon;
- Determinar o índice mitótico observado em histologia convencional com hematoxilina e eosina;
- Determinar a proliferação celular pela imunohistoquímica utilizando Ki-67 e PCNA;



## 2 REVISÃO DE LITERATURA

Localizado entre o trato digestivo e o restante do corpo, o fígado desempenha a enorme tarefa de manter a homeostasia metabólica do organismo. Isso inclui o processamento dos aminoácidos dietéticos, dos carboidratos, dos lipídios e das vitaminas; fagocitose de partículas da circulação esplâncnica; síntese das proteínas séricas; biotransformação dos metabólitos circulantes; e detoxicação e excreção através da bile dos produtos endógenos de desgaste e dos xenobióticos poluentes (MICHALOPOULOS, 2007).

O fígado é dividido em segmentos funcionais com base na vascularização, cujo conhecimento é essencial nas ressecções hepáticas. Em 1898, Cantlie sugeriu a divisão do fígado humano em lobo direito e esquerdo baseado em uma linha imaginária que passa no leito da vesícula biliar até a veia cava inferior. Couinaud, em 1954, propôs a segmentação baseada na circulação portal que resulta na divisão em oito segmentos menores (COELHO, 2005).

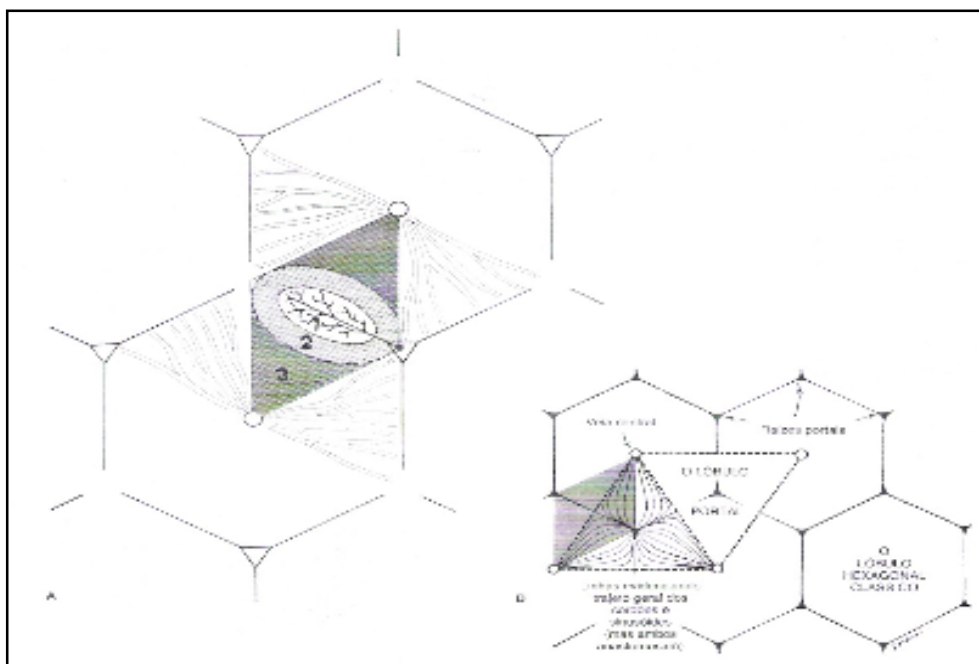
### 2.1 ARQUITETURA HISTO-CELULAR HEPÁTICA

Existem atualmente alguns modelos conceituais para interpretar a estrutura interna do fígado:

**Lóbulo hepático clássico:** Introduzido por Kiernam em 1833, é definido como o tecido hepático circunjacente a veia central (veia centrolobular). Na periferia está presente o trato portal (tríade portal, cápsula de Glisson), contendo ramos iniciais da via biliar e ramos terminais da veia porta e da artéria hepática, sendo considerado o limite imaginário e arquitetônico do lóbulo hepático clássico (CORMACK, 1991. p. 408-410). O sangue proveniente da artéria hepática e da veia porta progride através de sinusóides e drena para a vênula central (Figura 1).

**Ácino hepático:** baseado no conceito de grupo de ácinos funcionais, cada um com centro na região aferente vascular da tríade portal e limite na drenagem venosa para as veias hepáticas. Conforme a posição do hepatócito, o parênquima do ácino é dividido em três zonas: zona 1 é a mais próxima do suprimento vascular do trato portal, a zona 3 situa-se em contato com a veia centrolobular, e a zona 2 encontra-se intermediária as anteriores. As regiões adjacentes à veia centrolobular,

por apresentarem um menor aporte de oxigênio e suprimentos, sofrem a maior parte das agressões, sejam elas por antígenos, toxinas ou lesões anóxicas. A necrose em ponte situa-se nessa área. As regiões mais proximais ao trato portal sobrevivem por mais tempo e podem, posteriormente, formar o núcleo a partir do qual ocorrerá a regeneração (ROBBINS, 1996) (Figura 1).



**Figura 1** – Representação diagramática do modelo conceitual da estrutura interna do fígado. O modelo **A** representa o ácino hepático e o modelo **B** representa o lóbulo clássico e portal. No modelo **A** observa-se as três zonas do suprimento vascular. FONTE: CORMACK, 1991, p. 411.

Os hepatócitos desempenham mais de 500 funções metabólicas que incluem a detoxificação de drogas e substâncias tóxicas, a degradação de hormônios esteróides e a utilização de lipídios na síntese de lipoproteínas. As células de Kupffer são membros altamente fagocíticos do sistema reticuloendotelial e tem a função de remover as toxinas do sangue venoso portal bem como a produção de citocinas na fase inicial do ciclo celular regenerativo. As células endoteliais formam um revestimento contínuo da luz sinusoidal selecionando os solutos e partículas que serão apresentados aos hepatócitos subjacentes. As células de Ito ou de armazenamento de lipídios apresentam aspecto de estrela e localizam-se no espaço de Disse. São responsáveis pela produção da matriz extracelular (HATA *et al.*, 2007).

## 2.2 REGENERAÇÃO HEPÁTICA

Um aspecto importante do fígado é a sua capacidade de regeneração (COURT *et al.*, 2002). A perda de células funcionantes, seja por agressão isquêmica, química ou viral; ou a diminuição da massa hepática por trauma ou cirurgia, induz o processo regenerativo hepático (ASSY; MINUK, 1997; JESUS *et al.*, 2000).

O primeiro relato da capacidade de regeneração hepática está no poema Teogonia escrito por Hesíodo VIII séculos a.C. Os gregos já reconheciam a regeneração hepática através do mito de Prometeu. Como punição por ter roubado o fogo secreto dos deuses do Olimpio e entregue aos humanos, Prometeu foi acorrentado a uma rocha e condenado a ter parte de seu fígado diariamente comido por uma águia. Durante a noite havia regeneração hepática deixando o fígado pronto para ser novamente acometido, ocasionando uma eterna tortura (MICHALOPOULOS *et al.*, 1997). O primeiro relato científico de regeneração hepática em humanos foi descrito por Ponfick em 1890 (KONIARIS *et al.*, 2003).

O fígado é um órgão com poucas células em multiplicação celular, com apenas 0.0012% a 0.01% dos hepatócitos em fase de mitose (KONIARIS *et al.*, 2003). Essa baixa capacidade de replicação celular em fígados saudáveis pode ser alterada por mecanismos de agressão.

A restauração da massa hepática inicia-se imediatamente após o estímulo inicial e completa-se em 7-10 dias no rato (RAMALHO *et al.*, 1993; COURT *et al.*, 2002; KONIARIS *et al.*, 2003; MICHALOPOULOS, 2007). No fígado humano, embora a restauração da massa hepática após hepatectomia parcial pareça ocorrer em duas a três semanas, a restauração completa só foi verificada após três meses (NAGASUE *et al.*, 1987; KHAN; MUDAN, 2007).

O termo regeneração, consagradamente utilizado, tem apenas o significado de recuperação do volume do órgão e não de regeneração da parte perdida, como ocorre no novo crescimento da cauda ou extremidades em répteis (COURT, *et al.*, 2002). O que ocorre é a hiperplasia global de todo o parênquima até que se restabeleça a massa hepática primitiva (variando em 5 a 10%), quando então ocorre interrupção abrupta do processo (RAMALHO *et al.*, 1993; STEER, 1995). Esse fenômeno é uma hiperplasia compensatória e não regeneração verdadeira

(KONIARIS *et al.*, 2003). No final da regeneração, o tamanho do lobo hepático remanescente fica marcadamente aumentado e a espessura da placa dos hepatócitos encontra-se em duas vezes o tamanho original (MICHALOPOULOS; DeFRANCES, 1997). Estudos prévios sugerem que ocorra uma lenta reorganização lobar que pode levar semanas a fim de restabelecer a arquitetura histológica hepática (WAGENAAR *et al.*, 1993)

A massa hepática residual é importante pois deve ser capaz de manter o metabolismo funcional normal e iniciar o processo de regeneração. No rato, a ressecção de mais de 80% da massa hepática resulta um processo regenerativo inferior quando comparada a hepatectomia padrão de 70% (BUCHER; SWAFFIELD, 1964). Entretanto, ressecções de até 90% da massa hepática foram realizadas com sucesso em ratos (GAUB; IVERSEN, 1984) e também em fígados humanos (STARZL *et al.*, 1975). Pacientes com mais de 80% da massa celular acometida completam a regeneração hepática se sobreviverem a agressão inicial (GOVE; HUGHES, 1991).

Os limites do máximo de tecido hepático acometido ou ressecado que resulta em regeneração hepática eficiente também é determinado pelo estado fisiológico do fígado e do organismo. Doenças intrínsecas como esteato-hepatite e cirrose; e sistêmicas como desnutrição, diabetes e imunodeficiências limitam o processo regenerativo (KONIARIS *et al.*, 2003).

A perda da massa hepática também pode ser induzida por isquemia e pela administração de agentes hepatotóxicos que podem lesar conjuntos específicos de células ou todos os tipos celulares. Após a lesão segue-se um processo inflamatório, remoção dos tecidos desvitalizados e resposta regenerativa (MICHALOPOULOS, 2007). A ingestão abusiva de álcool origina destruição celular nas zonas periportais; a isquemia e o tetracloreto de carbono levam à necrose maciça pericentral; a D-galactosamina causa lesão pan-hepatocelular; a exposição ao corante de anilina, lesão seletiva do epitélio dos ductos biliares. A regeneração por sua vez também é específica dependendo do agente nocivo ou do tipo da lesão. No caso da D-galactosamina, os hepatócitos não se proliferam, mas sim as células progenitoras ou células ovais (KONIARIS *et al.*, 2003).

A hipofisectomia, tireoidectomia e paratireoidectomia retardam o pico da síntese de DNA por 16 a 20 horas, mas não o suprimem. Efeito semelhante é

produzido por raios X, actiomicina, ciclohexamida e colchicina. A denervação do fígado através da secção medular alta (C7) resulta em abolição do pico de síntese de DNA (RAMALHO *et al.*, 1993).

Os estudos sobre transplante hepático ortotópico intervivos em humanos tem revelado que o enxerto transplantado regenera rapidamente se pequeno, enquanto se for maior ocorrerá atrofia do tecido hepático excedente até atingir a proporção ideal para a massa corporal do receptor (HIGASHIYAMA *et al.*, 1993). No transplante intervivos, tanto o doador como o receptor alcançam a massa hepática original em 60 dias (FAUSTO, 2001). Nos transplantes de fígados pequenos para o tamanho do receptor (“small for size”) pode ocorrer dificuldade na adaptação do enxerto devido à regeneração insuficiente, resultando em elevada morbidade e mortalidade (KONIARIS *et al.*, 2003).

### **2.2.1 Nível Celular da Regeneração Hepática**

A regeneração hepática após hepatectomia parcial é realizada através da proliferação de todas as células existentes no fígado remanescente. Estas incluem células parenquimatosas (hepatócitos) e células não-parenquimatosas (células do epitélio biliar, células do endotélio fenestrado, células de Kupffer e células de Ito) (MICHALOPOULOS, 2007). 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 (MICHALOPOULOS, 1990; RAMALHO *et al.*, 1993).

As células ovais, localizadas nos ramos terminais da árvore biliar, são consideradas um grupo de células indiferenciadas capaz de restabelecer o tecido hepático quando a massa tecidual residual apresentar-se crítica para a atividade fisiológica do organismo, isto é, quando a multiplicação estiver comprometida e os hepatócitos incapazes de responder adequadamente aos estímulos regenerativos (FAUSTO, 2001; TARLA *et al.*, 2006b). A habilidade regenerativa está diminuída em fígados doentes acometidos por vírus ou outras doenças, condição a qual ativa a subpopulação de células ovais (KHAN; MUDAN, 2007).

O hepatócito é uma célula de natureza epitelial, altamente diferenciada e que raramente se divide sem estímulo regenerativo. No rato somente um hepatócito

entre cerca de 20.000 pode estar se dividindo (ROZGA, 2002) e durante toda a vida adulta cada hepatócito pode ocasionar somente uma, duas ou talvez nenhuma divisão celular. No entanto, a capacidade de replicação não é perdida (FAUSTO, 1990)

A capacidade regenerativa do fígado parece ser ilimitada como demonstrada em repetitivas ressecções hepáticas em ratos. Estudando ressecções consecutivas não foi demonstrado desregulação na proliferação dos hepatócitos (FAUSTO, 1990). Um único hepatócito foi capaz de sofrer 69 divisões celulares sucessivas, originando  $5,9 \times 10^{20}$  células. Considerando que um fígado normal possua  $8 \times 10^7$  células, pode-se concluir que um único hepatócito tem potencial para produzir  $7 \times 10^{12}$  fígados (KONIARIS *et al.*, 2003).

A regeneração hepática no rato pode ser dividida em três fases: Iniciação (0 a 12-14 horas), proliferação (14 a 36 horas) e inibição (RAMALHO *et al.*, 1993; TARLA *et al.*, 2006b). As células hepáticas quiescentes (fase  $G_0$ ), após estímulo inicial, simultaneamente entram no ciclo celular (fase  $G_1$ ). Os hepatócitos atingem a fase  $G_1$  imediatamente, progredindo para a fase S com a síntese de DNA 10 a 12 horas após a cirurgia. O primeiro pico de produção de DNA ocorre em 24 horas com menores picos em 36 e 48 horas após a ressecção hepática. Após a fase  $G_2$ , a mitose segue 6 a 8 horas após a síntese de DNA (22 a 24 horas após a ressecção hepática) atingindo um pico em 32 a 34 horas após a cirurgia (FAUSTO, 2002; FAUSTO; RIEHLE, 2005). Ciclos adicionais de síntese do DNA podem ser detectados por 5 a 10 dias, no entanto são menos definidos e intensos que o primeiro (RAMALHO *et al.*, 1993). O segundo pico mitótico é mais comumente observado nas ressecções maiores que 50%. Já para Michalopoulos (2007), apenas uma pequena porcentagem de células realizaria o segundo ciclo de DNA o qual é suficiente para restabelecer o número original de hepatócitos.

O tempo para síntese do DNA após hepatectomia parcial varia com idade. A descrição da seqüência típica dos eventos se aplica a ratos adultos (dois a seis meses de idade). Estudos com ratos mais velhos (acima de um ano) demonstram atraso da síntese de DNA, com pico em 30 a 34 horas após o estímulo inicial. A maioria dos hepatócitos (95% em ratos jovens e 75% em ratos velhos) participa de um ou dois ciclos de proliferação celular (STEER, 1995; MICHALOPOULOS; DeFRANCES, 1997; FAUSTO, 2001; FAUSTO; RIEHLE, 2005).

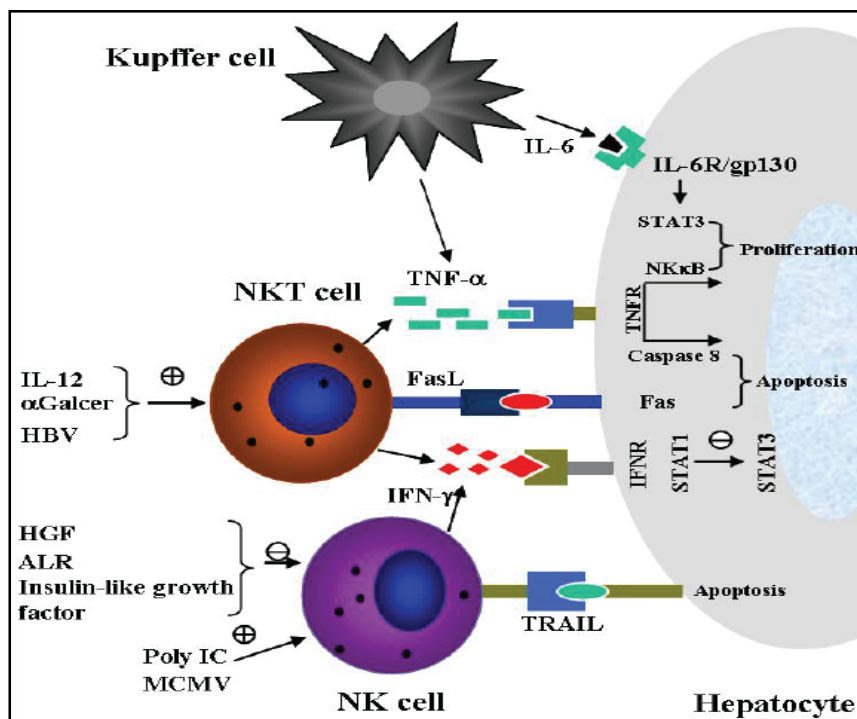
Quando a razão massa/volume atinge o tamanho original os hepatócitos retornam ao seu estado de quiescência na fase  $G_0$  (COURT *et al.*, 2002).

A transição da fase  $G_0$  para a  $G_1$  ocorre simultaneamente em todas as células hepáticas, sendo observado um atraso na mitose nas células não-parenquimatosas. Esse atraso deve-se a existência de uma fase  $G_1$  mais prolongada. A replicação das células não-parenquimatosas ocorre 24 horas após a replicação dos hepatócitos (RAMALHO *et al.*, 1993; STEER, 1995).

Durante os primeiros três dias após a hepatectomia parcial, 85% dos hepatócitos sintetizam DNA, com cerca de 80% da síntese ocorrendo nas proximidades do espaço porta (zonas 1 e 2 do ácino hepático). Hepatócitos localizados nas zonas 1 e 2 replicam o DNA mais precocemente que aqueles próximos a veia centrolobular (zona 3 do ácino hepático). Após sua origem, os novos hepatócitos se movem em direção a veia centrolobular, de forma que as células jovens tendem a se localizar no terço interno, e as mais velhas no terço externo do ácino hepático (RAMALHO *et al.*, 1993).

O sistema imunológico do fígado com a presença de células de Kupffer, células natural killer (NK), células natural killer T (NKT), neutrófilos, eosinófilos e componentes do complemento pode estimular ou prejudicar a proliferação hepatocitária. Pesquisas recentes demonstram efeitos anti-proliferativos resultantes das células NK e NKT e efeitos anti-proliferativos e proliferativos pelas células de Kupffer (DONG, *et al.*; 2007). Em condição hepática normal, as células NK exercem atividade inibitória sobre a regeneração (SUN; GAO, 2004) e a sua depleção aumenta significativamente o processo regenerativo (FRANCAVILLA *et al.*, 1997). Ao estimular o sistema imune no combate a uma infecção, o processo regenerativo é severamente atenuado (SUN; GAO, 2004) (Figura 2).

Pode-se dizer que quase todo o sistema imune apresenta uma atividade inibitória sobre a regeneração hepática, com exceção das células de Kupffer que também apresentam atividade promotora inicial com a liberação da IL-6 e TNF $\alpha$ . O que ocorre é um balanço de forças, quando existe uma maior quantidade de estímulos para a proliferação celular, a regeneração hepática acontece e o sistema imune parece não influenciar, no entanto, quando o fígado alcança o seu tamanho original, os estímulos proliferativos diminuem e o sistema imune fortalece-se e inibe o crescimento hepático (FAUSTO, 2006; DONG, *et al.*; 2007).



**Figura 2** – Ilustração do efeito regulatório do sistema imune sobre a regeneração hepática. O fígado apresenta grande quantidade de células NK, NKT e de Kupffer. As células de Kupffer participam de eventos iniciais da regeneração com a liberação de IL-6 e TNF $\alpha$  e posteriormente participam da interrupção do processo proliferativo com a liberação de TNF $\alpha$  e TGF $\beta$ . As células NK podem inibir o crescimento hepático e ocasionar apoptose nos hepatócitos. FONTE: DONG *et al.*, 2007.

## 2.2.2 Nível Molecular na Regeneração Hepática

A regeneração hepática poderia ser considerada um processo no qual o hepatócito realiza uma regressão celular tornando-se uma célula “imatura” com potencial para proliferação, denominado de desdiferenciação. No entanto, durante o processo de regeneração não ocorre alterações morfológicas e expressão de proteínas de desenvolvimento com seria esperado, o que ocorre é uma aumento nos níveis de RNA<sub>m</sub> já presentes no fígado quiescente. Portanto, na regeneração, as alterações da expressão gênica limitam-se ao caráter quantitativo (RAMALHO *et al.*, 1993; DE JESUS *et al.*, 2000).

Na resposta regenerativa, a proliferação dos hepatócitos é controlada por vários estímulos extracelulares incluindo as citocinas, fatores de crescimento, nutrientes e a matriz extracelular (NELSEN *et al.*, 2003). Estes estímulos resultam em subsequente aumento da atividade a genes e telômeros (HATA *et al.*, 2007).



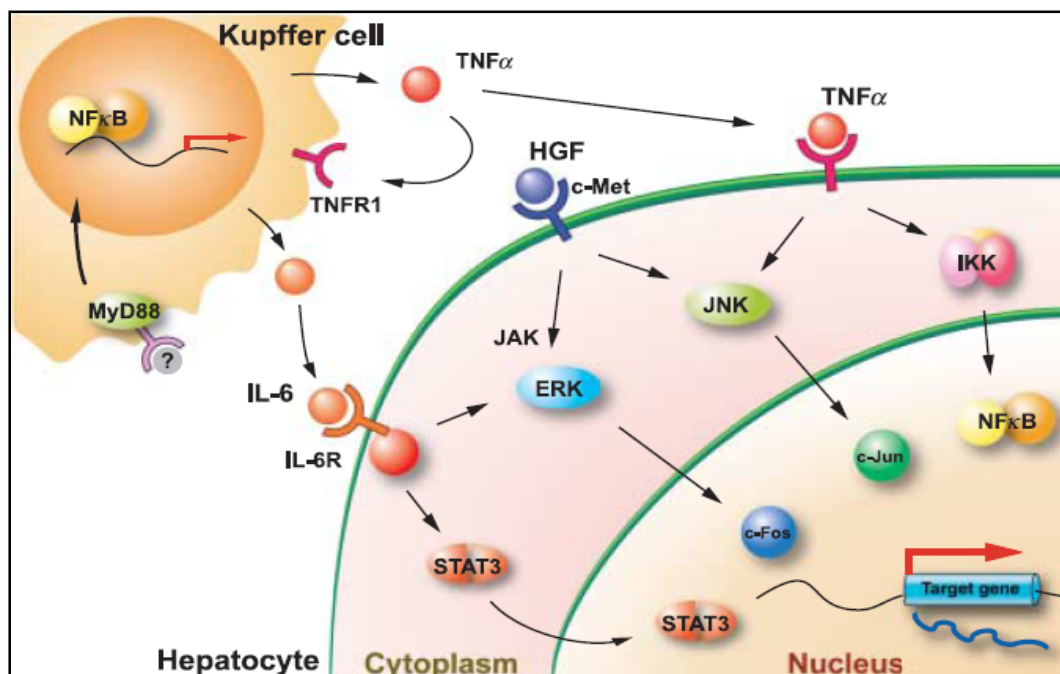
Telômeros são estruturas constituídas por fileiras repetitivas de proteínas e DNA não codificante que formam as extremidades dos cromossomos com função de proteção contra a digestão enzimática e na interrupção da replicação. Os telômeros são como relógios, que regulam quantas vezes uma célula vai se dividir. Eles ficam menores a cada divisão celular. A presença dos telômeros é dependente da enzima telomerase, a qual normalmente não é expressa nas células hepáticas quiescentes, exceto durante a replicação celular (COURT *et al.*, 2002).

O início da proliferação celular e gerenciamento inicial da fase G<sub>1</sub> são controlados pelas citocinas (PAPADIMAS *et al.*, 2006). Estes mensageiros intercelulares, particularmente as citocinas inflamatórias (fator de necrose tumoral-alfa e a interleucina 6), sinalizam aos hepatócitos para entrarem no ciclo celular e responderem aos fatores de crescimento (HATA *et al.*, 2007). As células de Kupffer, endoteliais e estreladas são essenciais para a normal proliferação hepatocitária devido ao fato de produzirem citocinas e fatores de crescimento necessários ao processo (HATA *et al.*, 2007). As citocinas ativam os fatores de transcrição como o NF- $\kappa$ B, STAT3, AP-1 e C/EBP $\beta$  (FAUSTO; RIEHLE, 2005). A ligação do TNF $\alpha$  no seu receptor (R1-TNF) conduz a ativação do **fator nuclear kappa B** (NF- $\kappa$ B) e **c-Jun-N-terminal cinase** (JNK). A ativação do NF- $\kappa$ B tem papel importante na expressão gênica, na regulação do ciclo celular e na proteção dos hepatócitos contra a apoptose celular (TARLA, 2006a; RUTHERFORD; CHUNG, 2008). A ligação da IL-6 no seu receptor conduz a ativação do **sinal transdutor e ativador da transcrição 3** (STAT3), que entra no núcleo e induz a transcrição de vários genes envolvidos na regeneração (FAUSTO, 2001). O fator de crescimento do hepatócito (HGF) liga-se ao receptor c-met conduzindo a ativação das **quinases ERK** (HATA *et al.*, 2007) (Figura 3). O receptor c-met (para o HGF) e o receptor EGFR (para o EGF e TGF $\alpha$ ) tem um aumento na sua transcrição após estímulo causado pela ligação do TNF $\alpha$  (FAUSTO, 2001).

A membrana plasmática torna-se hiperpolarizada em 30 minutos após insulto inicial, com rápida entrada de sódio e elevação do pH intracelular (DE JESUS *et al.*, 2000). Michalopoulos e DeFrances (1997) relatam que o receptor para uroquinase surge imediatamente na membrana plasmática ocasionando atividade enzimática aumentada da uroquinase em 1 a 5 minutos após cirurgia. Essa enzima está envolvida na ativação do HGF (MICHALOULOPOLOS, 2007). A degradação da

matriz extracelular dos hepatócitos que ocorre imediatamente após a hepatectomia parcial favorece a atuação da uroquinase e demais enzimas envolvidas na ativação do pró-HGF em HGF maduro e expressão do seu receptor c-met (DE JESUS, 2000).

A resposta celular aos vários fatores de crescimento exige a presença de receptores específicos na membrana plasmática. O complexo fator-receptor formado é internalizado na célula e degradado. Ocorre a ativação de proteínas tirosina quinase e fosforilação de proteínas intracelulares. Em seqüência, há a ativação de um segundo mensageiro (p. ex. AMP cíclico, cálcio, inositol trifosfato, diacilglicerol ou fosfolipase C) que induz a ativação de proteínas quinase C, as quais desencadeiam uma série de eventos secundários e ativação dos genes envolvidos no processo proliferativo (p.ex. c-fos, c-myc e c-jun). Esta seqüência de eventos culmina com a replicação do DNA (RAMALHO *et al.*, 1993; DE JESUS *et al.*, 2000; YOKOYAMA, NAGINO e NIMURA, 2007).



**Figura 3** – Desenho demonstrando as vias de interações das citocinas e fatores na regeneração hepática. Após estímulo, as citocinas incluindo o TNF $\alpha$  e IL-6 são liberadas das células de Kupffer ativadas, ligam-se aos receptores nos hepatócitos conduzindo a ativação de fatores de transcrição (STAT3, NF- $\kappa$ B, c-Fos e c-Jun no citoplasma e no núcleo) e expressão de genes da regeneração. FONTE: HATA *et al.*, 2007.

Proto-oncogenes são um grupo de genes normais intimamente e fisiologicamente associados à proliferação celular. A expressão dos proto-oncogenes c-fos, c-myc, p53, c-jun e c-ras está relacionada ao ciclo celular, não

apenas em fígados em regeneração, mas também em uma série de outras células (RAMALHO *et al.*, 1993; DE JESUS *et al.*, 2000).

A expressão dos proto-oncogenes após a hepatectomia parcial é específica, seqüencial e altamente regulada. Mesmo com a incerteza sobre a função dos proto-oncogenes, pode-se utilizar dos níveis destas proteínas para identificar as etapas do período pré-replicativo da regeneração hepática. O período pré-replicativo pode ser subdividido em iniciação e progressão. A iniciação ocorre com aumento da expressão do c-fos e c-myc entre 30 minutos e 1 hora. A progressão ocorre na seqüência com um aumento dos níveis do RNA<sub>m</sub> para p53 e c-ras em 8 a 16 horas. No período de progressão, os hepatócitos passariam a produzir TGF $\alpha$  e FGF $\alpha$  que os moveria da fase G<sub>1</sub> para a fase S do ciclo celular (controle autócrino) (RAMALHO *et al.*, 1993; DE JESUS *et al.*, 2000).

Existem evidências que o número de hepatócitos produzidos na regeneração pode exceder a quantidade original, e para controlar esse desarranjo, uma leve onda de apoptose pode ocorrer. A inibição da regeneração dos hepatócitos é possivelmente desencadeada pela complexa preparação da matriz extracelular. Uma série de eventos que ocorrem na matriz extracelular, como a ligação do HGF aos glicosaminoglicanos e ligação de TGF $\beta$  à decorina, fazem o hepatócito retornar a fase G<sub>0</sub> do ciclo celular. A nova matriz extracelular, sintetizada pelas células estreladas que foram estimuladas pelo TGF $\beta$ , restaura os sítios de ligação tanto do HGF como do próprio TGF $\beta$ . Nesse contexto, o TGF $\beta$  não é o agente que terminaliza a regeneração, mas pode ser considerado o “maestro” que orquestra múltiplos eventos em uma complexa alça de feedback, ocasionando a ativação da apoptose celular e o bloqueio da transcrição gênica (KHAN; MUDAN, 2007; MICHALOUPoulos, 2007).

### **2.2.3 Citocinas**

Após a hepatectomia, as células não parenquimatosas e os hepatócitos remanescentes aumentam a produção de citocinas como o fator de necrose tumoral alfa (TNF $\alpha$ ), linfotoxina  $\beta$  (LT $\beta$ ), interleucina-1 (IL-1) e interleucina-6 (IL-6) (TARLÁ *et al.*, 2006a). As citocinas estimulam os hepatócitos a entrar no ciclo celular e responder ao efeito mitogênico dos fatores de crescimento. As principais são o TNF $\alpha$

e a IL-6. (FAUSTO; RIEHLE, 2005). Estudos com a IL-6 e com TNF $\alpha$  documentam claramente que a sinalização precoce dos mecanismos de regeneração hepática não procede normalmente sem estas citocinas (MICHALOUPoulos; DeFRANCES, 1997). Estas citocinas são liberadas em minutos após hepatectomia parcial pelas células não parenquimatosas do fígado, induzindo o hepatócito a sintetizar proteínas da fase aguda. A concentração de IL-6 no plasma aumenta após hepatectomia parcial, com pico em 24 horas (COURT *et al.*, 2002).

## **2.2.4 Fatores de Crescimento e Hormônios**

O processo de regeneração é dependente da presença ou ausência de um número de fatores, agindo em conjunto ou isoladamente. Devido às múltiplas interações entre genes e os fatores de crescimento, é improvável que um simples agente determine o crescimento hepático após hepatectomia parcial (FAUSTO, 2001).

Os hepatócitos iniciados seriam capazes de produzir seus próprios fatores de crescimento (regulação autócrina) e/ou responder a fatores de crescimento produzidos por outras células hepáticas (regulação parácrina) (FAUSTO, 2001).

Na compreensão celular e molecular do amplo e complexo processo regenerativo, deve-se ter em mente duas considerações: **a)** com exceção da via do fator de crescimento do hepatócito (HGF), todas as outras vias da regeneração quando suprimidas originam um processo regenerativo deficitário, mas não a completa abolição da regeneração; e **b)** o fato que mesmo que a supressão de uma via origine alterações pequenas na regeneração, não se deve concluir que essa via não seja importante para o processo regenerativo (MICHALOUPoulos, 2007).

Os fatores de crescimento são classificados em três categorias: mitogênicos completos, mitogênicos incompletos e inibidores do crescimento.

### **2.2.4.1 Agentes Mitogênicos Completos**

São capazes de induzir síntese de DNA em culturas de hepatócitos e mitose em uma população de células em repouso ( $G_0$ ). Este efeito pode ser potencializado por mitogênicos incompletos ou co-mitogênicos como a insulina, glucagon,

adrenalina e noradrenalina (MICHALOPOULOS, 1990). Os principais agentes dessa classe são o fator de crescimento epidérmico (EGF), o fator transformador do crescimento- $\alpha$  (TGF $\alpha$ ), o fator de crescimento de hepatócito (HGF) e o fator de crescimento de fibroblastos ácidos (FGF $\alpha$ ).

Fator Transformador do Crescimento  $\alpha$  (TGF $\alpha$ ): apresenta capacidade de estimular a proliferação dos hepatócitos *in vitro* e *in vivo* (DE JESUS *et al.*, 2000). Ocorre um aumento dos níveis RNA<sub>m</sub> para TGF $\alpha$  8 horas após a hepatectomia parcial, com níveis atingindo o máximo em 24 horas (RUSSEL *et al.*, 1993). A secreção de TGF $\alpha$  pelos hepatócitos em regeneração possivelmente se constitui numa alça autócrina estimuladora da síntese de DNA (RAMALHO *et al.*, 1993). Atua no mesmo receptor do EGF sobre os hepatócitos já “iniciados” (MICHALOPOULOS, 1990).

Fator de crescimento Epidérmico (EGF): estimula a síntese de DNA na maioria das células epiteliais, inclusive em hepatócitos. Os níveis séricos de EGF elevam-se em poucas horas após hepatectomia parcial, mas diminuem rapidamente, antes mesmo da síntese de DNA pelos hepatócitos (DE JESUS *et al.*, 2000). Quando o EGF é acrescentado em cultura de hepatócitos, a síntese de DNA inicia em 24 horas com pico atingindo entre 48 e 72 horas. Após hepatectomia observa-se um declínio dos níveis de RNA<sub>m</sub> para o receptor do EGF, diminuição da afinidade do EGF pelo receptor e aumento da produção de TGF $\alpha$  que compete pelo mesmo receptor. Esses eventos resultam na diminuição do número de receptores disponíveis para o EGF (RAMALHO *et al.*, 1993).

Fator de crescimento do hepatócito (HGF): é o mais potente mitógeno para os hepatócitos. No fígado normal é produzido pelas células não parenquimatosas, principalmente pela célula de Ito. Os níveis plasmáticos elevam-se 20 vezes em 1 a 2 horas após hepatectomia parcial, retornando a valores normais em 72 horas. A elevação precoce dos níveis plasmáticos de HGF após hepatectomia, precedendo em muitas horas o início da síntese de DNA, faz o HGF o principal candidato à função de indutor do processo regenerativo (MICHALOPOULOS, 2007; RAMALHO *et al.*, 1993). Inicialmente é necessária a maturação do pró-HGF à HGF com a participação da enzima uroquinase e ativação do seu receptor (C-met) na membrana

plasmática para permitir a incorporação do HGF para o interior da célula hepática (DE JESUS *et al.*, 2000). Sua ação é potencializada na presença de insulina, glucagon, norepinefrina e EGF. Seu efeito é inibido pela somatostatina e parcialmente pela heparina.

Fator de crescimento de Fibroblastos ácido (FGF $\alpha$ ): Também conhecido como fator de crescimento ligante à heparina 1 (Heparin Binding Growth Factor 1), é secretado por hepatócitos em regeneração, células ovas e de Ito. Aumenta agudamente por até 24 horas após estímulo, com pico de secreção coincidindo com o pico de síntese de DNA e permanece elevado durante 7 dias. A elevação dos níveis de FGF $\alpha$  ocorre após a iniciação de hepatócitos primários, não parecendo ser o desencadeador do processo regenerativo (DE JESUS *et al.*, 2000).

Substância estimuladora hepática (HSS): é extraída do citosol da célula hepática regenerada. Também denominado de “aumentador da regeneração hepática” (augmenter of liver regeneration – ALR). É considerado como fator de progressão da replicação, agindo sobre células que estejam atingindo a fase G<sub>1</sub> do ciclo celular. Observam-se valores elevados no fígado de ratos adultos após 12 horas da hepatectomia com pico máximo em 26 horas e permanecem elevados por até 72h. No rato, foi comprovada sua atividade inibitória sobre as células natural killer (NK) presentes no fígado o que poderia impedir a destruição dos hepatócitos nas doenças agudas e, portanto, estimulando a regeneração hepática (TANIGAWA, *et al.*, 2000; DE JESUS *et al.*, 2000).

#### **2.2.4.2 Agentes Mitogênicos Incompletos ou Co-mitogênicos**

Auxiliam na indução da síntese de DNA. São agentes que não têm efeito direto na proliferação dos hepatócitos, mas são capazes de potencializar o efeito dos mitógenos completos e reduzir o efeito dos agentes inibidores. Os principais agentes são norepinefrina, insulina, glucagon, vasopressina, prostaglandinas, citocinas e nutrientes como glutamina. Não possuem efeitos mitogênicos quando adicionados isoladamente em meios de cultura (RAMALHO *et al.*, 1993).

Insulina e Glucagon: São dois hormônios importantes para o trofismo e metabolismo dos hepatócitos atuando sinergicamente na regeneração. *In vitro*, a ausência da insulina pode causar a degeneração e morte dos hepatócitos. A insulina e o glucagon potencializam o EGF na síntese de DNA (DE JESUS *et al.*, 2000).

Norepinefrina: Essencial durante as fases iniciais da regeneração hepática. *In vitro*, possui propriedades mediadas pelo receptor  $\alpha$ 1-adrenérgico, exacerba o potencial mitogênico do EGF e é capaz de reduzir o efeito inibitório do TGF $\beta$  (DE JESUS, *et al.*, 2000).

Vasopressina: No rato com deficiência congênita de vasopressina, a regeneração hepática encontra-se reduzida e é restabelecida após administração desse hormônio (RAMALHO, 1993). A vasopressina é secretada nas sinapses simpáticas hepáticas juntamente com a norepinefrina, podendo ambas estar envolvidas nos efeitos do sistema simpático sobre a regeneração (MICHALOPOULOS, 1990).

Prostaglandinas: As prostaglandinas são formadas a partir da degradação do ácido araquidônico dos fosfolípidos das membranas pela fosfolipase-A<sub>2</sub>. A adição de ácido araquidônico ou de prostaglandinas à cultura de hepatócitos provoca um aumento na síntese de DNA. As células de Kupffer de fígados em regeneração apresentam grande capacidade de secreção dessas prostaglandinas. Isso ocorre precocemente e persiste por até 48 horas após a ressecção hepática (DE JESUS, *et al.*, 2000).

#### **2.2.4.3 Agentes inibidores do crescimento**

Controlam o término da proliferação celular. Os principais agentes são o fator transformador de crescimento- $\beta$  (TGF $\beta$ ), activina e a interleucina-2.

Fator Transformador de Crescimento beta (TGF $\beta$ ): produzido pelos hepatócitos e pelas células não parenquimatosas, é uma citocina multifuncional que possui tanto efeitos inibitórios quanto estimulantes dependendo do tipo celular e das condições envolvidas (FRANCAVILLA *et al.*, 1992). Em cultura de hepatócitos, inibe a

mitogênese induzida pelo EGF, pelo TGF $\alpha$  e pelo HGF. No rato, sua administração antes e após uma hepatectomia parcial inibe o pico de síntese de DNA (RAMALHO *et al.*, 1993).

Activina: É um membro da superfamília TGF $\beta$ , sendo um potente inibidor da proliferação dos hepatócitos *in vitro* e *in vivo* (DE JESUS, *et al.*, 2000).

Interleucina-2: Tem a capacidade de inibir parcialmente a proliferação dos hepatócitos (DE JESUS, *et al.*, 2000).

## **2.3 MODELO EXPERIMENTAL DE ESTUDO DA REGENERAÇÃO**

A regeneração hepática é conhecida como um espetacular exemplo de crescimento tecidual organizado. Pode ser induzida artificialmente por qualquer tratamento agudo, cirúrgico ou químico, o qual remova ou destrua um grande percentual do parênquima hepático (RAMALHO *et al.*, 1993).

Devido às limitações no uso de fígados humanos para o estudo da regeneração, a maioria das informações sobre o processo regenerativo tem sido proveniente de modelos *in vivo* com pequenos animais (ratos e camundongos) ou utilizando células hepáticas em cultura (*in vitro*) (KONARIS *et al.*, 2003).

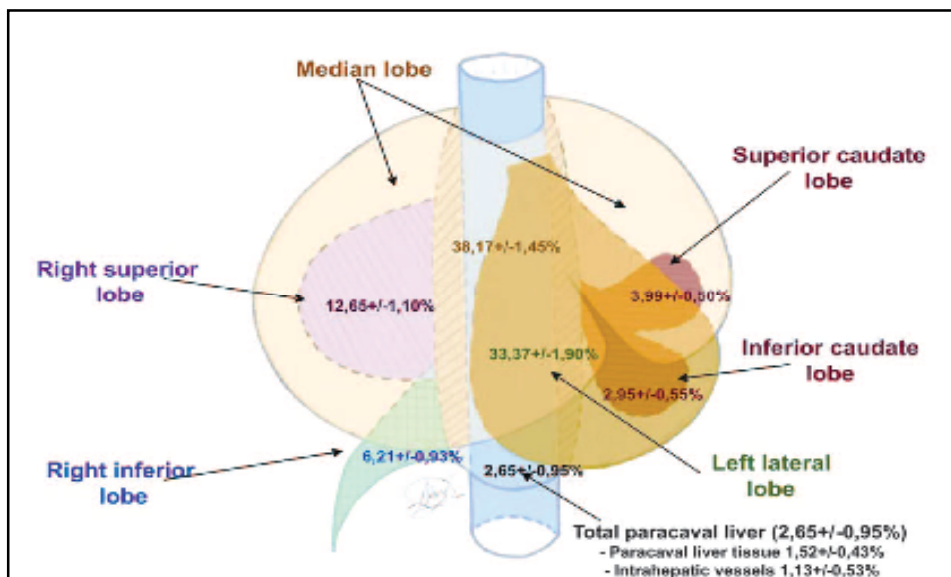
### **2.3.1 Modelo em Ratos**

O modelo introduzido por HIGGINS e ANDERSON em 1931 é o principal e mais difundido método de estudo do processo regenerativo hepático (COURT *et al.*, 2002; MICHALOPOULOS, 2007). Consiste em um procedimento cirúrgico simples no qual são removidos 70% do fígado do rato através de uma pequena incisão na parede abdominal. A facilidade no manuseio dos pequenos animais, o baixo custo e a semelhança com processo regenerativo do fígado humano também colaboram para preferência desse modelo (FAUSTO, 2001; ROZGA, 2002; KONARIS *et al.*, 2003). Citocinas e fatores de crescimento que são críticos para a regeneração hepática em humanos são expressos durante regeneração em modelos



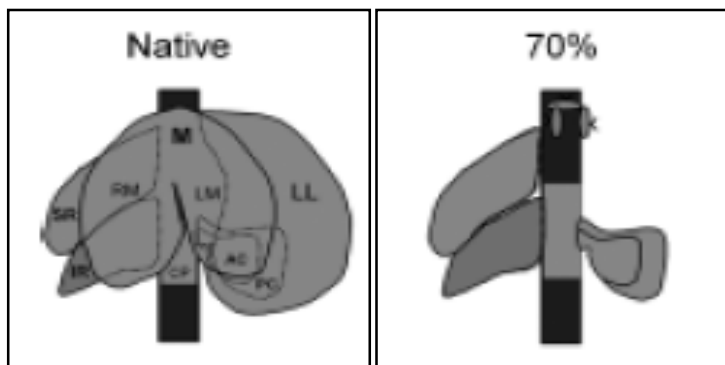
experimentais, sugerindo um mecanismo similar de controle entre as espécies (KONIARIS *et al.*, 2003).

O fígado do rato é dividido em quatro lobos principais: lobo caudado, lobo direito, lobo mediano e lobo lateral esquerdo. O lobo lateral esquerdo representa aproximadamente 30% do peso total do fígado, o lobo mediano 40%, o lobo direito representa 20% e o caudado 7%. O tecido hepático circundando a veia cava perfaz um total de 3% do peso do fígado (MADRAHIMOV, *et al.*, 2006) (Figura 4).



**Figura 4** – Distribuição percentual do peso dos lobos do fígado do rato. FONTE: MADRAHIMOV *et al.*, 2006.

Devido à estrutura multilobar do fígado do rato, a remoção de dois dos quatro lobos é realizada facilmente sem deixar danos aos lobos remanescentes. Os lobos lateral esquerdo e mediano são removido através da ligadura do pedículo vascular, resultando na retirada de aproximadamente 70% (2/3) da massa hepática total desses animais (MICHALOPOULOS, 2007; MARTINS *et al.*, 2007) (FIGURA 5).



**Figura 5** – Desenho esquemático de ressecção de 70% da massa hepática no rato com a remoção dos lobos mediano e lateral esquerdo. FONTE: MARTINS *et al.*, 2007.

Após hepatectomia de 70% no rato, o fígado remanescente aumenta de tamanho em 24 horas para 45% da massa original, em três dias para 70% e no sétimo dia atinge a massa inicial (JIANG *et al.*, 2001; FAUSTO, 2001) (Figura 6).



**Figura 6**– Fotos sequenciais do fígado do rato após hepatectomia 70% nos dias 0, 1, 3 e 7. Foi realizada a remoção dos lobos mediano e lateral esquerdo. FONTE: HATA *et al.*, 2007.

A hepatectomia parcial de 70% reduz a massa hepática abruptamente sem ocasionar lesão nas células remanescentes. É observado um aumento da pressão portal para os segmentos que permaneceram (o fluxo sanguíneo triplica por unidade de tecido hepático). Pesquisas demonstram que a manutenção do fluxo portal normal após hepatectomia parcial resulta em deficiência na regeneração hepática (MICHALOULOPOLOS, 2007).

### 2.3.2 Modelo de Cultura de Hepatócitos

Neste modelo os hepatócitos são isolados através de técnicas especiais e colocados em locais para cultura (MICHALOULOPOLOS, 1990). A administração dos fatores mitogênicos completos nessas células *in vitro* resulta em proliferação celular. O estudo em culturas de hepatócitos mostra respostas fisiológicas diferentes daquelas observadas *in vivo* (FRANCAVILLA, 1994; KONIARIS *et al.*, 2003). Através do estudo *in vitro* tem se reconhecido a importância das células não parenquimatosas e as suas possíveis interações com os hepatócitos na regeneração *in vivo* (LABRECQUE, 1994).

## 2.4 IMUNOSSUPRESSÃO

Na ausência da imunossupressão os órgãos transplantados evoluíram invariavelmente para destruição através do sistema imunológico. O objetivo da

imunossupressão nos transplantes é de induzir tolerância ao enxerto, mantendo a capacidade do sistema imune de neutralizar microorganismos patogênicos (KALIL, 2001. p. 490). A principal célula da resposta imunológica na rejeição é o CD4 T, que é crucial para a iniciação por meio do reconhecimento de antígenos estranho ao organismo presentes no enxerto. Posteriormente, secretam altas concentrações de Interleucina 2 (IL-2), que induz a proliferação autócrina de células T, expansão clonal e produção de outras citocinas (DENTON *et al.*, 1999).

A regeneração hepática também pode ser influenciada por imunossupressores usados regularmente no pós-operatório de transplante de órgãos. A ciclosporina, o FK-506 e o micofenolato mofetil podem estimular a regeneração hepática em transplantes de fígado no rato. Dong (2007) sugere o efeito estimulador da ciclosporina e do FK-506 por atuarem inibindo a atividade da célula NK durante o processo regenerativo. Entretanto, *in vitro*, experimentos em cultura de hepatócitos indicam que a ciclosporina e o FK-506 apresentam um efeito antiproliferativo ou citotóxico em hepatócitos humanos adultos (LIU *et al.*, 2005).

#### 2.4.1 Sirolimus

O sirolimus é uma lactona macrocíclica lipofílica produzida pelo fungo *Streptomyces hygroscopicus* que apresenta potente atividade antimicrobiana, imunossupressora e efeito antiproliferativo em fibroblastos, linfócitos e células parenquimatosas. O sirolimus é também denominado de rapamicina ou rapamune por ser inicialmente descoberto em Rapa Nui (Ilha de Páscoa) (HIDALGO; ROWINSKI, 2000; BIECKER *et al.*, 2005; PALMES *et al.*, 2008).

O sirolimus é utilizado como droga imunossupressora em transplantes de órgãos, isoladamente ou em sinergismo com a ciclosporina, provocando potente atividade imunossupressora em transplantes de fígado (KALIL, 2001. p. 490).

A estrutura molecular do sirolimus é  $C_{51}H_{79}NO_{13}$  com peso de 913,7 Da.(Figura 7). Estruturalmente é semelhante ao tacrolimus (FK506), liga-se em locais semelhantes na atividade imunossupressora (FKBP12 – proteína de ligação do FK506 número 12), no entanto apresentam atividade biológica distinta a partir deste ponto (WATSON, *et al.*, 1999).

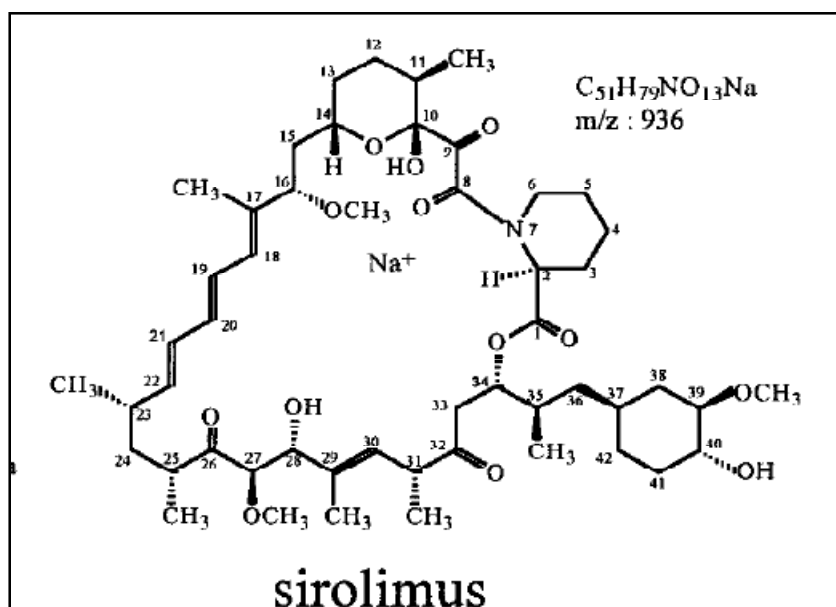
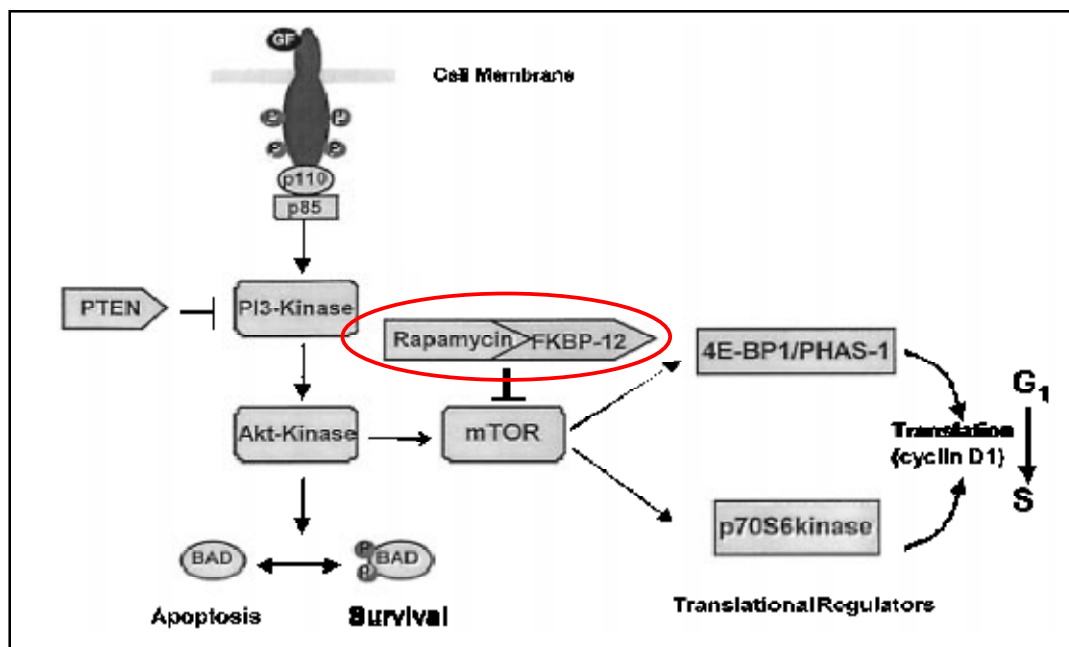


Figura 7 – Estrutura molecular do Sirolimus. FONTE: LAMPEN *et al.*, 1998.

Após a administração oral, o sirolimus é absorvido rapidamente, com tempo médio para atingir a concentração máxima em uma hora.

O mecanismo da ação imunossupressora é bloquear a transição da fase  $G_0$  para a  $G_1$  nos linfócitos ativados e a progressão das células T da fase  $G_1$  para a fase S. Inibe a resposta dos linfócitos T para as citocinas, principalmente a interleucina 2 (IL-2), causando bloqueio na produção de RNAs<sub>m</sub> de proteínas essenciais ao ciclo celular (HIDALGO; ROWINSKI, 2000). O sirolimus inibe os sinais intracelulares que são desencadeados pela ativação do receptor da IL-2 (DENTON *et al.*, 1999). Liga-se no citosol, a membros da família das imunofilinas (denominadas de proteínas de ligação do FK506 ou FKBP) inibindo sua atividade enzimática. Quatro isômeros do FKBP têm sido descrito: FKBP12, FKBP13, FKBP25, e FKBP52 (FRUMAN *et al.*, 1995). O sirolimus (rapamicina) liga-se ao FKBP12. O complexo rapamicina-FKBP12 inibe a atividade de uma quinase denominada de *mammalian target of rapamycin* (mTOR) a qual esta envolvida na regulação de funções críticas na progressão do ciclo celular (HIDALGO; ROWINSKI, 2000; VLIET *et al.*, 2006) (Figura 8)



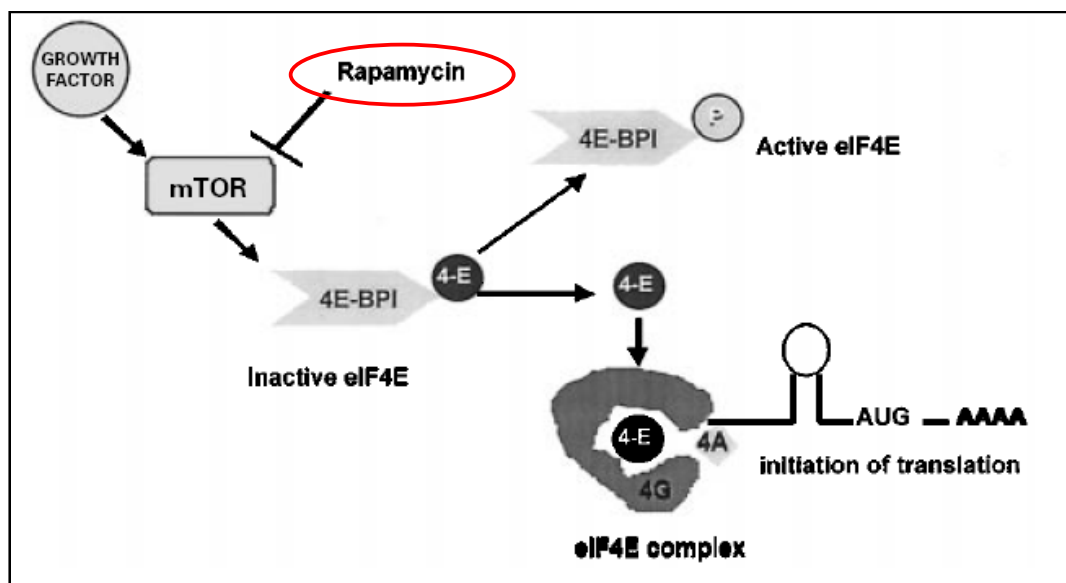
**Figura 8** – Mecanismo molecular do sirolimus (rapamicina) na inibição da atividade proliferativa. A rapamicina liga-se a proteína de ligação do FK506 número 12 (FKBP12), este complexo bloqueia a atividade do *mammalian target of rapamycin* (mTOR). A inibição da mTOR inibe a atividade da p70<sup>S6k</sup> e 4EBP1/PHAS o que resulta em diminuição da transcrição do RNA<sub>m</sub> de proteínas específicas para a progressão do ciclo celular da fase G1 para a fase S. FONTE: HIDALGO; ROWINSKI, 2000.

A mTOR é uma quinase com função de modulação da proliferação celular. Sua ativação resulta em fosforilação do 4E-BP1 e sua liberação do complexo eIF4E-4EBP1, permitindo a formação de outro complexo entre os fatores eIF4E-eIF4G que inicia a síntese protéica. A transcrição do RNA<sub>m</sub> é um complexo processo que necessita a colaboração de vários fatores de iniciação eucarióticos (eIFs) (GOGGIN *et al.*, 2004) (Figura 9).

O complexo **rapamicina-FKBP12** inibe especificamente a mTORC1, resultando em redução da atividade das quinases p70<sup>S6k</sup> e p34<sup>cdc2</sup> e diminuição da fosforilação do 4E-BP1. A quinase p70<sup>S6k</sup>, sem a interferência da rapamicina, tem a função de fosforilar a proteína S6 da subunidade 40S do ribossoma ativando-a em sua função para seguir a proliferação celular. Em adição, a rapamicina ocasiona diminuição da concentração da ciclina D1 e, portanto, na síntese protéica com déficit no crescimento e proliferação celular (FRUMAN *et al.*, 1995; JIANG *et al.*, 2001; NELSEN *et al.*, 2003; BIECKER *et al.*, 2005; PALMES *et al.*, 2008).

Essa interferência na proliferação celular pode ocasionar alterações no fenômeno de regeneração hepática. Os efeitos observados do sirolimus já foram

confirmados na fase precoce da regeneração do fígado quando associado a altas taxas de proliferação celular (PALMES, *et al.*, 2008).



**Figura 9-** Ação do sirolimus (rapamicina) sobre a mTOR. Inibe a fosforilação do complexo 4E-BP1, diminuindo a liberação do 4E e formação do complexo eIF4E-eIF4G. FONTE: HIDALGO; ROWINSKI, 2000.

## 2.5 AVALIAÇÃO DA REGENERAÇÃO

A regeneração hepática é um componente essencial nos processos reparativos seguindo a injúria aplicada as células do fígado. Nesse contexto, são de extrema importância a documentação da atividade regenerativa (ASSY; MINUK, 1997). A avaliação da regeneração pode ser realizada por vários métodos e marcadores que demonstram a proliferação celular.

Em estudos experimentais, a massa hepática ressecada e regenerada pode ser mensurada pelo cálculo do peso do fígado. Obviamente, esse recurso não é aplicado na prática clínica. Entretanto, a avaliação tomográfica pode ser utilizada, de maneira aproximada para calcular a massa hepática de maneira não intervencionista (ASSY; MINUK, 1997).

A contagem de células avaliando-se figuras de mitose em seções histológicas pela coloração de hematoxilina e eosina é um método bem reconhecido e um dos mais utilizados para a avaliação da proliferação celular (ASSY; MINUK, 1997; FABRICANT, 1968).

A imunohistoquímica é uma técnica baseada no uso de anticorpos que se ligam em moléculas endógenas nos tecidos. Esses anticorpos são marcados e mensurados numericamente ou percentualmente.

O antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) é uma proteína auxiliar da DNA polimerase delta. Está envolvida na coordenação da progressão do ciclo celular e na replicação do DNA (ASSY *et al.*, 1998). Sua expressão é dependente do ciclo celular, sendo primeiramente detectado na fase G<sub>1</sub> e em sua máxima quantidade na fase S (BRAVO *et al.*, 1987; BEM-IZHAK *et al.*, 2002; BIONDO-SIMÕES *et al.*, 2006). No trabalho realizado por Assy *et al* (1998) foi demonstrado que o PCNA tem aumento estatisticamente significativo em 24 horas, com pico máximo em 36 a 48 horas e mantendo níveis acima da linha basal até 72 horas após hepatectomia parcial. Já no trabalho realizado por Wolf e Michalopoulos (1992) foi relatado pico do PCNA em 24 horas após a ressecção hepática. A síntese de DNA origina uma carga genética duplicada e uma tetraploidia temporária nas células em análise, processo o qual pode ser mensurado pela imunohistoquímica utilizando o antígeno de proliferação nuclear da célula (PCNA). A imunohistoquímica utilizando o PCNA é um método comumente utilizado para avaliação de síntese de DNA e replicação celular (ASSY; MINUK, 1997).

O Ki67 é um antígeno celular associado com todas as fases do ciclo celular. Detectado primeiramente no início da fase G<sub>1</sub>, apresenta picos durante a fase S e M, aumenta durante o ciclo e declina rapidamente após a mitose. Avaliação pelo Ki-67 detecta células fora do estágio G<sub>0</sub> do ciclo celular (ASSY; MINUK, 1997; BEM-IZHAK *et al.*, 2002). A proteína Ki-67 está localizada no núcleo celular, predominantemente no nucléolo. Está intimamente associada com proliferação celular e durante a dissociação nucleolar da mitose, encontra-se na periferia dos cromossomos (BROWN; GATTER, 2002).

### **3 MATERIAL E MÉTODO**

#### **3.1 MATERIAL**

##### **3.1.1 Ratos**

No estudo experimental foram utilizados 40 ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*, Rodentia mammalia) adultos, machos, provenientes do biotério de criação do Instituto Politécnico da Universidade Federal do Paraná (UFPR). O peso médio inicial dos animais foi 512,06 g (DP  $\pm$  34,89), variando de 431,8 g a 610 g.

##### **3.1.2 Local do Estudo**

O experimento foi realizado no Centro de Pesquisa do Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica da Universidade Federal do Paraná, o qual conta com ambiente apropriado para manipulação dos animais e execução dos procedimentos cirúrgicos. Os ratos foram mantidos em um número de quatro por gaiola durante as fases da pesquisa. As gaiolas apresentavam um espaço de 0,024 m<sup>3</sup>, com a base e a lateral composta de plástico rígido e resistente e a parte superior composta de uma grade metálica com compartimentos para água e alimentos.

Durante todo o período de aclimação e de estudo, os ratos receberam água e ração balanceada ad libitum, padrão Nuvilab CR1<sup>®</sup>, produzido pela empresa Nuvital Nutrientes, Colombo, PR, Brasil (ANEXO 2).

##### **3.1.3 Drogas e Soluções**

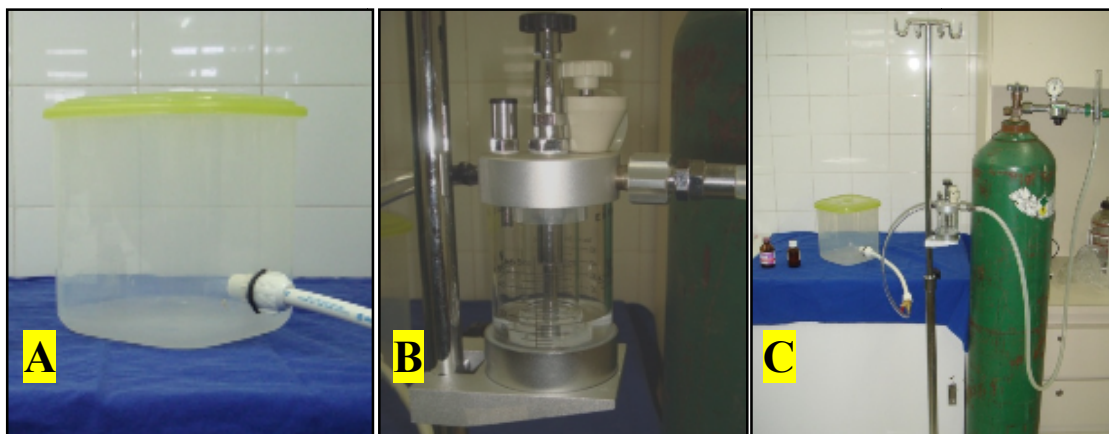
A droga utilizada no grupo de estudo do experimento foi o sirolimus em solução oral, produzida pela indústria farmacêutica Wyeth (Rouses Point, NY, EUA). Cada 1ml da solução oral apresentava 1mg do princípio ativo sirolimus. No grupo controle, para o procedimento de gavagem, utilizou-se solução salina isotônica de cloreto de sódio 0,9% (SSI 0,9%) (Baxter, São Paulo, SP, Brasil).

A droga foi administrada por processo de gavagem observando a padronização de 1mg/kg/dia.



### 3.1.4 Outros Materiais

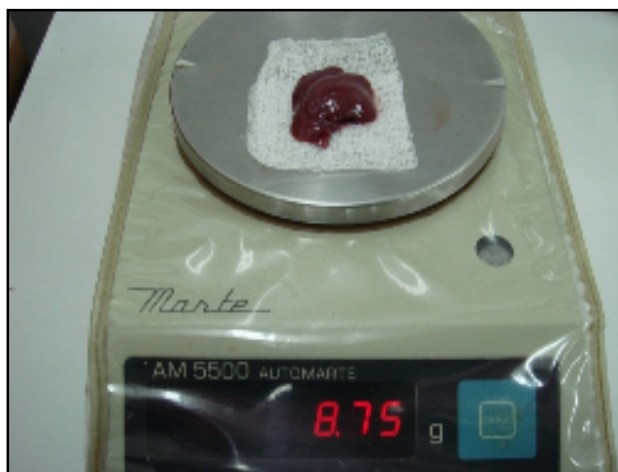
A anestesia e sedação dos ratos foram realizadas com o anestésico inalatório isoflurano (Isoforine<sup>®</sup> - laboratório Cristália). Foi utilizado um reservatório plástico com dimensões de 1500 cm<sup>3</sup> para sedação inicial do rato e um sistema fechado para vaporização do isoflurano (Figura 10).



**Figura 10-** Material utilizado para anestesia: (A) Reservatório para sedação, (B) Vaporizador de isoflurano, (C) Sistema para sedação e anestesia dos ratos.

Utilizou-se uma campânula de vidro para a morte. O rato recebia dose inalatória letal de éter etílico no interior da campânula de vidro.

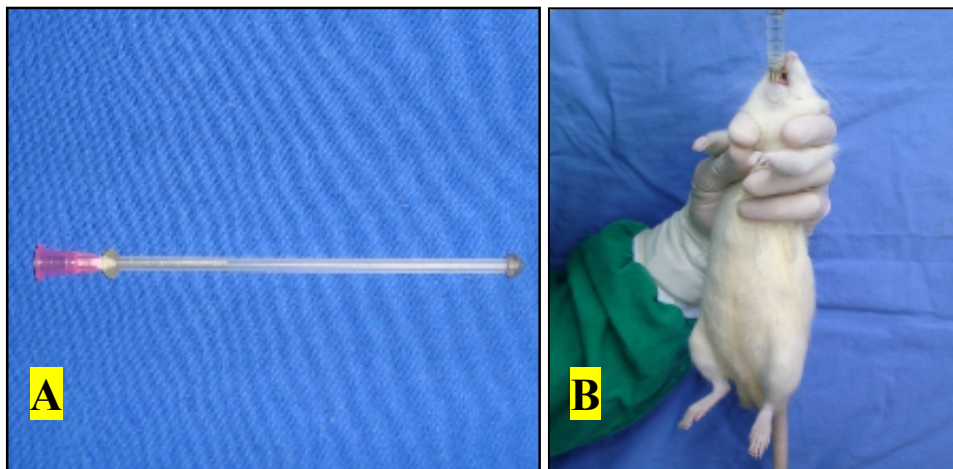
A pesagem dos ratos foi feita em balança modelo AM 500 Marte<sup>®</sup>, regulada nos padrões do Inmetro (Figura 11).



**Figura 11-** Balança utilizada para pesagem.

O procedimento de gavagem foi realizado com auxílio de sonda plástica maleável de acordo com o tamanho médio dos animais. As sondas apresentavam

média de 11,5cm de extensão e ponta esférica atraumática de 1,4mm (Figura 12). As soluções foram dosadas em seringas de 1 ml. A quantidade de droga administrada era proporcional ao peso do animal determinado pela pesagem pré-procedimento.



**Figura 12** – A: Sonda plástica maleável para gavagem, B: Gavagem no rato.

Para realização do procedimento cirúrgico foi utilizado tesoura de Mayo reta, tesoura de Metzemaum curva, pinça de Kelly, pinça de Adson e porta-agulha Derf, todos da marca Edlo<sup>®</sup>. Os materiais descartáveis consistiram de fios de prolene 3-0 (Ethicon<sup>®</sup>), fios de monocril 4-0 (Ethicon<sup>®</sup>) e gazes.

No armazenamento dos espécimes ressecados na cirurgia, foi utilizado solução de formalina 10% (Rioquímica, São José do Rio Preto, SP, Brasil).

O estudo anátomo-patológico das peças foi realizado através da coloração de Hematoxilina-Eosina (HE) e imunohistoquímica com Antígeno Nuclear de Proliferação Celular (PCNA) e Ki-67.

## **3.2 MÉTODO**

### **3.2.1 Comissão de Ética em Pesquisa**

O projeto de pesquisa do presente estudo experimental esteve de acordo com as normas éticas estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). O projeto foi apresentado, analisado e aprovado pelo Comitê de

Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR, em 22 de agosto de 2007, sob o registro CEP/SD: AN.006.002.07.06 (ANEXO 1).

### 3.2.2 Ambiente

Durante o experimento, os ratos permaneceram em ambiente com controle de temperatura ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ), ruído e luminosidade (ciclos claro-escuro de 12 horas – Cronomat<sup>®</sup>, Mallory do Brasil, São Paulo, SP, Brasil). As condições de higiene foram mantidas com troca diária das forrações de cepilho que acumulavam dejetos.

O período de adaptação foi de 14 dias, durante o qual os ratos foram agrupados em número de quatro em cada gaiola e receberam água e ração ad libitum.

### 3.2.3 Grupos

Os ratos foram aleatoriamente divididos em quatro grupos para o estudo: 10 ratos para grupo controle 24h (GC<sub>24h</sub>), 10 ratos para o grupo de estudo 24h (GE<sub>24h</sub>), 10 ratos para o grupo controle 7 dias (GC<sub>7d</sub>) e 10 ratos para o grupo de estudo 7 dias (GE<sub>7d</sub>). O estudo procedeu-se da seguinte maneira:

**Grupo GC<sub>24h</sub>:** recebeu droga placebo, que foi constituída de soro fisiológico 0,9% no mesmo volume equivalente à droga de estudo que seria administrada proporcionalmente ao peso do rato. A droga placebo foi administrada por procedimento de gavagem durante três dias pré-operatoriamente e até a morte que foi realizado 24 horas após hepatectomia parcial.

**Grupo GE<sub>24h</sub>:** recebeu droga imunossupressora sirolimus na dosagem de 1mg/kg/dia por método de gavagem durante três dias pré-operatoriamente e até a morte que foi realizado 24 horas após hepatectomia parcial.

**Grupo GC<sub>7d</sub>:** recebeu droga placebo, que foi constituída por soro fisiológico 0,9% no mesmo volume equivalente à droga de estudo que seria administrada proporcionalmente ao peso do rato. A droga placebo foi administrada por procedimento de gavagem durante três dias pré-operatoriamente e até a morte que foi realizado sete dias após hepatectomia parcial.

**Grupo GE<sub>7d</sub>**: recebeu droga imunossupressora sirolimus na dosagem de 1mg/kg/dia por método de gavagem durante três dias pré-operatoriamente e até a morte que foi realizado sete dias após hepatectomia parcial.

### **3.2.4 Manipulação**

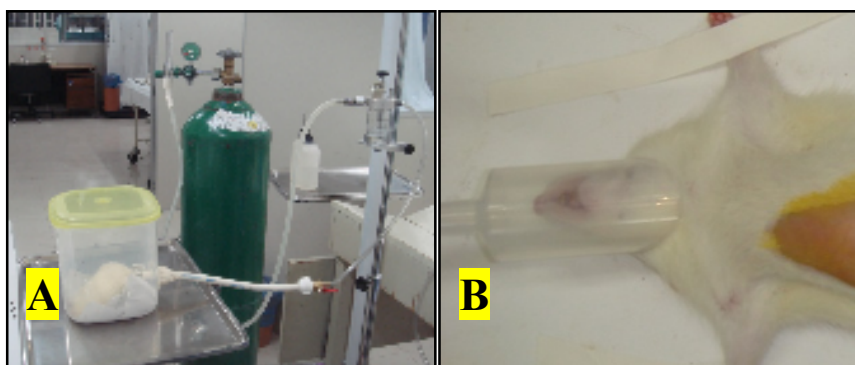
A manipulação dos ratos foi realizada cuidadosamente de acordo com o substitutivo ao projeto de lei n° 1.153 de 1995, que dispõe sobre a utilização de animais em atividades de ensino, pesquisa e experimentação.

Durante os procedimentos os ratos foram apreendidos pela cauda e colocados em um reservatório com anestésico inalatório em dispersão (isoflurano). Após sedação inicial os ratos eram manipulados conforme a etapa da pesquisa e posteriormente encaminhados para as gaiolas ao término do procedimento.

### **3.2.5 Anestesia**

Os ratos foram submetidos à anestesia inalatória com vaporizador de isoflurano na concentração de 1,5 a 3% e fluxo de oxigênio variando de 0,5 a 3L/min.

Inicialmente, para sedação, cada rato era colocado em um reservatório fechado na qual havia anestésico inalatório em dispersão. O reservatório estava conectado em um sistema fechado com vaporizador e fluxo contínuo de oxigênio. Após a cessão dos movimentos voluntários e antes da parada dos movimentos respiratórios, o rato era retirado da campânula e encaminhado para os procedimentos posteriores. Durante o ato operatório o rato era mantido em anestesia por inalação do isoflurano através de um sistema adaptado a sua cabeça (Figura 13).

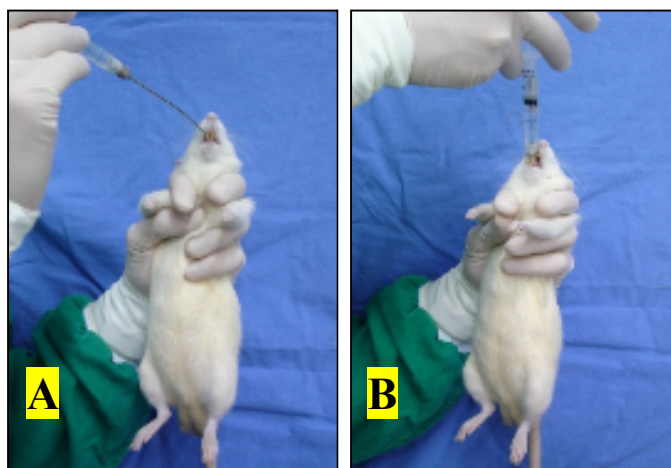


**Figura 13** – Sistema para anestesia. (A) Sistema fechado para sedação inicial e (B) Sistema para anestesia durante ato operatório com adaptador na cabeça do rato.

### 3.2.6 Gavagem

Os ratos foram submetidos à sondagem orogástrica com sonda plástica maleável (gavagem) para administração da solução oral de sirolimus (grupos GE<sub>24h</sub> e GE<sub>7d</sub>) e administração de solução salina isotônica de cloreto de sódio 0,9% (grupos GC<sub>24h</sub> e GC<sub>7d</sub>).

Para a realização do procedimento de gavagem, os ratos eram sedados com anestésico inalatório. O manuseio era realizado da seguinte forma: os ratos eram contidos com a mão esquerda do pesquisador na região dorsal e a sonda de gavagem era introduzida com a mão direita na orofaringe. A sonda era acoplada em uma seringa de 1 ml contendo a dose apropriada da solução e era introduzida até o ponto correspondente à distância entre a boca e o apêndice xifóide (Figura 14).



**Figura 14** – Administração da droga por gavagem. (A) Apreensão do rato sedado; (B) Sondagem orogástrica com cânula plástica maleável.

Os volumes infundidos variaram de acordo com o peso corpóreo: de 0,43 ml a 0,61 ml, com média de 0,5037 ml (DP  $\pm$  0,0386) e sem diferença de volume estatisticamente significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ ). A infusão da solução era realizada de forma lenta e constante e depois de concluída a administração da droga o rato era mantido com a porção cefálica mais elevada que a caudal até recuperar-se da anestesia. Em seguida eram devolvidos para as gaiolas com livre acesso a alimento e água.

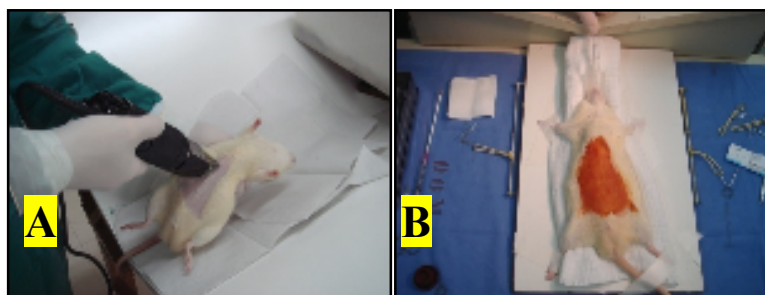
### 3.2.7 Avaliação da Massa Corpórea do Rato

Os ratos foram pesados diariamente antes de serem submetidos à hepatectomia e até o dia da eutanásia. O peso diário foi usado para calcular a dose da medicação em estudo (1mg/Kg/dia).

### 3.2.8 Ato Operatório

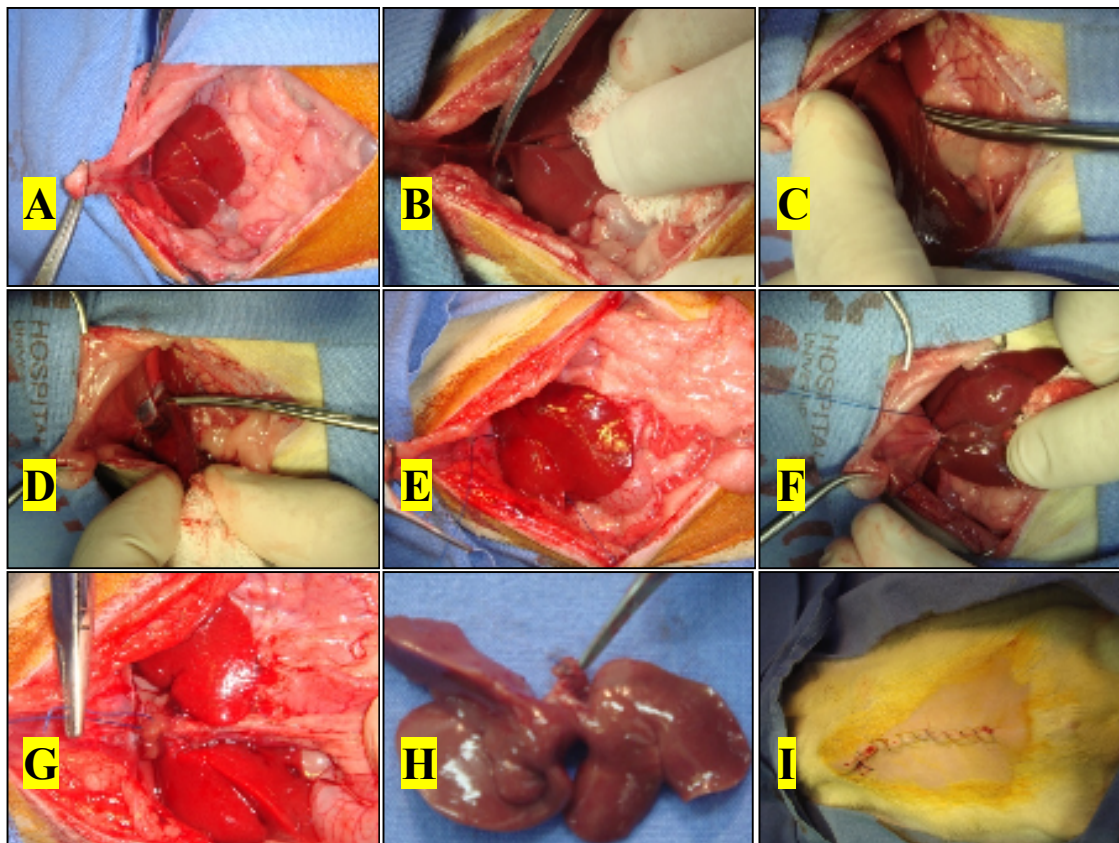
A equipe foi composta de um cirurgião (o pesquisador), um auxiliar responsável pelo monitoramento do plano anestésico e o orientador da pesquisa.

Os ratos permaneciam em jejum 12 horas precedentes ao procedimento cirúrgico. Após a sedação inicial, realizava-se tricotomia abdominal com barbeador elétrico e fixação do animal na mesa cirúrgica. O plano anestésico era administrado através de um objeto adaptado na cabeça do rato. Realizava-se antissepsia da região anterior do abdome com solução tópica de polivinilpirrolidona-iodo (PVPI) (Figura 15).



**Figura 15** – Fases da preparação do rato para cirurgia. (A) Tricotomia da parede abdominal; (C) Fixação na mesa cirúrgica, manutenção do plano anestésico e antissepsia com PVPI.

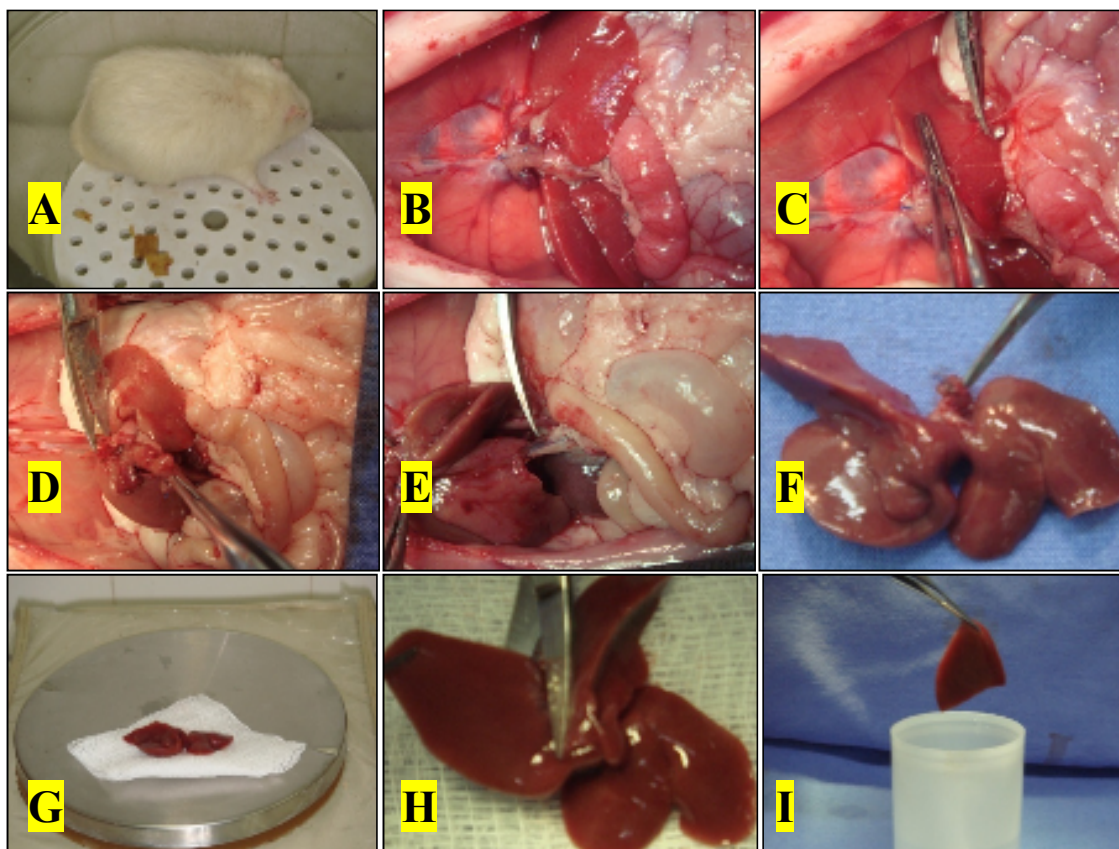
A primeira etapa cirúrgica da pesquisa consistiu em realizar-se a hepatectomia parcial. Após fase preparatória e anestésica, realizava-se laparotomia mediana de 4 cm com tesoura de Metzembaun, liberação dos ligamentos circundantes do fígado e ressecção dos segmentos lateral esquerdo e mediano do fígado com ligadura utilizando fio de monocril 3-0. O fechamento da laparotomia foi realizado com sutura contínua de prolene 3-0 (Figura 16).



**Figura 16** – Fases da primeira etapa cirúrgica: Hepatectomia de 70%. (A) Visão após laparotomia mediana; (B) Liberação do ligamento falciforme do lobo mediano; (C) Liberação do ligamento interlobular; (D) Liberação do ligamento interlobular; (E) Passagem do fio monocril envolvendo o lobo lateral esquerdo; (F) Englobamento pré ligadura dos lobos lateral esquerdo e mediano; (G) Visão após secção dos lobos; (H) Espécime cirúrgica retirada e (I) Visão após o fechamento da cavidade.

Precedente a segunda etapa cirúrgica foi realizada a morte dos ratos com dose letal aspirativa de éter sulfúrico em campânula fechada. Esta etapa do estudo da regeneração foi realizada após o período estabelecido de 24 horas ou sete dias conforme determinação dos grupos da pesquisa. Realizou-se relaparotomia, lise de bridas e a liberação de todo o fígado com secção das veias hepáticas, porta e cava

inferior. O fígado retirado foi pesado e para estudo histológico foi padronizado a ressecção de parte do segmento superior do lobo direito (figura 17).



**Figura 17** – Fases da segunda etapa cirúrgica: Morte do rato e retirada do fígado regenerado. (A) Rato na câmara de morte; (B) Visão da cavidade após abertura do abdome; (C) Liberação do ligamento interlobular; (D) Liberação do ligamento falciforme; (E) Visualização da veia cava infra-hepática; (F) Fígado retirado; (G) Pesagem do fígado; (H) Secção do segmento superior do lobo direito e (I) Imersão em formol para conservação pré análise.

### 3.2.9 Morte

No primeiro dia após a hepatectomia, dez ratos do grupo de estudo 24 horas e do grupo controle 24 horas e no 7º dia pós-operatório dez ratos do grupo controle sete dias e estudo sete dias foram submetidos à morte por dose letal de éter etílico inalatório em câmara de vidro. Logo em seguida o rato foi pesado e submetido à laparotomia para retirada do fígado regenerado (Figura 17).



### 3.2.10 Avaliação da Regeneração pela Fórmula de Kwon

A regeneração hepática foi avaliada pela fórmula proposta por Kwon (1990). A fórmula de Kwon fornece o percentual de regeneração baseado nos pesos corporal e do fígado dos ratos nos períodos da hepatectomia e da morte:

**% = PERCENTUAL DE REGENERAÇÃO**

$$\% = (D/E) \cdot 100$$

**E** = representa o peso estimado de fígado antes da hepatectomia por 100g de massa do animal. É calculado pela fórmula:

$$E = R \cdot 100 / 0,7 \cdot PH$$

**R** = peso do fígado ressecado na hepatectomia experimental  
**PH** = peso do rato na hepatectomia

**D** = representa o peso de fígado por 100g de peso do animal no dia do sacrifício. É calculado pela fórmula:

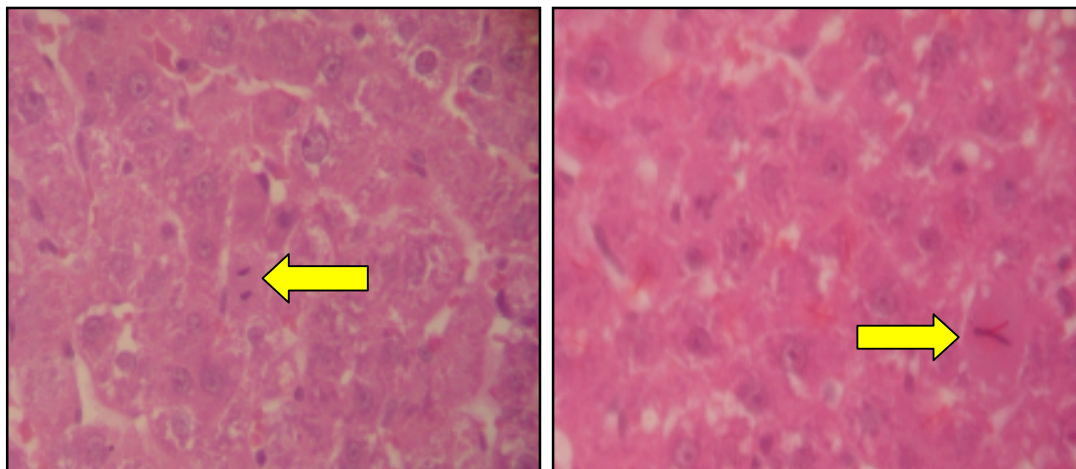
$$D = S \cdot 100 / PS$$

**S** = peso em gramas do fígado ressecado no sacrifício  
**PS** = peso do rato no sacrifício

### 3.2.11 Avaliação da Regeneração pelo Índice Mitótico

Para avaliação da regeneração hepática utilizando-se o índice mitótico, um fragmento da porção superior do lobo direito após a morte de cada rato foi colocado em frasco contendo formalina 10% e enviado ao Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital de Clínicas da UFPR. Após desidratação, diafanização e emblocamento dos tecidos em parafina, foram realizadas microtomias de 4 µm e coloração com HE.

Analisaram-se os cortes histológicos em microscópio óptico, com captura das imagens por câmera fotográfica, as quais foram transmitidas e digitalizadas. Analisaram-se 10 campos de grande aumento (400X) de maneira aleatória, sendo as figuras de mitose registradas e fotografadas (Figura 18).



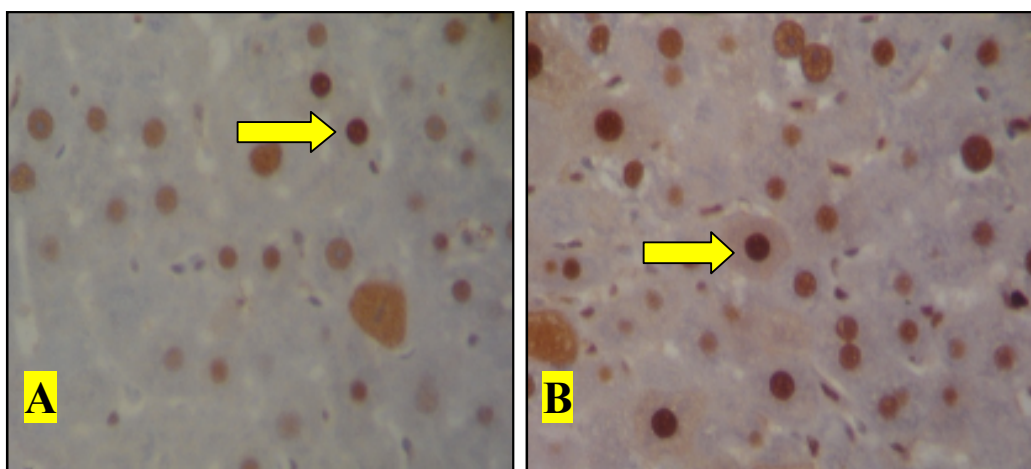
**Figura 18** – Fotomicrografias revelando figuras de mitose (setas) (HE X 400)

### 3.2.12 Avaliação Imunohistoquímica

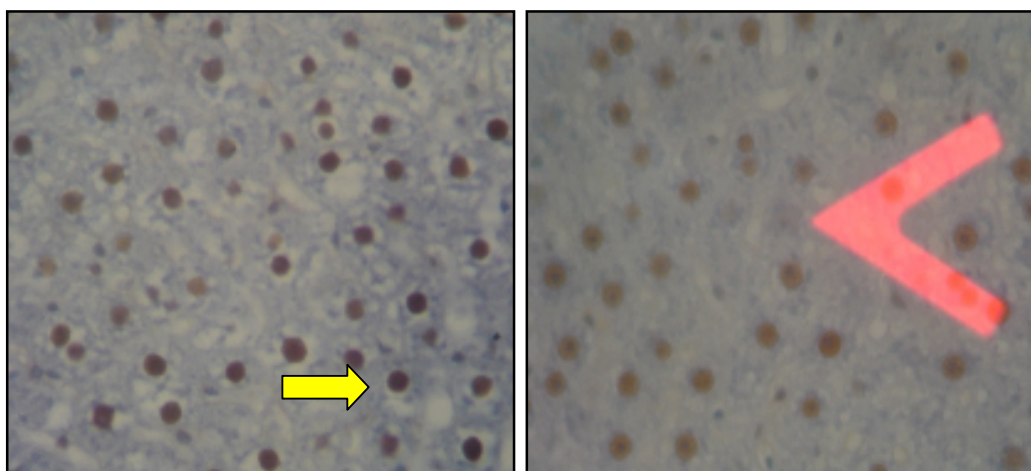
O estudo imunohistoquímico foi desenvolvido no Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital de Clínicas da UFPR. Foram utilizadas lâminas silanizadas para evitar o descolamento dos cortes histológicos durante a coloração. As peças foram desparafinizadas e reidratadas em concentrações adequadas de etanol e água destilada. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada com a utilização de água oxigenada ( $H_2O_2$ ) a 3% por 5 minutos, seguido por uma breve lavagem em água destilada e lavagem de 15 minutos em PBS. As peças foram então colocadas em um tampão de citrato com pH de 6,0 e então aquecidas em forno de microondas a  $98^{\circ}C$  por 5 minutos para o PCNA e por 30 minutos para o Ki-67. Após, as peças foram resfriadas à temperatura ambiente por 20 minutos e imersas em PBS. Anticorpos primários anti-PCNA (Monoclonal, Código M0879, Dako, Carpinteria, USA) e anti-Ki67 (Monoclonal, Código NCL-Ki-67-MM1, Clone MM1, Novocastra, USA) foram aplicados “overnight” à temperatura de  $2^{\circ}C$  a  $8^{\circ}C$ . Após banho em tampão fosfato, seguiu-se à aplicação de anticorpo biotilado por 30 minutos, à temperatura ambiente. Após novo banho em tampão fosfato, seguiu-se à aplicação do complexo estreptavidina–peroxidase por 30 minutos, ainda à temperatura

ambiente. Foi então realizado mais um banho em tampão fosfato e revelação da reação imune com Diaminobenzidina, seguido de contra-coloração com Hematoxilina. Na seqüência, os cortes foram desidratados e montados com bálsamo e lamínulas de vidro. Os cortes histológicos foram analisados.

A positividade da coloração imunohistoquímica foi identificada nas áreas de pigmentação acastanhada. Controles positivos e negativos foram utilizados. As lâminas foram avaliadas sem a identificação dos grupos. Foram analisados 100 hepatócitos de maneira aleatória e considerados positivos os que se coraram moderada ou fortemente e, deste modo, efetuada a porcentagem de células positivas (Figuras 19 e 20).



**Figura 19** – Fotomicrografias revelando positividade nuclear para PCNA (setas) (imunohistoquímica X 400)



**Figura 20** – Fotomicrografias analisando imunohistoquímica pelo Ki-67. (A) positividade para Ki-67 (B) área com negatividade para Ki-67

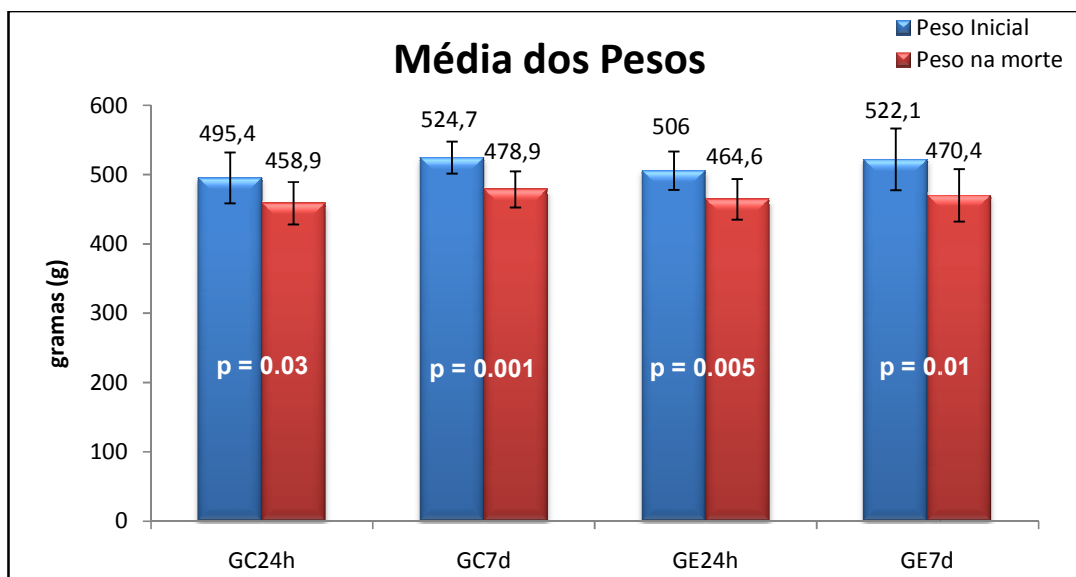
### 3.2.13 Análise Estatística

Procedeu-se ao tratamento estatístico conforme a natureza dos dados analisados nos Grupos: Controle e Sirolimus, nos períodos 24 horas e sete dias para as variáveis: pesos corporais (g) inicial, nos dias da hepatectomia e do sacrifício, intermediários nos 2º e 4º dias pós-operatórios (sete dias); variação dos pesos corporais (g) inicial e no dia do sacrifício; pesos do fígado (g) estimado restante, ressecado e total estimado, no dia da hepatectomia; peso do fígado (g) no dia do sacrifício; relação do peso total estimado do fígado (g) no dia da hepatectomia e do peso do animal (g) no mesmo momento; relação do peso total do fígado (g) no dia do sacrifício e do peso do rato (g) no mesmo momento; porcentagem de regeneração do fígado pela fórmula de Kwon; porcentagem do Ki-67; porcentagem do PCNA; número de mitoses pelo HE. Foram observados os pré-requisitos: distribuição normal (Gaussiana); homocedasticidade das variâncias das variáveis para a escolha do teste estatístico. Na análise não-paramétrica foi utilizado o teste de Mann-Whitney para as comparações: pesos corporais (g) inicial e no dia do sacrifício no grupo Controle no período sete dias; variação dos pesos corporais inicial e no dia do sacrifício (g) dentro do grupo Controle; peso corporal (g) no dia do sacrifício entre os grupos no período sete dias; número de figuras de mitose, e entre os grupos no período 24 horas. Nos demais resultados utilizaram-se a análise paramétrica com o teste t de Student e empregou-se o critério de Aspin-Welch para o cálculo dos graus de liberdade para: peso do fígado (g) no dia do sacrifício entre os grupos no período 24 horas; relação do peso total do fígado (g) no dia do sacrifício e do peso do rato (g) no mesmo momento entre os grupos no período 24 horas; porcentagem de regeneração do fígado pela fórmula de Kwon entre os grupos no período 24 horas; porcentagem do Ki-67 dentro do grupo Sirolimus. Em todos os testes estatísticos o nível de significância adotado foi  $p < 0,05$ .

## 4 RESULTADOS

### 4.1 PESO DOS RATOS

Houve perda ponderal significativa nos grupos e subgrupos comparando-se o peso inicial com o peso no dia da morte dos ratos (Gráfico 1).



**Gráfico 1** – Média dos pesos inicial e na morte de cada grupo. GC<sub>24h</sub>: grupo controle 24 horas; GC<sub>7d</sub>: grupo controle sete dias; GE<sub>24h</sub>: grupo de estudo 24 horas e GE<sub>7d</sub>: grupo de estudo sete dias. Comparação estatística entre os grupos (p).

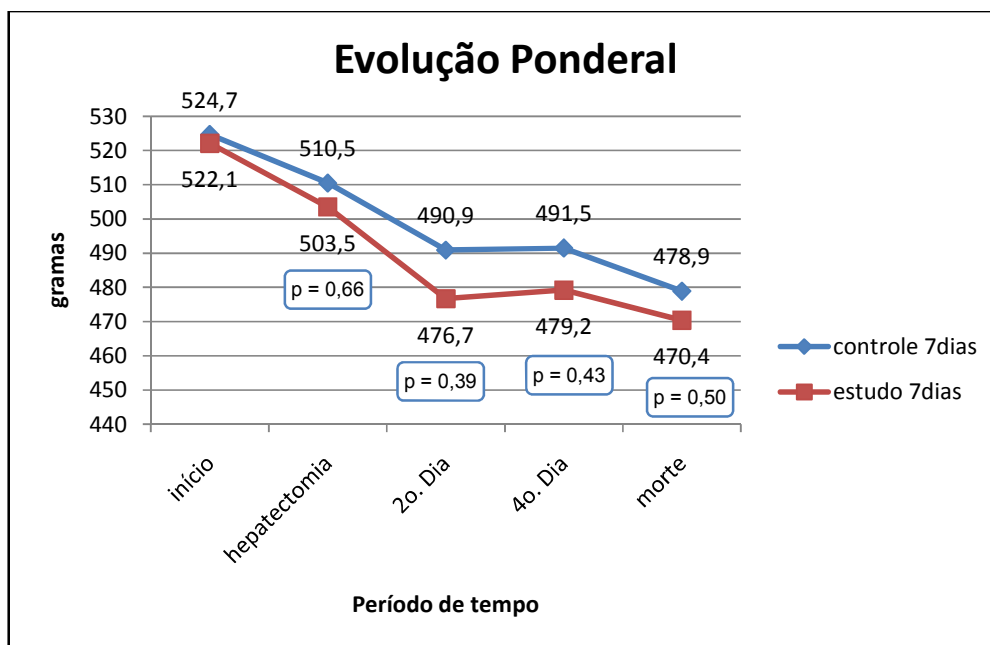
Na comparação dos pesos dos ratos no dia do início, no dia da hepatectomia e no dia da morte entre os grupos de estudo e controle, não houve variação estatisticamente significativa (Tabela 1).

**Tabela 1** – Análise estatística comparando o grupo controle X estudo, utilizando as médias do peso corporal inicial, no dia da hepatectomia e no dia da morte nos períodos de 24 horas e sete dias.

GRUPOS	INICIAL (g)			HEPATECTOMIA (g)			MORTE (g)		
	média	dp	p	média	dp	p	média	dp	p
Controle 24 h	495,4	± 36,8	0,48	476,1	± 33,7	0,60	458,9	± 30,6	0,68
Estudo 24 h	506,0	± 27,7		484,0	± 32,9		464,6	± 29,4	
Controle sete dias	524,7	± 23,0	0,87	510,5	± 24,6	0,66	478,9	± 25,9	0,50
Estudo sete dias	522,1	± 44,5		503,5	± 43,8		470,4	± 37,8	

Nota: dp – desvio-padrão, p – nível de significância estatística

Com relação aos grupos analisados por sete dias, foram realizadas aferições de peso corporal chamadas de intermediárias, ou seja, no segundo e quarto dias após a hepatectomia 70%. Ao compararmos os grupos controle com o estudo na evolução ponderal dos pesos inicial (três dias precedentes), na hepatectomia (dia 0), no 2ºPO, no 4ºPO e na morte (7º dia), não houve variação estatisticamente significativa (Gráfico 2).



**Gráfico 2** – Evolução ponderal nos grupos controle e estudo ao longo da pesquisa. Comparação estatística entre os grupos (p).

## 4.2 PESO DO FÍGADO

No momento da hepatectomia 70%, comparando-se os pesos do fígado ressecado, do fígado estimado restante e do peso total hepático entre os grupos controle e de estudo, nenhum apresentou diferença estatisticamente significativa (Tabela 2).

**Tabela 2** – Análise estatística das médias do peso do fígado ressecado, peso estimado do fígado restante e do peso total estimado do fígado no dia da hepatectomia entre os grupos controle e estudo nos períodos de 24 horas e sete dias.

GRUPOS	RESSECADO (g)			REST ESTIMADO (g)			TOTAL ESTIMADO (g)		
	média	dp	p	média	dp	p	média	dp	p
Controle 24 horas	8,7	± 0,9	0,71	3,7	± 0,4	0,63	12,4	± 1,3	0,74
Estudo 24 horas	8,9	± 1,2		3,8	± 0,5		12,7	± 1,7	
Controle sete dias	8,9	± 1,0	0,79	3,8	± 0,4	0,84	12,7	± 1,5	0,81
Estudo sete dias	9,0	± 1,1		3,9	± 0,5		12,9	± 1,5	

Nota: dp – desvio-padrão, p – nível de significância estatística, rest – restante

Analisando-se o peso estimado do fígado em relação ao peso corporal do rato no dia da hepatectomia, comparando entre os grupos 24 horas e sete dias, não houve alteração estatística (Tabela 3).

**Tabela 3** – Análise estatística das médias da relação do peso total estimado do fígado no dia da hepatectomia e do peso do rato no mesmo momento entre os grupos controle e estudo nos períodos de 24 horas e sete dias.

GRUPOS	RELAÇÃO DO PESO DO FÍGADO (g) / PESO DO RATO (g)			
	min - max	média	dp	p
Controle 24 horas	0,0246 - 0,0297	0,0261	0,0017	0,95
Estudo 24 horas	0,0232 - 0,0316	0,0262	0,0030	
Controle sete dias	0,0222 - 0,0278	0,0249	0,0018	0,41
Estudo sete dias	0,0233 - 0,0293	0,0255	0,0019	

Nota: min-max - valor mínimo e máximo, dp – desvio-padrão, p – nível de significância estatística

No momento da morte do rato, comparando-se o peso do fígado regenerado/ressecado entre os grupos controle e de estudo, nenhum apresentou diferença estatisticamente significativa (Tabela 4).

**Tabela 4** – Análise estatística das médias do peso do fígado no dia da morte entre os grupos controle e de estudo nos períodos de 24 horas e sete dias.

GRUPOS	PESO DO FÍGADO (g) NO DIA DA MORTE			
	min - max	Média	dp	p
Controle 24 horas	6,4 - 8,3	7,3	0,6	0,83
Estudo 24 horas	6,0 - 9,8	7,2	1,2	
Controle sete dias	8,7 - 11,8	9,9	0,9	0,70
Estudo sete dias	8,0 - 11,7	9,7	1,0	

Nota: min-max - valor mínimo e máximo, dp – desvio-padrão, p – nível de significância estatística

Analisando-se o peso do fígado regenerado/ressecado em relação ao peso corporal do rato no dia da morte, comparando entre os grupos 24 horas e sete dias, não houve alteração estatística (Tabela 5).

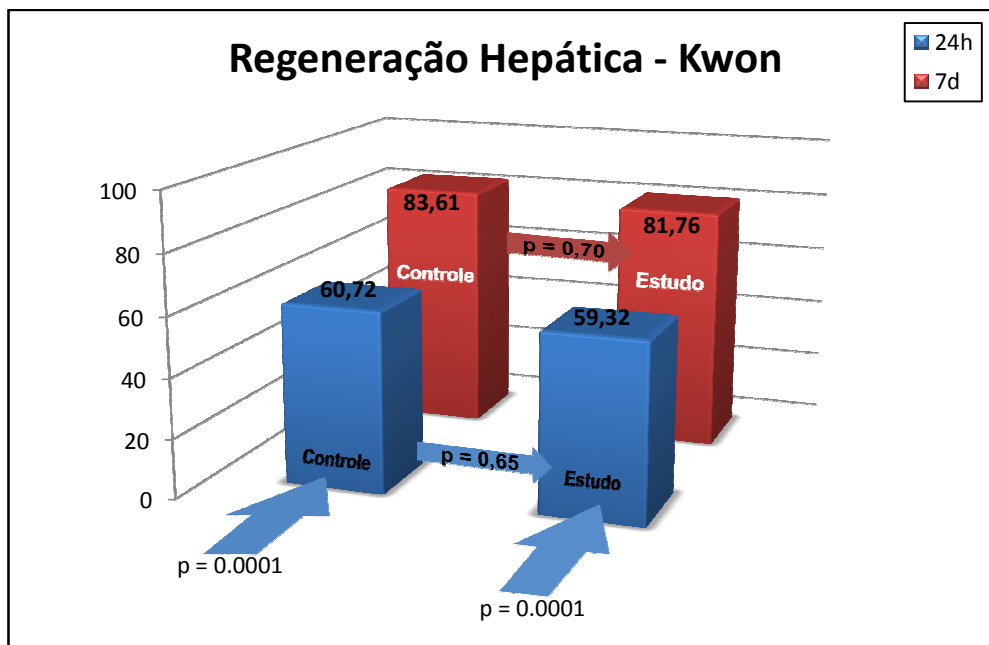
**Tabela 5** – Análise estatística das médias da relação do peso total do fígado no dia da morte do rato e do peso corporal no mesmo momento entre os grupos controle e de estudo nos períodos de 24 horas e sete dias.

GRUPOS	RELAÇÃO DO PESO DO FÍGADO (g) / PESO DO RATO (g)			
	min - max	Média	dp	p
Controle 24 horas	0,0143 - 0,0174	0,0159	0,0010	0,47
Estudo 24 horas	0,0129 - 0,0189	0,0153	0,0020	
Controle sete dias	0,0176 - 0,0249	0,0207	0,0022	0,97
Estudo sete dias	0,0187 - 0,0247	0,0207	0,0020	

Nota: min-max - valor mínimo e máximo, dp – desvio-padrão, p – nível de significância estatística

### 4.3 REGENERAÇÃO HEPÁTICA PELA FÓRMULA DE KWON

A regeneração hepática avaliada pela fórmula de Kwon mostrou crescimento estatisticamente significativo do remanescente hepático nos dois grupos, nas primeiras 24 horas e no sétimo dia após a hepatectomia. Na comparação entre os grupos controle com os grupos de estudo, não houve variação estatisticamente significativa (Gráfico 3).

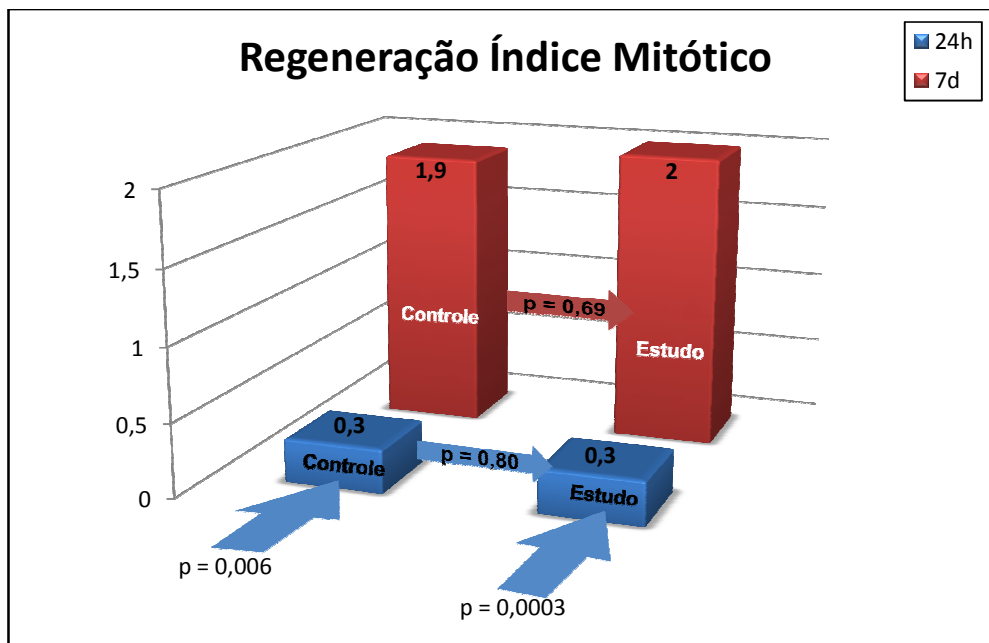


**Gráfico 3** – Avaliação da porcentagem da regeneração hepática pela fórmula de Kwon. Comparação estatística entre os grupos de estudo e controle nos períodos de 24 horas e sete dias. Em azul os grupos de 24 horas e em vermelho os grupos de sete dias. Comparação estatística entre os grupos (p).



#### 4.4 REGENERAÇÃO HEPÁTICA PELO ÍNDICE MITÓTICO

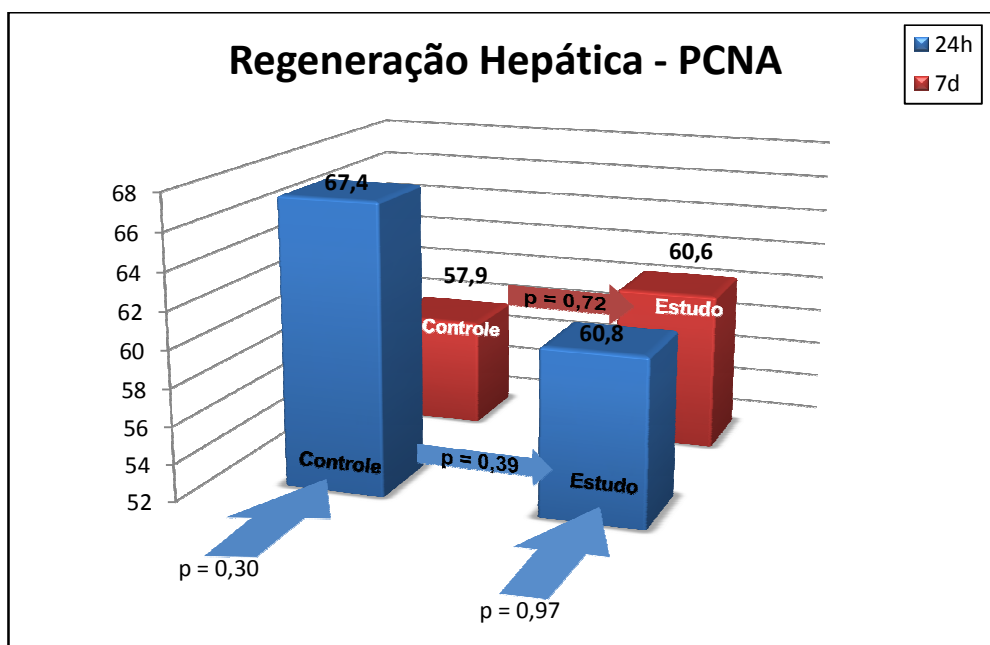
Na avaliação do índice mitótico pela coloração de Hematoxilina-Eosina (HE), houve diferença estatística entre os grupos de estudo 24 horas e sete dias e entre os grupos controle 24 horas e sete dias. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle e de estudo do mesmo período (Gráfico 4).



**Gráfico 4** – Avaliação da regeneração hepática pelo índice mitótico. Comparação estatística entre os grupos de estudo e controle nos períodos de 24 horas e sete dias. Em azul os grupos de 24 horas e em vermelho os grupos de sete dias. Comparação estatística entre os grupos (p).

#### 4.5 REGENERAÇÃO HEPÁTICA PELO PCNA

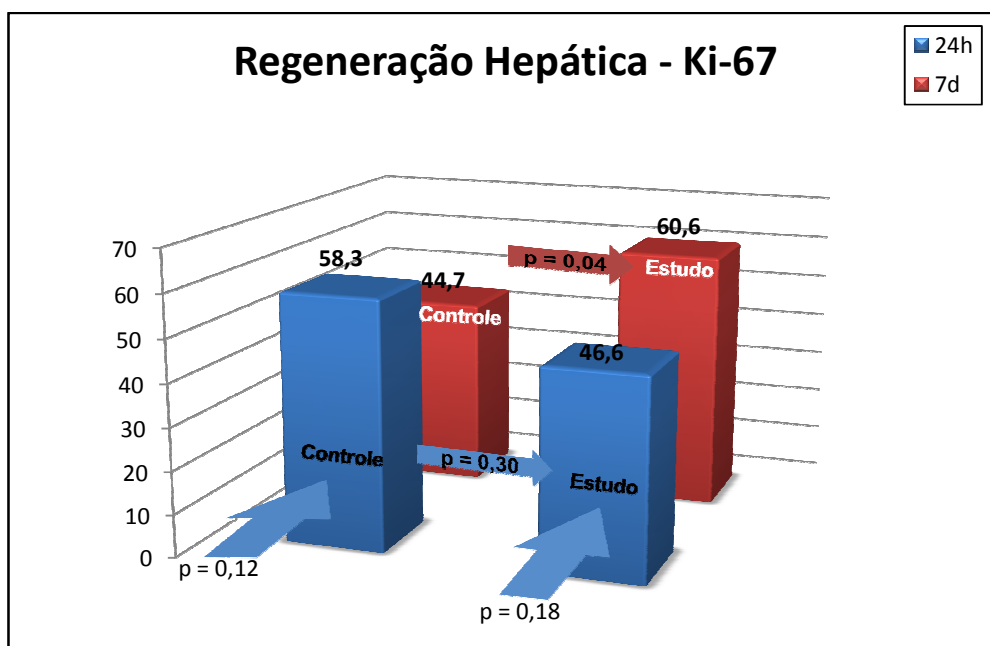
Na avaliação da proliferação celular pelo antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos (Gráfico 5).



**Gráfico 5** - Avaliação da porcentagem da regeneração hepática pelo PCNA. Comparação estatística entre os grupos de estudo e controle nos períodos de 24 horas e sete dias. Em azul os grupos de 24 horas e em vermelho os grupos de sete dias. Comparação estatística entre os grupos (p).

#### 4.6 REGENERAÇÃO HEPÁTICA PELO Ki-67

Na avaliação da proliferação celular pelo antígeno Ki-67 não houve diferença estatística entre os grupos de estudo 24 horas e sete dias entre os grupos controle 24 horas e sete dias e entre o grupo controle 24 horas e estudo 24 horas. No entanto, houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle sete dias e estudo sete dias ( $p=0,04$ ) (Gráfico 6).



**Gráfico 6** - Avaliação da porcentagem da regeneração hepática pelo Ki-67. Comparação estatística entre os grupos de estudo e controle nos períodos de 24 horas e sete dias. Em azul os grupos de 24 horas e em vermelho os grupos de sete dias. Comparação estatística entre os grupos (p).

## 5. DISCUSSÃO

Para a análise dos efeitos na regeneração hepática no rato sob administração de sirolimus, foi escolhido um modelo de proliferação celular já bem conhecido. A maioria dos estudos sobre regeneração hepática *in vivo* é realizada através da ressecção de parte do fígado de ratos e posterior avaliação do fenômeno regenerativo. O modelo utilizado foi proposto por HIGGINS e ANDERSON em 1931, no qual se realiza a retirada de 70% do fígado através da ressecção dos lobos mediano e lateral esquerdo. Este modelo é relativamente simples de ser reproduzido, apresenta baixo custo e não necessita de estrutura elaborada e tecnicamente sofisticada para sua realização.

Os ratos utilizados neste estudo foram considerados plenamente desenvolvidos, apresentando peso acima de 350 gramas. Ao utilizar ratos adultos, podemos analisar o fenômeno da regeneração hepática na ausência dos estímulos de crescimento do organismo, excluindo-se os mecanismos gerais e específicos que poderiam estar em atividade induzindo a divisão celular em vários tecidos e órgãos.

Nos grupos de estudo utilizou-se a pré-terapia com sirolimus desde o terceiro dia pré-operatório até a morte dos animais em 24 horas ou sete dias após a ressecção hepática. O uso da pré-terapia ocasiona a presença do sirolimus no organismo no momento da hepatectomia, o que é importante para avaliar a influência da droga nos minutos seguintes a ressecção hepática. Esta estratégia é fundamental na avaliação da regeneração hepática em ratos, pois os processos iniciam-se rapidamente, em minutos, e a maioria das modificações fundamentais são estabelecidas no prazo de 24 horas.

A dose necessária e a via de administração de sirolimus relatado em literatura foram diversas como citado em vários trabalhos. Dahmen *et al.* (2002) aplicaram sirolimus por gavagem na dose de 2,5mg/kg/d no dia anterior e até dois dias após a hepatectomia, já Kirimlioglu *et al* (2006) aplicaram a mesma dose por via subcutânea no mesmo período. Chavéz *et al.*, (1999) administraram sirolimus por via intra muscular na dose de 2mg/kg/dia três dias precedentes a hepatectomia e até o dia do sacrifício, no sétimo dia. Francavilla *et al.* (1992) administraram por via intra muscular 0,1 mg/kg/dia, 0,3 mg/kg/dia e 1mg/kg/dia em ratos, quatro dias precedentes e até 24 horas após hepatectomia de 70%. Devido à comprovada

eficácia e biodisponibilidade desta droga por via oral quando utilizada em dose única diária, a administração do sirolimus foi realizada por via oral, em dose única de 1mg/Kg/dia. Utilizando este método foi garantida a administração da dose calculada para cada animal.

Os quatro grupos apresentaram diminuição do peso corporal desde o início da gavagem até a data da morte de maneira estatisticamente significativa. Esta diminuição do peso corpóreo pode estar relacionada ao estresse causado pelo manuseio dos ratos e à agressão cirúrgica sofrida no período. Nas comparações entre os grupos de 24 horas (**GC<sub>24h</sub>** X **GE<sub>24h</sub>**) e sete dias (**GC<sub>7d</sub>** X **GE<sub>7d</sub>**), avaliando-se as médias do peso inicial, da hepatectomia e do dia da morte, não se verificou variação estatisticamente significativa. Quando analisamos o grupo de sete dias, mensurando os pesos no segundo e quarto dia após a hepatectomia parcial, também não houve alteração estatística entre o grupo de estudo e controle. Estes dados estatísticos demonstram não haver influência da droga na evolução ponderal nos grupos citados.

Na hepatectomia de 70%, analisaram-se as médias do peso do fígado ressecado, do valor estimado do fígado restante e do peso total do fígado. Foram comparados os grupos de estudo e controle e não se encontrou diferença estatística significativa. Analisou-se o peso total do fígado estimado no momento da hepatectomia em relação ao peso corporal do rato, encontrou-se um valor médio que foi comparado entre os grupos de estudo e controle. Não houve alterações estatísticas significantes quando comparado os grupos 24 horas de estudo com o de controle e quando comparados os grupos sete dias de estudo com o de controle. Estes dados sugerem que a pré-terapia com sirolimus não influenciou na massa hepática e na sua proporcionalidade em relação ao peso corpóreo nos ratos.

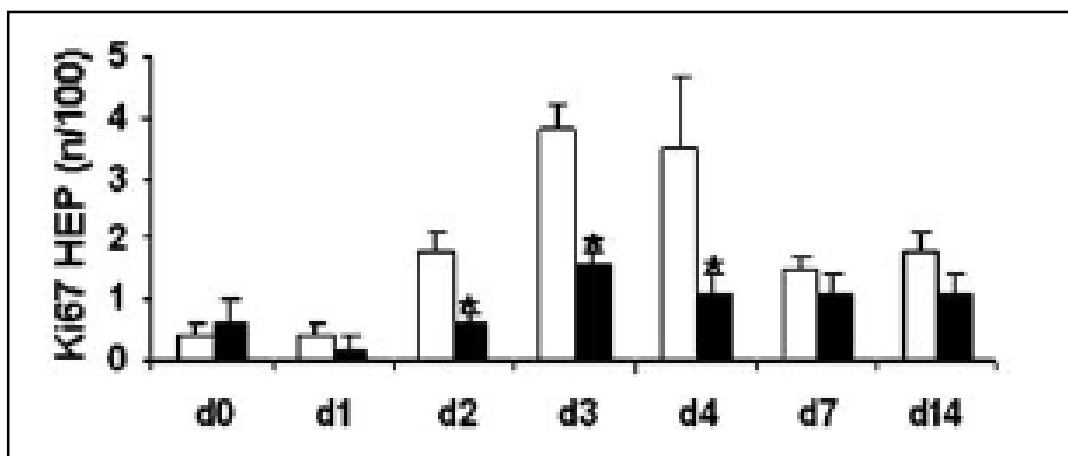
Na morte do rato, foi retirado o fígado regenerado e analisado o seu peso comparando os grupos de estudo e de controle. Não houve alteração estatística entre o grupo 24 horas (**GC<sub>24h</sub>** X **GE<sub>24h</sub>**) e nem entre o grupo sete dias (**GC<sub>7d</sub>** X **GE<sub>7d</sub>**). Quando foi utilizada a relação do peso do fígado com o peso do rato na morte, também não houve alterações estatísticas significantes. Estes dados permitem sugerir que o uso do sirolimus não influenciou na regeneração nos grupos de estudo nem alterou a proporção massa hepática com o peso corpóreo do rato.

A fórmula descrita por Kwon (1990) avalia a porcentagem da regeneração hepática, ou seja, quanto o fígado regenerou nos grupos 24 horas e sete dias. Ao comparar os valores percentuais da regeneração pela fórmula de Kwon entre cada grupo, observa-se aumento significativo da taxa de regeneração nos grupos controle (**GC<sub>24h</sub>** X **GC<sub>7d</sub>**) e estudo (**GE<sub>24h</sub>** X **GE<sub>7d</sub>**) ao longo do tempo. O grupo **controle 24 horas (GC<sub>24h</sub>)** apresentou 60,72% e o grupo **controle sete dias (GC<sub>7d</sub>)** 83,61% ( $p=0,0001$ ), enquanto o grupo de **estudo 24 horas (GE<sub>24h</sub>)** apresentou 59,32% e o grupo de **estudo sete dias (GE<sub>7d</sub>)** 81,76% ( $p=0,0001$ ). Como relatado por Labrecque (1994), Ramalho (1993) e Fausto (2002), a fase G<sub>2</sub>, a mitose, acontece em 22–24 horas após a ressecção hepática, atingindo um pico em 32 a 34 horas após a cirurgia. Além disso, ciclos adicionais de síntese do DNA podem ser detectados dias após hepatectomia parcial (MICHALOUPoulos, 2007) justificando o aumento percentual da regeneração hepática pela fórmula de Kwon entre os grupos de estudo e controle. Entretanto, quando comparados os grupos 24 horas (**GC<sub>24h</sub>** X **GE<sub>24h</sub>**) e os grupos sete dias (**GC<sub>7d</sub>** X **GE<sub>7d</sub>**) não houve diferença estatisticamente significativa ( $p=0,65$  e  $0,70$  respectivamente). Estes dados sugerem não haver influência do sirolimus no processo regenerativo quando utilizamos como parâmetro a fórmula de Kwon.

Na literatura consultada sobre a influência do sirolimus na regeneração hepática, Dahmen *et al.* (2002) usando a dose de 2,5mg/kg/d em um modelo de falência hepática com a ressecção de 90% do fígado de ratos, demonstraram que a droga ocasionou diminuição da regeneração hepática. Kirimlioglu *et al.* (2006) administrando a dose de 2,5mg/kg/d no modelo padrão de hepatectomia de 70% em ratos, demonstraram que o sirolimus resulta em inibição da regeneração hepática. Chavéz *et al.* (1999), realizando hepatectomia de 70% em ratos, demonstraram que o sirolimus na dose de 2mg/kg/d não interfere na regeneração hepática. Francavilla *et al.* (1991) demonstraram que na dose de 1mg/kg/dia a regeneração hepática é significativamente inibida pelo sirolimus, atingindo também a regeneração em outros órgãos como rins e intestino, demonstrando que o sirolimus é um inibidor do crescimento não específico para o fígado.

No estudo realizado por Palmes *et al.* (2007) o sirolimus foi administrado em uma dose inicial de 6 mg/kg em “bolus” e posteriormente com 2 mg/kg/d. Foram utilizados 196 ratos onde realizou-se a hepatectomia de 70% no grupo de estudo.

Foi demonstrado que o sirolimus não interferiu na sobrevivência dos ratos após ressecção hepática, no entanto inibiu a proliferação celular principalmente no segundo, terceiro e quarto dias, onde a diferença estatística comparado com o grupo controle foi significativa ( $p < 0,05$ ) (figura 22).



**Figura 21** – Gráfico representando a variação na regeneração em ratos submetidos à hepatectomia 70% usando sirolimus (coluna preta) e não usando sirolimus (coluna branca). \* representa variação estatística significativa ( $p < 0,05$ ). FONTE: PALMES *et al.*, 2007)

No presente trabalho, a regeneração hepática também foi avaliada pelo índice mitótico e análise imunohistoquímica com os marcadores PCNA e Ki-67.

No estudo, a análise estatística do índice mitótico foi significativa apenas quando comparados os grupos controles e de estudo entre si ( $p = 0,006$  e  $p = 0,0003$  respectivamente). Quando comparados os grupos no mesmo período (**GC<sub>24h</sub>** X **GE<sub>24h</sub>** e **GC<sub>7d</sub>** X **GE<sub>7d</sub>**), não houve diferença estatística. Estes dados sugerem não haver influência do sirolimus na regeneração hepática utilizando a contagem de figuras de mitose pelo HE.

Existem vários métodos de quantificação da regeneração hepática, sendo que um dos mais utilizados é baseado no uso de anticorpos de moléculas teciduais endógenas como o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA). Assy *et al.* (1998) utilizaram o PCNA para avaliar a regeneração hepática em ratos submetidos à hepatectomia de 70% e observaram valores significantes em 24, 36, 48 e 72 horas após a ressecção hepática ( $p < 0,05$ ). No presente estudo, foram analisados os dados entre os grupos no mesmo período (**GC<sub>24h</sub>** X **GE<sub>24h</sub>** e **GC<sub>7d</sub>** X **GE<sub>7d</sub>**) e entre os grupos controle e estudo (**GC<sub>24h</sub>** X **GC<sub>7d</sub>** e **GE<sub>24h</sub>** X **GE<sub>7d</sub>**) utilizando o PCNA e não houve diferença estatística significativa. Estes dados são semelhantes ao estudo

realizado por Chavéz *et al.* (1999) que não demonstrou interferência na regeneração hepática pelo sirolimus. Quando analisado os grupos controle, comparando-se **GC<sub>24h</sub>** X **GC<sub>7d</sub>**, verifica-se uma diminuição percentual nos hepatócitos positivos para PCNA com a evolução do período ( $p=0,30$ ). Esta diminuição, mesmo que estatisticamente não significativa, deve-se ao fato de que a maior proliferação dos hepatócitos ocorrer próximo as primeiras 24 horas após a hepatectomia. Ao final dos sete dias, os núcleos não apresentam a cromatina organizada dentro de uma carioteca íntegra e o produto que é detectado pela imunohistoquímica se dispersa no citoplasma impossibilitando a positividade dos mesmos. Deve-se considerar que no grupo de estudo, quando comparado o período de 24 horas com o de sete dias, foi encontrado um número percentual semelhante de hepatócitos corados pelo PCNA ( $p=0,97$ ).

O índice do Ki-67 (percentual de células marcadas/total de células avaliadas) tem sido utilizado para quantificar a atividade proliferativa de determinado tumor ou tecido, verificando o percentual de células fora do período  $G_0$ . Não houve diferença significativa ao se comparar os dois grupos de 24 horas (**GC<sub>24h</sub>** X **GE<sub>24h</sub>**). Na pesquisa houve diferença estatisticamente significativa ao comparar os grupos no período de sete dias (**GC<sub>7d</sub>** X **GE<sub>7d</sub>**) com  **$p=0,04$** . O grupo de estudo de sete dias apresentou maior percentual de hepatócitos marcados quando comparado com o grupo controle de sete dias, demonstrando um maior número de hepatócitos fora do período  $G_0$  no grupo que usou sirolimus. Este dado poderia sugerir um estímulo na regeneração hepática, entretanto, o pico da produção de DNA seguido da mitose acontece precocemente, e mesmo que ocorram picos subseqüentes, estes são de menor intensidade e não refletem grande variação no percentual regenerativo. No estudo realizado por Palmes *et al.* (2007), com metodologia semelhante ao presente estudo, não foi verificada variação estatística no grupo de sete dias quando utilizado como parâmetro o Ki-67, no entanto, foi verificada variação estatística significativa na análise do fígado no segundo, terceiro e quarto dias. Este estímulo da proliferação celular no fígado, demonstrando um maior número de hepatócitos fora do período  $G_0$ , pode estar relacionado com a inibição das células natural killer durante o processo regenerativo. Como relatado por Tamura *et al.* (1998), o FK506 poderia promover a regeneração hepática por inibir a atividade das células natural killer. A mesma hipótese poderia ser usada para o sirolimus, visto que apresenta



estrutura molecular semelhante ao FK506. Nesse contexto, o sirolimus ao inibir a atividade da mTOR e a sua via de proliferação celular resultaria também em inibição do sistema imune. A diminuição da atividade hepatolítica das células natural killer, por um efeito somatório, resultaria em uma maior regeneração hepática.

Ao se comparar os grupos de estudo (**GE<sub>24h</sub>** X **GE<sub>7d</sub>**) e controle (**GC<sub>24h</sub>** X **GC<sub>7d</sub>**) utilizando o Ki-67, não houve diferença estatística ( $p=0,18$  e  $p=0,12$  respectivamente).

Ao realizar-se o presente estudo, utilizando parâmetros como o peso do fígado regenerado, índice mitótico e análise imunohistoquímica, não foram verificados influência na regeneração hepática nos grupos que utilizaram o sirolimus exceto na análise com Ki-67, a qual demonstrou uma maior regeneração. Deve-se ressaltar que várias pesquisas, já citadas anteriormente, demonstraram o efeito antiproliferativo do sirolimus impedindo a correta regeneração hepática. Novos estudos devem ser realizados tentando diferenciar e entender a influência do sirolimus nos mecanismos imunes do fígado, sua influência nas células de defesa e qual a repercussão deste fato na atividade regenerativa. Várias pesquisas estão nessa linha, tentando elucidar a relação entre o sistema imune hepático, o processo regenerativo e as drogas que podem estar influenciando ambos os processos.

## 6. CONCLUSÕES

- Na avaliação da massa hepática regenerada pela fórmula de Kwon não foi verificada interferência do sirolimus na regeneração hepática;
- Utilizando o índice mitótico observado em histologia convencional com hematoxilina e eosina após a hepatectomia 70%, não houve caracterização de interferência negativa ou positiva do sirolimus entre os momentos 24 horas e 7 dias;
- Pelos métodos imunohistoquímicos utilizados, o marcador Ki-67 mostra efeito promotor adicional do sirolimus na regeneração hepática, efeito não demonstrado pelo marcador PCNA;
- Em comparação correlacionada dos resultados obtidos no âmbito deste estudo, não há evidência de efeito negativo sobre a regeneração hepática e há evidência de provável efeito favorecedor do sirolimus sobre a regeneração hepática a ser analisado mais profundamente em pesquisas posteriores.

## 7. REFERÊNCIAS

ASSY, N.; MINUK, G. Y. **Liver Regeneration: Methods for Monitoring their Applications.** Journal of Hepatology, Copenhagen, v. 26, n. 4, p. 945-952, 1997.

ASSY, N.; GONG, Y.; ZHANG, M.; PETTIGREW, N. M.; PASHNIAK, D.; MINUK, G. Y. **Use of proliferating cell nuclear antigen as a marker of liver regeneration after partial hepatectomy in rats.** J. Lab. Clin. Med., St. Louis, v. 131, n. 3, p. 251-256, 1998.

BEN-IZHAK, O.; BAR-CHANA, M.; SUSSMAN, L.; DOBINER, V.; SANDBANK, J.; CAGNANO, M.; COHEN, H.; SABO, E. **Ki67 antigen and PCNA proliferation markers predict survival in anorectal malignant melanoma.** Histopathology, v. 41, p. 519-525, 2002.

BIECKER, E.; GOTTARDI, A. de.; NEEF, M.; UNTERNÄHRER, M.; SCHNEIDER, V.; LEDERMANN, M.; SÄGESSER, H.; SHAW, S.; REICHEN, J. **Long-term treatment of bile duct-ligated rats with rapamycin (sirolimus) significantly attenuates liver fibrosis: analysis of the underlying mechanisms.** The Journal of pharmacology and experimental therapeutics, v. 313, n.3, p. 952-961, 2005.

BIONDO-SIMÕES, M. de. L. P.; GRECA, F. H.; SMANIOTTO, G. H.; TECHY, F.; SOARES, D. de. P.; KANNENBERG, C.; CASTRO, C. C. de. L.; VASCONCELOS, C. N. de. **Efeito da histamina na regeneração hepática estudo experimental em ratos.** Acta cirúrgica brasileira, v. 15, n.1, mar. 2000.

BRAVO, R.; FRANK, R.; BLUNDELL, P. A.; BRAVO, H. M. **Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase delta.** Nature, v. 326, p. 515-517, apr.1987.

BROWN, D. C.; GATTER, K. C. **Ki-67 protein: the immaculate deception?** Histopathology, Oxford, v. 40, n. 1, p. 2-11, 2002.

BUCHER, N. L. R.; SWAFFIELD, M. N. **The rate of incorporation of labeled thymidine into the deoxyribonucleic acid of regenerating rat liver in relation to the amount of liver excised.** Cancer Reserch, v. 24, p. 1611-1625, 1964.

CHÁVES, R.; JAMIESON, N.; TAKAMORI, S.; NIVATVONGS, S.; PINO, G.; METCALFE, A.; WATSON, C.; ROMERO, D.; METCALFE, S. **Hepatotropic effect of cyclosporine and FK 506 is not mimicked by Rapamycin.** Transplantation proceedings, v. 31, p. 2429, 1999.

COELHO, J. C. U. Aparelho Digestivo – Clínica e Cirurgia. 3ª. edição. São Paulo: Editora Atheneu, 2005. cap. 95.

CORMACK, H. D. Ham's Histologia. 9ª. edição. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1991. P. 408-410

COURT, F. G.; HOLDEN-WEMYSS, S. A.; DENNISON, A. R.; MADDERN, G. J. **The mystery of liver regeneration.** British Journal of Surgery, v. 89, p. 1089-1095, 2002.

DAHMEN, U.; GU, Y. L.; SHEN, K.; DIRSCH, O.; LI, J.; FAN, L. M.; BROELSCH, C. E. **Onset of liver regeneration after subtotal resection is inhibited by the use of new immunosuppressive drugs.** Transplantation proceedings, v. 34, p. 2312-2313, 2002.

DENTON, M. D.; MAGEE C. C.; SAYEGH M. H. **Immunosuppressive strategies in transplantation.** The lancet. v. 353, p.1083-91, mar.1999.

DONG, Z.; WEI, H.; SUN, R.; TIAN, Z. **The roles of innate immune cells in liver injury and regeneration.** Cellular & Molecular Immunology. v. 4, n. 4, p. 241-250, august 2007.

FABRICANT, J. I. **The kinetics of cellular proliferation in regenerating liver.** Journal of Cell Biol, v. 36, p. 551-565, 1968.

FAUSTO, N. **Hepatic regeneration.** In: ZAKIM, D.; BOYER T. D. 2. ed. Hepatology: A Textbook of Liver Disease. Philadelphia: WB Saunders, 1990, v. 1, 2, p. 49-65.

FAUSTO, N. **Involvement of the innate immune system in liver regeneration and injury.** Journal of Hepatology, v.45, p.347-349, 2006.

FAUSTO, N.; RIEHLE, K. J. **Mechanisms of liver regeneration and their clinical implications.** J. Hepatobiliary Pancreat. Surg., Tokyo, v. 12, p. 181-189, 2005.

FAUSTO N. **Liver regeneration.** Journal of Hepatology, v. 32, n. 19, p. 1477-1487, 2002.

FAUSTO, N. **Liver regeneration: from laboratory to clinic.** Liver transplantation, v.7, n.10, p. 835-844, oct. 2001.

FRANCAVILLA, A.; STARZL, T. E.; CARR, B.; AZZARONE, A.; CARRIERI, G.; ZENG, Q.; PORTER, K. A. **The effects of FK 506, cyclosporine and rapamycin on liver growth in vitro and in vivo.** Transplant. Proc., New York, v. 23, p. 2817-2820, 1991.

FRANCAVILLA, A.; STARZL, T. E., SCOTTI, C.; CARRIERI, G.; AZZARONE, A.; ZENG, Q. H. **Inhibition of liver, kidney, and intestine regeneration by Rapamycin.** Transplantation, v. 53, n. 2, p.496-498, feb. 1992.

FRANCAVILLA, A. et al. **Hepatocyte proliferation and gene expression induced by triiodothyronine in vivo and in vitro.** Hepatology, Baltimore, v. 20, p. 1237-1241, 1994.

FRANCAVILLA, A.; VUJANOVIC, N. L.; POLIMENO, L.; AZZARONE, A.; IACOBELLIS, A.; DELEO, A.; HAGIYA, M.; WHITESIDE, T. L.; STARZL, T. E. **The in vivo effect of hepatotrophic factors augments liver regeneration, hepatocyte growth factor, and insulin-like growth factor-II on liver natural killer cell functions.** Hepatology, v. 25, n. 2, p. 411-415, 1997.

FRUMAN, D. A.; WOOD, M. A.; GJERTSON, C. K.; KATZ, H. R.; BURAKOFF, S. J.; BIERER, B. E. **FK506 binding protein 12 mediates sensitivity to both FK506 and rapamycin in murine mast cells.** Eur Journal of Immunology, v. 25, p. 563-571, 1995.

GAUB, J.; IVERSEN, J. **Rat liver regeneration after 90% partial hepatectomy.** Hepatology, v. 4, n. 5, p. 902-904, 1984.

GOGGIN, M. M.; NELSEN, C. J.; KIMBALL, S. R.; JEFFERSON, L. S.; MORLEY, S. J.; ALBRECHT, J. H. **Rapamycin-sensitive induction of eukaryotic initiation factor 4F in regenerating mouse liver.** Hepatology, v. 40, n. 3, p. 537-544, sept. 2004.

GOVE, C. D.; HUGHES, R. D. **Liver regeneration in relationship to acute liver failure.** Gut, Suppl, 92-96, 1991.

HATA, S.; NAMAIE, M.; NISHINA, H. **Liver development and regeneration: From laboratory study to clinical therapy.** Journal compilation 2007 Japanese Society of Developmental Biologist, v. 49, p. 163-170, 2007.

HIDALGO, M, ROWINSKY, E.K. **The Rapamycin-sensitive signal transduction pathway as a target for cancer therapy.** Oncogene. v.19, p. 6680-6686, 2000.

HIGASHIYAMA, H.; YAMAGUCHI, T.; MORI, K.; NAKANO, Y.; YOKOYAMA, T.; TAKEUCHI, T.; YAMAMOTO, N.; YAMAOKA, Y.; TANAKA, K.; KUMADA, K.; OZAWA, K. **Graft size assessment by preoperative computed tomography in living related partial liver transplantation.** British Journal of Surgery, v. 80, p. 489-492, 1993.

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

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

JIANG, Y. P.; BALLOU, L. M.; LIN, R. Z. **Rapamycin-insensitive Regulation of 4E-BP1 in Regeneration Rat Liver.** The Journal of Biological Chemistry, v. 276, n. 14, p. 10943-10951, 2001.

KALIL, A. N.; COELHO, J. C. U.; STRAUSS, E. **Fígado e vias biliares: clínica e cirurgia.** Rio de Janeiro: Revinter, 2001.

KHAN, A. Z.; MUDAN, S. S. **Liver regeneration: mechanisms, mysteries and more.** ANZ Journal surgery, v. 77, p. 9-14, 2007.

KIRIMLIOGLU, H.; KIRIMLIOGLU, V.; YILMAZ, S.; COBAN, S.; TURKMEN, E.; ARA, C. **Liver pathology and cell proliferation after calcineurin inhibitors and antiproliferative drugs following partial hepatectomy in rats.** Transplantation proceedings, v. 38, p. 622-626, 2006.

KONIARIS, L. G.; MCKILLOP, I.; SCWARTZ, S. I.; ZIMMERS, T. A. **Liver regeneration.** Journal of the American college surgeons, v.197, n.4, p. 634-648, oct.2003.

KWON, A. H.; et al. **Effect of administration of fibonectin or aprotinin on liver regeneration after experimental hepatectomy.** Ann Surg, v. 211, p. 295-300, 1990.

LaBRECQUE, D. **Liver regeneration:** a picture emerges from the puzzle. The American Journal of Gastroenterology, v.89, n.8, p.86-96, may.1994.

LAMPEN, A., ZHANG, Y., HACKBARTH, I., BENET, Z. L., SEWING, K., CHRISTIANS, U. **Metabolism and Transport of the Macrolide Immunosuppressant Sirolimus in the Small Intestine.** The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. v. 285, n. 3, p. 1104-1112, 1998.

LIU, C.; SCHREITER, T.; FRILLING, A.; DAHMEN, U.; BROELSCH, C. E.; GERKEN, G.; TREICHEL, U. **Cyclosporine A, FK-506, 40-0-[2-hydroxyethyl] rapamycin and mycophenolate mofetil inhibit proliferation of human intrahepatic biliary epithelial cells in vitro.** World Journal of Gastroenterology, v. 11, n. 948, p. 7602-7605, 2005.

MADRAHIMOV, N.; DIRSCH, O.; BROELSCH, C.; DAHMEN, U. **Marginal hepatectomy in the rat from anatomy to surgery.** Annals of surgery, v.244, n.1, p.89-98, july. 2006.

MARTINS, P. N. A.; THERUVATH, T. P.; NEUHAUS, P. **Rodent models of partial hepatectomies.** Liver Int., Oxford, p. 3-9, 2007.

MICHALOPOULOS, G. K. **Liver regeneration.** Journal of cellular Physiology, v. 213, p. 286-300, 2007.

MICHALOPOULOS, G. K.; DEFRANCES, M. C. **Liver regeneration.** Science, v. 276, p. 35-55, 1997.

MICHALOPOULOS, G. K. **Liver regeneration:** molecular mechanisms of growth control. The FASEB Journal, v. 4, p. 76-187, 1990.

NAGASUE, N.; YUKAYA, H.; OGAWA, Y.; KOHNO, H.; NAKAMURA, T. **Human liver regeneration after major hepatic resection.** Ann of Surgery, v. 206, n. 1, p. 30-39, july.1987.

NELSEN, C. J.; RICKHEIM, D. G.; TUCKERS, M. M.; HANSEN, L. K.; ALBRECHT, J. H. **Evidence that cyclin D1 Mediates both growth and proliferation**

**downstream of TOR in hepatocytes.** The journal of Biological Chemistry, v. 278, n. 6, p. 3656-3663, 2003.

PALMES, D.; ZIBERT, A.; BUDNY, T.; BAHDE, R.; MININ, E.; KEBSCHULL, L.; HOLZEN, J.; SCHMIDT, H.; SPIEGEL, H. U. **Impact of rapamycin on liver regeneration.** Virchows Arch, n. 452, p. 545-557, 2008.

PAPADIMAS, G. K.; TZIROGIANNIS, K. N.; PANOUTSOPOULOS, G. I.; DEMONAKOU, M. D.; SKALTSAS, S. D.; HERETI, R. I.; PAPADOPOULOU-DAIFOTI, Z.; MYKONIATIS, M. G. **Effect of serotonin receptor 2 blockage on liver regeneration after partial hepatectomy in the rat liver.** Liver international, v. 26, p. 352-361, 2006.

PAWLOWSKI, R.; JURA, J. **ALR and liver regeneration.** Molecular and cellular biochemistry, v. 288, p. 159-169, 2006.

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

ROBINS, L. R., CONTRAN, R. S., KUMAR, V., SCHOEN, F. J. **Patologia estrutural e funcional.** 5ª. edição. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1996. Cap. 18. p. 743-744.

ROZGA, J. **Hepatocyte proliferation in health and in liver failure.** Med Sci Monit, v. 8, n. 2, p. 32-38, 2002.

RUSSELL, W. E.; DEMPSEY, P. J.; SITARIC, S.; PECK, A. J.; COFFEY JUNIOR, R. J. **Transforming growth factor alfa ( TGF  $\alpha$ ) concentrations increase in regenerating rat liver: evidence for a delayed accumulation of mature tgf  $\alpha$ .** Endocrinology, v.133. n. 4, p. 1731-1738, 1993.

RUTHERFORD, A.; CHUNG, R. T. **Acute liver failure: mechanisms of hepatocyte injury and regeneration.** Seminars in liver disease, v. 28, n. 2, p.167-174, 2008.

STARZL, T.E.; PUTNAM, C. W.; GROTH, C. G.; CORMAN, J. L.; TAUBMAN, J. **Alopecia, ascites, and incomplete regeneration after 85-90 per cent liver resection.** America Journal of Surgery, v. 129, p. 587-590, 1975.

STEER, C. J. **Liver regeneration,** The FASEB Journal, v.9, p.1396-1995, nov.1995.

SUN, R.; GAO, B. **Negative regulation of liver regeneration by innate immunity (natural killer cells/interferon-Y).** Gastroenterology, v. 127, p. 1525-1539, 2004.

TAMURA, F.; MASUHARA, A.; SAKAIDA, I.; FUKUMOTO, E.; NAKAMURA, T.; OKITA, K. **FK506 promotes liver regeneration by suppressing natural killer cell activity.** Journal of Gastroenterology and hepatology, v. 13, p. 703-708, 1998.

TANIGAWA, K.; SAKAIDA, I.; MASUHARA, M.; HAGIYA, M.; OKITA, K. **Augmenter of liver regeneration (ALR) may promote liver regeneration by reducing natural**

**killer (NK) cell activity in human liver diseases.** Journal of Gastroenterology, v. 35, p. 112-119, 2000.

TARLÁ, M. R.; RAMALHO, F. S.; RAMALHO, L. N. Z.; SILVA, T. C. e.; BRANDÃO, D. F.; FERREIRA, J.; SILVA, O. C. e.; ZUCOLOTO, S. **A molecular view of liver regeneration.** Acta Cirúrgica Brasileira, v. 21, n. 1, p. 58-62, 2006a.

TARLÁ, M. R.; RAMALHO, F. S.; RAMALHO, L. N. Z.; SILVA, T. C. e.; BRANDÃO, D. F.; FERREIRA, J.; SILVA, O. C. e.; ZUCOLOTO, S. **Cellular aspects of liver regeneration.** Acta cirúrgica brasileira, v. 21, sup. 1, p.63-66. 2006b.

VLIET, J. A. van der.; WILLEMS, M. C. M.; MAN, B. M. de.; LOMME, R. M. L. M.; HENDRIKS, T. **Everolimus interferes with healing of experimental intestinal anastomoses.** Transplantation, v. 82, n. 11, dec. 2006.

WAGENAAR, G.T.; CHAMULEAU, R.A.; POOL, C.W.; DE HAAN, J.G.; MAAS, M.A.; KORFAGE, H.A.; LAMERS, W.H. **Distribution and activity of glutamine synthase and carbamoylphosphate synthase upon enlargement of de liver lobule by repeated partial hepatectomies.** Journal of Hepatology. V.17, p. 397-407, 1993.

WATSON, C. J. E.; FRIEND, P. J.; JAMIESON, N. V.; FRICK, T. W.; ALEXANDER, G.; GIMSON, A. E.; CALNE, R. **Sirolimus: A potent new immunosuppressant for liver transplantation.** Transplantatior, v.6, n.4, p. 505-509.

WOLF, H. K.; MICHALOUPoulos, G. K. **Hepatocyte regeneration in acute fulminant and nonfulminant hepatitis: a study proliferating cell nuclear antigen expression.** Hepatology, v. 15, p. 707-713, 1992.

YOKOYAMA, Y.; NAGINO, M.; NIMURA, Y. **Mechanisms of hepatic regeneration following portal vein embolization and partial hepatectomy: a review.** World Journal of surgery. V. 31, p. 367-374, 2007.



## APÊNDICES

APÊNDICE 1 – DADOS DOS PESOS DOS RATOS NOS GRUPOS CONTROLE (GC<sub>24h</sub> e GC<sub>7d</sub>).

RATO	Peso em gramas					Variação do peso (g)
	Pré op	hepatectomia	2º PO	4º PO	morte	
C <sub>24h</sub> 1	489,5	497,0	-	-	455,6	33,9
C <sub>24h</sub> 2	445,2	426,1	-	-	420,7	24,4
C <sub>24h</sub> 3	507,3	484,8	-	-	477,2	30,1
C <sub>24h</sub> 4	431,8	416,8	-	-	406,1	25,7
C <sub>24h</sub> 5	485,7	467,9	-	-	448,3	37,4
C <sub>24h</sub> 6	493,1	471,2	-	-	447,5	45,6
C <sub>24h</sub> 7	510,1	479,7	-	-	465,6	44,5
C <sub>24h</sub> 8	507,1	488,5	-	-	476,3	30,8
C <sub>24h</sub> 9	524,5	498,8	-	-	480,1	44,4
C <sub>24h</sub> 10	559,8	530,2	-	-	512,0	47,8
C <sub>7d</sub> 1	483,4	464,8	441,5	448,9	439,9	43,5
C <sub>7d</sub> 2	501,1	477,1	464,9	454,1	441,2	59,9
C <sub>7d</sub> 3	517,4	500,5	457,0	466,8	450,8	66,6
C <sub>7d</sub> 4	559,0	531,6	495,1	512,2	498,6	60,4
C <sub>7d</sub> 5	527,8	522,5	509,5	509,0	497,1	30,7
C <sub>7d</sub> 6	517,6	507,4	491,5	493,4	484,3	33,3
C <sub>7d</sub> 7	549,1	536,3	523,0	514,0	506,8	42,3
C <sub>7d</sub> 8	544,3	536,6	514,9	514,0	500,0	44,3
C <sub>7d</sub> 9	534,8	523,3	511,2	504,0	496,8	38,0
C <sub>7d</sub> 10	512,7	505,1	500,1	499,0	473,5	39,2

**Variação do peso (g):** variação entre as médias dos pesos corporais pré-operatório, na hepatectomia, no segundo e quarto dia após hepatectomia e na morte.

APÊNDICE 2 – DADOS DOS PESOS DOS ESPÉCIMES NOS GRUPOS CONTROLE (GC<sub>24h</sub> e GC<sub>7d</sub>).

RATO	Peso do fígado em gramas			
	explante 70%	Remanescente na hepatectomia	total na hepatectomia	morte
C <sub>24h</sub> 1	8,9	3,8	12,7	7,1
C <sub>24h</sub> 2	7,5	3,2	10,7	6,5
C <sub>24h</sub> 3	8,5	3,6	12,1	7,4
C <sub>24h</sub> 4	7,2	3,1	10,3	6,4
C <sub>24h</sub> 5	9,1	3,9	13,1	7,6
C <sub>24h</sub> 6	9,0	3,8	12,8	7,7
C <sub>24h</sub> 7	8,3	3,5	11,8	6,9
C <sub>24h</sub> 8	10,1	4,3	14,5	8,3
C <sub>24h</sub> 9	8,9	3,8	12,8	7,5
C <sub>24h</sub> 10	9,5	4,1	13,6	7,3
C <sub>7d</sub> 1	7,5	3,2	10,7	9,9
C <sub>7d</sub> 2	7,9	3,4	11,2	9,9
C <sub>7d</sub> 3	7,8	3,3	11,1	8,7
C <sub>7d</sub> 4	10,4	4,4	14,8	9,9
C <sub>7d</sub> 5	9,5	4,1	13,6	9,8
C <sub>7d</sub> 6	8,3	3,6	11,9	9,1
C <sub>7d</sub> 7	10,1	4,3	14,4	10,0
C <sub>7d</sub> 8	9,7	4,2	13,9	8,8
C <sub>7d</sub> 9	9,1	3,9	13,0	11,0
C <sub>7d</sub> 10	8,8	3,8	12,6	11,8

Explante 70% = Hepatectomia 70%; Fígado remanescente = 30%; Peso total = 100%

APÊNDICE 3 – DADOS DOS PESOS DOS RATOS NOS GRUPOS DE ESTUDO (GE<sub>24h</sub> e GE<sub>7d</sub>).

RATO	Peso em gramas					Variação do peso (g)
	Pré op	hepatectomia	2º PO	4º PO	morte	
E <sub>24h</sub> 1	531,0	501,0	-	-	484,0	47,0
E <sub>24h</sub> 2	483,0	449,0	-	-	433,0	50,0
E <sub>24h</sub> 3	459,0	430,0	-	-	410,0	49,0
E <sub>24h</sub> 4	495,0	471,0	-	-	463,0	32,0
E <sub>24h</sub> 5	486,4	458,9	-	-	448,5	37,9
E <sub>24h</sub> 6	512,2	488,1	-	-	472,0	40,2
E <sub>24h</sub> 7	508,8	494,7	-	-	463,7	45,1
E <sub>24h</sub> 8	512,9	500,4	-	-	478,7	34,2
E <sub>24h</sub> 9	511,5	501,2	-	-	476,2	35,3
E <sub>24h</sub> 10	559,8	546,0	-	-	517,3	42,5
E <sub>7d</sub> 1	556,0	535,5	501,1	505,1	492,9	63,1
E <sub>7d</sub> 2	478,0	449,0	420,5	429,0	424,6	53,4
E <sub>7d</sub> 3	520,0	482,3	453,6	465,6	451,7	68,3
E <sub>7d</sub> 4	610,0	589,5	553,0	556,4	539,2	70,8
E <sub>7d</sub> 5	543,8	522,4	503,0	504,0	492,7	51,1
E <sub>7d</sub> 6	488,2	475,4	454,3	453,6	448,2	40,0
E <sub>7d</sub> 7	557,9	542,7	523,6	518,7	508,2	49,7
E <sub>7d</sub> 8	483,6	470,6	450,6	449,7	450,0	33,6
E <sub>7d</sub> 9	512,1	504,6	482,0	480,6	474,0	38,1
E <sub>7d</sub> 10	471,7	462,7	425,6	429,0	422,3	49,4

**Variação do peso (g):** variação entre as médias dos pesos corporais pré-operatório, na hepatectomia, no segundo e quarto dia após hepatectomia e na morte.

APÊNDICE 4 – DADOS DOS PESOS DOS ESPÉCIMES NOS GRUPOS DE ESTUDO (GE<sub>24h</sub> e GE<sub>7d</sub>).

RATO	Peso do fígado em gramas			
	explante 70%	Remanescente na hepatectomia	total na hepatectomia	morte
E <sub>24h</sub> 1	8,5	3,6	12,1	6,4
E <sub>24h</sub> 2	9,6	4,1	13,7	6,3
E <sub>24h</sub> 3	7,5	3,2	10,7	6,5
E <sub>24h</sub> 4	8,1	3,5	11,5	6,9
E <sub>24h</sub> 5	7,7	3,3	11,0	6,6
E <sub>24h</sub> 6	9,8	4,2	13,9	6,5
E <sub>24h</sub> 7	8,0	3,4	11,5	6,0
E <sub>24h</sub> 8	11,1	4,8	15,8	8,0
E <sub>24h</sub> 9	8,3	3,6	11,9	8,6
E <sub>24h</sub> 10	10,2	4,4	14,6	9,8
E <sub>7d</sub> 1	8,7	3,7	12,5	9,2
E <sub>7d</sub> 2	7,9	3,4	11,2	10,5
E <sub>7d</sub> 3	8,2	3,5	11,7	10,1
E <sub>7d</sub> 4	10,4	4,4	14,8	11,7
E <sub>7d</sub> 5	8,7	3,7	12,4	9,7
E <sub>7d</sub> 6	8,6	3,7	12,3	10,0
E <sub>7d</sub> 7	11,2	4,8	15,9	9,8
E <sub>7d</sub> 8	8,8	3,8	12,5	8,9
E <sub>7d</sub> 9	9,9	4,2	14,1	9,3
E <sub>7d</sub> 10	8,0	3,4	11,4	8,0

Explante 70% = Hepatectomia 70%; Fígado remanescente = 30%; Peso total = 100%

APÊNDICES 5 – DADOS DOS DIFERENTES MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DA REGENERAÇÃO HEPÁTICA NOS GRUPOS CONTROLE (GC<sub>24h</sub> e GC<sub>7d</sub>).

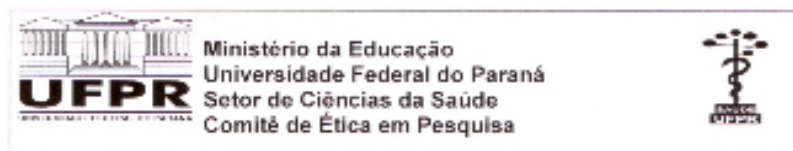
RATO	Fórmula de Kwon	Índice Mitótico	Ki-67	PCNA
C <sub>24h</sub> 1	60,55	0	47	79
C <sub>24h</sub> 2	61,35	0	97	61
C <sub>24h</sub> 3	62,00	1	63	90
C <sub>24h</sub> 4	63,82	0	71	97
C <sub>24h</sub> 5	60,93	0	62	57
C <sub>24h</sub> 6	62,87	0	75	54
C <sub>24h</sub> 7	60,57	0	47	71
C <sub>24h</sub> 8	59,12	0	27	69
C <sub>24h</sub> 9	60,55	2	41	39
C <sub>24h</sub> 10	55,47	0	53	57
C <sub>7d</sub> 1	96,98	3	61	71
C <sub>7d</sub> 2	95,32	1	17	27
C <sub>7d</sub> 3	86,88	0	39	29
C <sub>7d</sub> 4	71,32	0	32	39
C <sub>7d</sub> 5	75,77	5	71	87
C <sub>7d</sub> 6	79,57	2	68	47
C <sub>7d</sub> 7	72,86	2	38	49
C <sub>7d</sub> 8	68,60	3	26	73
C <sub>7d</sub> 9	89,15	1	43	76
C <sub>7d</sub> 10	99,60	2	52	81

**Fórmula de Kwon:** expressa em % a regeneração; **Índice mitótico:** número de núcleos em mitose em 10 CGA; **Ki-67:** número de núcleos positivos em 100 hepatócitos registrados; **PCNA:** número de núcleos positivos em 100 hepatócitos registrados.

APÊNDICES 6 – DADOS DOS DIFERENTES MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DA REGENERAÇÃO HEPÁTICA NOS GRUPOS DE ESTUDO (GE<sub>24h</sub> e GE<sub>7d</sub>).

RATO	Fórmula de Kwon	Índice Mitótico	Ki-67	PCNA
E <sub>24h</sub> 1	54,54	1	49	57
E <sub>24h</sub> 2	47,86	0	31	51
E <sub>24h</sub> 3	63,85	1	15	49
E <sub>24h</sub> 4	61,06	0	27	53
E <sub>24h</sub> 5	61,25	1	35	71
E <sub>24h</sub> 6	48,42	0	17	37
E <sub>24h</sub> 7	56,03	0	38	51
E <sub>24h</sub> 8	52,68	0	95	87
E <sub>24h</sub> 9	76,37	0	81	73
E <sub>24h</sub> 10	71,16	0	78	79
E <sub>7d</sub> 1	80,25	2	41	40
E <sub>7d</sub> 2	98,40	3	57	67
E <sub>7d</sub> 3	92,56	1	67	53
E <sub>7d</sub> 4	86,05	1	51	40
E <sub>7d</sub> 5	82,35	3	81	79
E <sub>7d</sub> 6	85,38	1	71	51
E <sub>7d</sub> 7	65,64	3	60	90
E <sub>7d</sub> 8	74,81	2	77	61
E <sub>7d</sub> 9	74,64	2	47	59
E <sub>7d</sub> 10	77,55	2	54	71

**Fórmula de Kwon:** expressa em % a regeneração; **Índice mitótico:** número de núcleos em mitose em 10 CGA; **Ki-67:** número de núcleos positivos em 100 hepatócitos registrados; **PCNA:** número de núcleos positivos em 100 hepatócitos registrados.

**ANEXOS****ANEXO 1 – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DA UFPR.**

Curitiba, 22 de agosto de 2007.

Ilmo (a) Sr. (a)  
**Edimar Leandro Toderke**  
Nesta

Prezado(a) Senhor(a),

Comunicamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "Efeito do imunossupressor Sirolimus na regeneração hepática após hepatectomia extensa: estudo experimental em ratos" obedece os Princípios Éticos da Experimentação Animal, estabelecidos e aprovados em documento orientados, expedido pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR em reunião realizada no dia 27 de junho de 2007 e apresentou pendências. Documentos analisados, depois de atendidas as pendências, e projeto aprovado em 22 de agosto de 2007.

Registro CEP/SD: AN.006.002.07.06

**Data para entrega do relatório final ou parcial: 22/02/2008.**

Atenciosamente



**Prof. Dr. Liliansa Maria Labronci**  
Coordenadora do Comitê de Ética em  
Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde

**ANEXO 2 – COMPOSIÇÃO BÁSICA DA RAÇÃO BALANCEADA FORNECIDA AOS RATOS (NUVILAB CR1®)**

Carbonato de cálcio, farelo de milho, farelo de soja, farelo de trigo, fosfato bicálcico, cloreto de sódio, premix mineral vitamínico, aminoácidos (DL-metionina e lisina).
Umidade (máximo): 12,5%
Proteína bruta (mínimo): 22%
Cálcio (máximo): 1,4%
Fósforo (mínimo): 0,8%
Estrato etéreo (mínimo): 4%
Material mineral (máximo): 10%
Matéria fibrosa (máximo): 8%
Vitaminas: A, D3, E, K3, B1, B2, B6, B12, niacina, ácido pantotênico, ácido fólico, biotina, colina.
Microelementos: ferro, zinco, cobre, iodo, manganês, selênio, cobalto.

FONTE: Nuvital Nutrientes, Colombo, PR, Brasil