

ALESSANDRA BORGES BRANCO

**REGENERAÇÃO HEPÁTICA EM RATOS
SUBMETIDOS À HEPATECTOMIA PARCIAL:
EFEITO DA DESNUTRIÇÃO PROTÉICA E
DA RENUTRIÇÃO PRÉ-OPERATÓRIA.**

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

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos L. Campos.

Coordenador: Prof. Dr. Jorge Eduardo F. Matias.

CURITIBA

2006

Borges Branco, Alessandra

Regeneração hepática em ratos submetidos à hepatectomia parcial: efeito da desnutrição protéica e da renutrição pré-operatória. - Alessandra Borges Branco - Curitiba, 2006

xvii, 83 f. 28 cm

Dissertação - (Mestrado em Clínica Cirúrgica) - Departamento de Clínica Cirúrgica. Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos L. Campos

1. Regeneração hepática; 2. Desnutrição protéica; 3. Renutrição
4. Índice mitótico; 5. PCNA; 6. Esteatose hepática I. Título

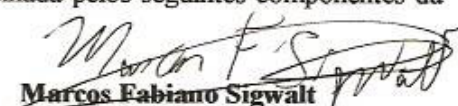


MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CLÍNICA CIRÚRGICA
NÍVEL MESTRADO - DOUTORADO

Ata do julgamento da 304ª Dissertação de Mestrado do 417º do Programa para conclusão da Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica, nível Mestrado da Universidade Federal do Paraná, referente a aluna **ALESSANDRA BORGES BRANCO**, com o título: **“REGENERAÇÃO HEPÁTICA EM RATOS SUBMETIDOS À HEPATECTOMIA PARCIAL: EFEITO DA DESNUTRIÇÃO PROTÉICA E DA RENUÇÃO PRÉ-OPERATÓRIA** na LINHA DE PESQUISA: Avaliação Anátomo-funcional dos Transplantes de Órgãos Sólidos e Tecidos na ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Clínica Cirúrgica, tendo como orientador Prof. Dr. Antonio Carlos Ligocki Campos

Às sete horas e trinta minutos do dia dezoito de dezembro de dois mil e seis no Auditório do 7º andar central sala 702 do Hospital de Clínicas, teve início a prova em epígrafe, constituída a Comissão Examinadora pelos Professores Doutores **José Luiz de Godoy**, **Marcos Fabiano Sigwalt** e **Jorge Eduardo Fouto Matias** sendo este Presidente da Comissão. Aberta a sessão foi apresentada pelo Prof. Dr. Antonio Carlos L. Campos vice-coordenador do Programa, a documentação probatória do cumprimento pelo candidato das exigências legais que lhe facultam submeter-se à avaliação da dissertação, como última etapa à sua titulação no Programa. A seguir o Presidente da Comissão convidou o candidato a apresentar oralmente resumo de sua dissertação no prazo máximo de trinta minutos para demonstração de sua capacidade didática e para melhor conhecimento do tema por parte da audiência composta de professores, médicos, alunos, familiares e demais interessados. Seguiu-se a arguição e imediata resposta pelo candidato, sucessivamente pelos componentes da Comissão Examinadora. Obedecido o tempo máximo de vinte minutos para a arguição e igual tempo para cada resposta. Terminada a etapa de arguição, reuniu-se a Comissão Examinadora em sala reservada para atribuição das notas, dos conceitos e lavratura do **Parecer Conjunto** necessário. Os conceitos e notas atribuídos foram: **Dr. José Luiz de Godoy - conceito “ A ” e equivalência “ 9,5 ”**; **Dr. Marcos Fabiano Sigwalt - conceito “ A ” e equivalência “ 9,5 ”** e **Dr. Jorge Eduardo Fouto Matias - conceito “ A ” e equivalência “ 9,5 ”**. Voltando à sala de sessão, o Senhor Presidente da Comissão leu os conceitos do Parecer Conjunto, dando como **final o conceito “ A ” e equivalência “ 9,5 ”**, e a recomendação de que a dissertação com o título já referido, possa ser publicada na forma final nos meios de divulgação científica adequados, depois de incorporadas as sugestões apresentadas no decurso das arguições. E para que tudo conste, foi lavrada a presente Ata, que vai assinada pelos seguintes componentes da Comissão Examinadora.


José Luiz de Godoy


Marcos Fabiano Sigwalt


Jorge Eduardo Fouto Matias

A Deus, pelo dom da vida e pelas oportunidades oferecidas.

Aos meus pais, Marco Antonio e Édna, pelo encorajamento, educação, incentivo constante e apoio incondicional para que eu pudesse chegar até aqui.

Ao meu marido Rodrigo, pelas horas privadas de seu convívio e pelo amor e incentivo constantes.

Aos meus irmãos, Andressa e Francisco, por me darem a coragem e a força necessárias para continuar.

AGRADECIMENTOS

A elaboração deste trabalho só se tornou possível devido à colaboração de inúmeras pessoas. Nomear a todos seria impossível. No entanto, gostaria de registrar aquelas pessoas e/ou instituições que estiveram mais diretamente vinculadas à realização desta dissertação, aos quais agradeço:

Ao **PROF. DR. ANTONIO CARLOS L. CAMPOS**, Professor Titular do Departamento de Cirurgia e Vice-Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica da Universidade Federal do Paraná, pelo incentivo e horas dedicadas a esse trabalho em orientação criteriosa, segura, amiga e incansável, pela confiança em mim depositada e pela importante contribuição na minha formação profissional e acadêmica. Exemplo de pesquisador.

Ao **DR. MARCELO FERREIRA**, cirurgião e amigo, pela ajuda em todas as etapas deste estudo e em especial durante a realização da parte experimental.

Ao Professor **DR. PAULO CESAR ANDRIGUETTO**, médico do Serviço de Cirurgia do Aparelho Digestivo do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná e do Hospital Nossa Senhora das Graças, pela amizade, colaboração, apoio, estímulo e sugestões sempre importantes na elaboração deste trabalho.

Aos patologistas, **DR. SÉRGIO OSSAMU IOSHII** e **DRA. DANIELE GIACOMETTI SAKAMOTO**, pela contribuição e auxílio na avaliação de parte dos estudos histológicos deste trabalho.

A **SR^a. SALETE DO CARMO PELANDA**, pelo apoio na avaliação estatística dos dados presentes neste trabalho.

Ao **ARQUITETO FRANCISCO BRANDÃO BORGES SOBRINHO**, meu irmão, pelo auxílio incansável na realização dos gráficos deste trabalho.

À **DRA. PAULA SUZIN TRUBIAN**, médica cirurgiã do aparelho digestivo, pela amizade, oportunas críticas e valiosas sugestões em várias fases deste trabalho.

Ao **DR. RICARDO GARCIA BRANCO**, médico pediatra, pela amizade desde os tempos da faculdade e auxílio inestimável na realização da revisão bibliográfica.

Ao PROF. DR. JOÃO CARLOS DOMINGUES REPKA, chefe do laboratório de Cirurgia Experimental do Hospital Angelina Caron, pela oportunidade de ensinar a importância dos animais de laboratório em trabalhos experimentais e pelo estímulo à pesquisa científica séria.

Às amigas ANNE KAROLINE GROTH; CAROLINA GOMES GONÇALVES e SILVANIA KLUG PIMENTEL pelo apoio e auxílio em diversas fases deste estudo.

Aos professores e médicos do DEPARTAMENTO DE CIRURGIA DO APARELHO DIGESTIVO do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, pela amizade, incentivo e ensinamentos recebidos durante minha formação profissional.

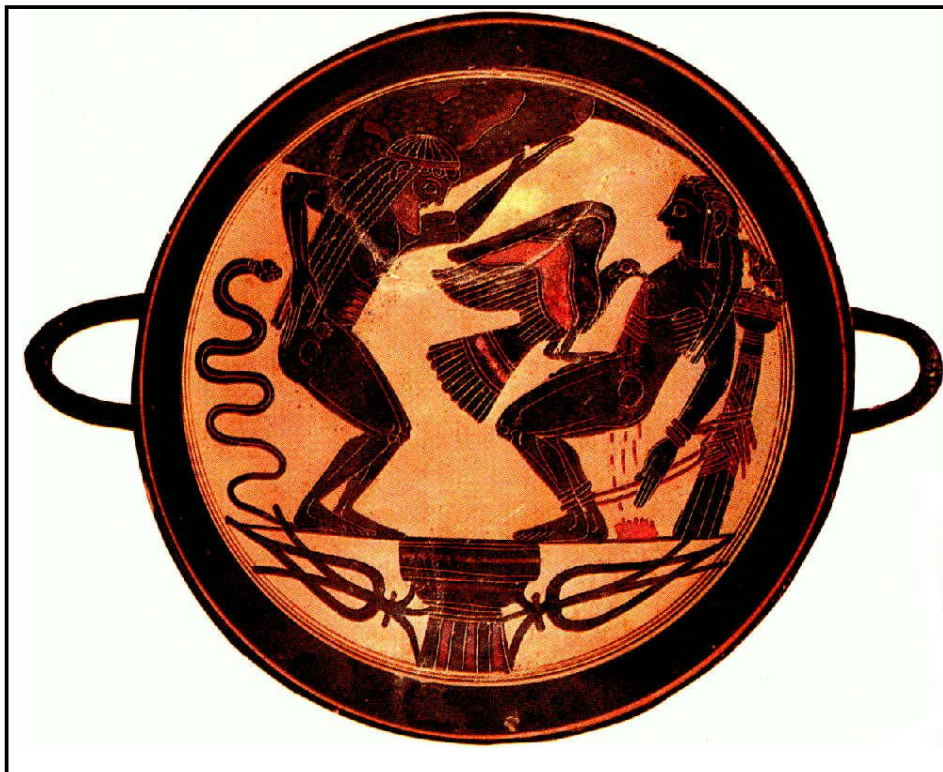
Às funcionárias do Programa de Pós-Graduação e da Disciplina de Cirurgia do Aparelho Digestivo, REGINA SASS MARQUES e MARILI DREWS, pelo carinho e auxílio logístico na elaboração deste trabalho.

Ao LABORATÓRIO DE PESQUISA EM CIRURGIA EXPERIMENTAL da Universidade Federal do Paraná por proporcionar a realização da fase experimental do trabalho.

Ao BIOTÉRIO DO SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE da Universidade Federal do Paraná, pela colaboração no fornecimento dos animais.

À UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ, pela oportunidade de realizar meus cursos de graduação e de pós-graduação.

À CAPES, pela concessão da bolsa e pelo incentivo à pesquisa em nosso país.



Fonte: SERVI K, 2005

*"Hear the sum of the whole matter in the compass of one brief word -
every art possessed by man comes from Prometheus."*

from Prometheus Bound by Aeschylus

SUMÁRIO

	LISTA DE GRÁFICOS	x
	LISTA DE TABELAS	xi
	LISTA DE FIGURAS	xiii
	LISTA DE QUADROS	xiv
	LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	xv
	RESUMO.....	xvii
	ABSTRACT.....	xviii
1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	OBJETIVO.....	3
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	4
2.1	TRANSPLANTE HEPÁTICO	4
2.1.1	Considerações Gerais	4
2.1.2	Transplante Hepático por Bipartição	6
2.1.3	Transplante Hepático com Doadores Vivos	6
2.2	DESNUTRIÇÃO NO HEPATOPATA	7
2.2.1	Desnutrição	7
2.2.2	Desnutrição na doença hepática avançada	8
2.2.3	Desnutrição no transplante hepático.....	10
2.2.4	Alterações na taxa metabólica	10
2.2.5	Alterações metabólicas dos carboidratos	11
2.2.6	Alterações no metabolismo das proteínas	12
2.2.7	Alterações no metabolismo dos lipídeos	12
2.3	REGENERAÇÃO HEPÁTICA	13
2.3.1	Considerações gerais	13
2.3.2	O fígado e os hepatócitos	14

2.3.3	Hepatectomia parcial à 70%	18
2.3.4	Influência da desnutrição na regeneração hepática	20
2.3.5	Nutrição pré-operatória e regeneração hepática	23
2.4	MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DA REGENERAÇÃO HEPÁTICA	25
2.4.1	Peso do fígado	25
2.4.2	Contagem das figuras de mitose	27
2.4.3	Métodos imunoistoquímicos	27
2.5	ESTEATOSE HEPÁTICA	29
3	MATERIAL E MÉTODO.....	31
3.1	MATERIAL.....	31
3.1.1	Animais.....	31
3.1.2	Ração Padrão	31
3.1.3	Dieta Aprotéica	31
3.2	MÉTODO.....	33
3.2.1	Considerações ambientais	33
3.2.2	Grupos de Estudo	33
3.2.3	Desenho do Estudo	34
3.2.4	Confecção da Dieta Aprotéica	35
3.2.5	Controle de Peso	37
3.2.6	Morbi-mortalidade	37
3.2.7	Ato Operatório	37
3.2.8	Pós-operatório	39
3.2.9	Morte dos animais	39
3.2.10	Avaliação histológica.....	40
3.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	43
4	RESULTADOS.....	45

4.1	MORTALIDADE	45
4.2	MORBIDADE	45
4.3	PESO DOS ANIMAIS	45
4.4	VARIÁVEIS HISTOLÓGICAS.....	47
4.4.1	Contagem do Número de Figuras de Mitose	47
4.4.2	Avaliação dos núcleos corados com PCNA	49
4.4.3	Avaliação do Grau de Esteatose	49
5	DISCUSSÃO.....	52
5.1	TRANSPLANTE HEPÁTICO	52
5.2	O MODELO EXPERIMENTAL	53
5.2.1	Escolha dos animais	53
5.2.2	Morbi-mortalidade	54
5.2.3	Anestesia	54
5.2.4	Hepatectomia à 70%	55
5.2.5	Data da morte dos animais	57
5.3	DESNUTRIÇÃO	57
5.3.1	O Modelo de Desnutrição	57
5.3.2	Nutrição Perioperatória	59
5.3.3	Peso	60
5.4	AVALIAÇÃO DA REGENERAÇÃO HEPÁTICA	60
5.4.1	Contagem das Figuras de Mitose	61
5.4.2	Avaliação do PCNA	63
5.5	ESTEATOSE	64
5.6	PERSPECTIVAS FUTURAS	66
6	CONCLUSÕES.....	67
	REFERÊNCIAS.....	68

APÊNDICES

- 1 TABELAS DEMONSTRANDO A EVOLUÇÃO DOS PESOS DOS ANIMAIS (g), NAS DIVERSAS FASES DO ESTUDO
- 2 TABELAS DEMONSTRANDO A ANÁLISE ESTATÍSTICA ENTRE OS GRUPOS DOS PESOS DOS ANIMAIS (g), NAS DIVERSAS FASES DO ESTUDO
- 3 TABELAS DEMONSTRANDO A ANÁLISE ESTATÍSTICA INTRAGRUPOS DOS PESOS DOS ANIMAIS (g), NAS DIVERSAS FASES DO ESTUDO
- 4 TABELAS DEMONSTRANDO A MÉDIA DA CONTAGEM DAS FIGURAS DE MITOSE EM 20 CAMPOS DE GRANDE AUMENTO (40X), POR ANIMAL, NOS GRUPOS CTL, DNT E RNT
- 5 TABELA DEMONSTRANDO A ANÁLISE ESTATÍSTICA DA CONTAGEM DO NÚMERO DE FIGURAS DE MITOSE (n) ENTRE OS GRUPOS
- 6 TABELAS DEMONSTRANDO A CONTAGEM DE NÚCLEOS CORADOS PELO PCNA (n) EM 20 CAMPOS DE 17839,38 MICRÔMEROS
- 7 TABELA DEMONSTRANDO A ANÁLISE ESTATÍSTICA DA CONTAGEM DE NUCLEOS CORADOS PELO PCNA (n) ENTRE OS GRUPOS
- 8 TABELAS DEMONSTRANDO OS GRAUS DE ESTEATOSE E A PERCENTAGEM ENCONTRADOS EM CADA ANIMAL
- 9 TABELA DEMONSTRANDO A ANÁLISE ESTATÍSTICA ENTRE OS GRUPOS DA ÁREA (%) OCUPADA POR ESTEATOSE

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1	CINÉTICA DA SÍNTESE DE DNA NAS DIFERENTES CÉLULAS HEPÁTICAS DURANTE O PROCESSO DE REGENERAÇÃO HEPÁTICA EM RATOS	16
GRÁFICO 2	COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DOS PESOS (g) DOS RATOS DOS GRUPOS CTL, DNT E RNT, NOS DIAS 0; DIA 15; CX E 1 PO	46
GRÁFICO 3	COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DOS PESOS (g) NOS GRUPOS CTL, DNT E RNT ENTRE OS DIAS 0, 15, 21 e 1 PO	47
GRÁFICO 4	CONTAGEM DO NÚMERO DE FIGURAS DE MITOSE / HE NOS GRUPOS CTL, DNT E RNT	48
GRÁFICO 5	COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DOS NÚMEROS DE NÚCLEOS CORADOS PELO PCNA ENTRE OS GRUPOS CTL; DNT E RNT	49

LISTA DE TABELAS

TABELA A	PESOS (g) DO GRUPO CTL	1 A
TABELA B	PESOS (g) DO GRUPO DNT	1 A
TABELA C	PESOS (g) DO GRUPO RNT	1 A
TABELA D	COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DOS PESOS (g) ENTRE OS GRUPOS CTL E DNT NO D 0; CX E 1 PO	2 A
TABELA E	COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DOS PESOS (g) ENTRE OS GRUPOS CTL E RNT NO D 0; CX E 1 PO	2 A
TABELA F	COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DOS PESOS (g) ENTRE OS GRUPOS DNT E RNT NO D 0; CX E 1 PO	3 A
TABELA G	DIFERENÇAS DAS MÉDIAS DOS PESOS (g) ENTRE OS GRUPOS DNT E CTL E RNT E CTL APÓS A DESNUTRIÇÃO ...	3 A
TABELA H	COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DOS PESOS (g) ENTRE OS GRUPOS CTL E RNT NO D0; D 15; CX E 1 PO	4 A
TABELA I	COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DOS PESOS (g) NO GRUPO CTL ENTRE O DIA 0, CX E 1 PO	5 A
TABELA J	COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DOS PESOS (g) NO GRUPO DESNUTRIDO ENTRE O DIA 0, CX E 1 PO	5 A
TABELA L	COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DOS PESOS (g) NO GRUPO RENUTRIDO ENTRE O DIA 0; D 15; CX E 1 PO	6 A
TABELA M	MÉDIA DA CONTAGEM DO NÚMERO DAS FIGURAS DE MITOSE (n) POR CAMPO DE GRANDE AUMENTO – GRUPO CTL	7 A
TABELA N	MÉDIA DA CONTAGEM DO NÚMERO DAS FIGURAS DE MITOSE (n) POR CAMPO DE GRANDE AUMENTO – GRUPO DNT	7 A
TABELA O	MÉDIA DA CONTAGEM DO NÚMERO DAS FIGURAS DE MITOSE (n) POR CAMPO DE GRANDE AUMENTO – GRUPO RNT	7 A
TABELA P	COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DAS MITOSES (número de figuras de mitose) ENTRE OS GRUPOS CTL, DNT E RNT	8 A

TABELA Q	MÉDIA DA CONTAGEM DO NÚMERO DE NÚCLEOS CORADOS PELO PCNA (n) POR 17839,39 MICROMEROS – GRUPO CTL.....	9 A
TABELA R	MÉDIA DA CONTAGEM DO NÚMERO DE NÚCLEOS CORADOS PELO PCNA (n) POR 17839,39 MICROMEROS – GRUPO DNT	9 A
TABELA S	MÉDIA DA CONTAGEM DO NÚMERO DE NÚCLEOS CORADOS PELO PCNA (n) POR 17839,39 MICROMEROS – GRUPO RNT	9 A
TABELA T	COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DOS NÚMEROS DE NÚCLEOS CORADOS PELO PCNA (n) ENTRE OS GRUPOS CTL, DNT E RNT	10 A
TABELA U	GRAU DE ESTEATOSE E PERCENTAGEM NAS LÂMINAS CORADAS POR HE EM CADA ANIMAL DO GRUPO CTL	11 A
TABELA V	GRAU DE ESTEATOSE E PERCENTAGEM NAS LÂMINAS CORADAS POR HE EM CADA ANIMAL DO GRUPO DNT	11 A
TABELA X	GRAU DE ESTEATOSE E PERCENTAGEM NAS LÂMINAS CORADAS POR HE EM CADA ANIMAL DO GRUPO RNT	12 A
TABELA Z	COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DA ÁREA OCUPADA POR ESTEATOSE (%) ENTRE OS GRUPOS CTL, DNT E RNT	13 A

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	ESQUEMA DA HEPATECTOMIA A 70% DESCRITA POR HIGGINS & ANDERSON (1931).....	19
FIGURA 2	ANIMAIS DISPOSTOS EM SUAS GAIOLAS NO LABORATÓRIO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA DA UFPR	34
FIGURA 3	DESENHO DO ESTUDO	35
FIGURA 4	COMPONENTES DA DIETA APROTEICA	36
FIGURA 5	<i>PELETS</i> DA DIETA APOTÉICA ANTES DE SEREM LEVADOS AO FORNO	37
FIGURA 6	<i>PELETS</i> DA DIETA APROTÉICA PRONTOS	37
FIGURA 7	INÍCIO DO ATO OPERATÓRIO	39
FIGURA 8	REALIZAÇÃO DA HEPATECTOMIA A 70%	39
FIGURA 9	LOBOS HEPÁTICOS RESSECADOS	40
FIGURA 10	MORTE DOS ANIMAIS	41
FIGURA 11	FOTOMICROGRAFIA EVIDENCIANDO FIGURAS DE MITOSE EM CORTE HISTOLÓGICO CORADO COM HEMATOXILINA / EOSINA	42
FIGURA 12	FOTOMICROGRAFIA EVIDENCIANDO ESTEATOSE - CORTE HISTOLÓGICO CORADO COM HE	43
FIGURA 13	FOTOMICROGRAFIA EVIDENCIANDO CORTE HISTOLÓGICO CORADO PELO PCNA	44
FIGURA 14	EXEMPLO DE SOFRIMENTO DE PARÊNQUIMA – GRUPO DNT	48
FIGURA 15	EXEMPLO DE ESTEATOSE NÍVEL I- GRUPO CTL	50
FIGURA 16	EXEMPLO DE ESTEATOSE NÍVEL IV- GRUPO DNT	50
FIGURA 17	EXEMPLO DE ESTEATOSE NÍVEL I - GRUPO RNT	51

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1	PRINCIPAIS INDICAÇÕES PARA O TRANSPLANTE HEPÁTICO	5
QUADRO 2	PRINCIPAIS ALTERAÇÕES METABÓLICAS NOS HEPATOPATAS	9
QUADRO 3	FATORES ETIOLÓGICOS PARA A DESNUTRIÇÃO EM HEPATOPATAS CRÔNICOS	9
QUADRO 4	CLASSIFICAÇÃO DE CHILD-TURCOTTE	11
QUADRO 5	PRINCIPAIS CITOCINAS, FATORES DE CRESCIMENTO E FATORES DE TRANSCRIÇÃO ENVOLVIDOS NA REGENERAÇÃO HEPÁTICA	18
QUADRO 6	MÉTODOS E MARCADORES DISPONÍVEIS PARA AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR	26
QUADRO 7	COMPOSIÇÃO DA RAÇÃO UTILIZADA PARA ALIMENTAR OS ANIMAIS	33
QUADRO 8	COMPOSIÇÃO DA RAÇÃO APROTÉICA UTILIZADA PARA DESNUTRIÇÃO DOS RATOS	33
QUADRO 9	CLASSIFICAÇÃO DO GRAU DE ESTEATOSE (%)	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ASCN	- Sociedade Americana de Nutrição Clínica
ASPEN	- Sociedade Americana de Nutrição Parenteral e Enteral
ATP	- adenosina trifosfato
BrdU	- bromodeoxiuridina
COBEA	- Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CTL	- Grupo controle
CX	- dia da cirurgia
D	- dia
DNA	- Ácido Desoxirribonucléico
DNT	- Grupo desnutrição
EGF	- fator de crescimento epidérmico
EP	- Erro-padrão
ESPEN	- Sociedade Européia de Nutrição Parenteral e Enteral
EUA	- Estados Unidos da América
<i>et al</i>	- e colaboradores
FHF	- falência hepática fulminante
FNT	- fator de necrose tumoral
g	- gramas
GEB	- gasto energético basal
HE	- Hematoxilina-Eosina
IL	- interleucina
Kcal	- Kilocalorias
KGF	- fator de crescimento do queratinócito
Kg	- Kilograma

M	- média ponderal
mg	- miligramas
μm	- micrômetro
ml	- mililitros
n	- Tamanho da amostra
n°	- Número
NIH	- Instituto Nacional de Saúde Americano
NPT	- nutrição parenteral total
p	- Nível de significância estatística
PRÉ-OP	- pré-operatório
PO	- Pós-operatório
PCNA	- Antígeno proliferação celular nuclear
RNA	- Ácido Ribonucléico
RNA _m	- Ácido Ribonucléico mensageiro
RNT	- Grupo renutrição
STAT	- sinal tradutor e ativador da transcrição
t	- Teste t de Student
TGF	- fator de crescimento transformador
UFPR	- Universidade Federal do Paraná
VLDL	- lipoproteína de muito baixa densidade
° C	- Graus Celsius
=	- Igual a
±	- Mais ou menos
®	- Marca registrada
<	- Menor que
>	- Maior que

% - Porcentagem

RESUMO

Introdução: O transplante hepático é considerado tratamento definitivo para doenças hepáticas terminais. Entretanto, com a escassez de órgãos e a crescente lista de candidatos, surgiram técnicas capazes de utilizar apenas segmentos do fígado, como o transplante por bipartição e o transplante com doador vivo. Nesses casos, o sucesso do transplante, tanto para o doador quanto para o receptor está diretamente relacionado com a capacidade de regeneração hepática. A hepatopatia crônica compromete o estado nutricional, piora os resultados cirúrgicos e poderia comprometer o processo regenerativo do fígado. **Objetivo:** determinar os efeitos da desnutrição protéica e da renutrição na regeneração hepática após hepatectomia parcial a 70%. **Material e Método:** Foram utilizados 30 ratos *Wistar* machos, adultos, com peso médio de 235,2 g, divididos em 3 grupos conforme a dieta a ser recebida: 1. grupo controle (CTL), alimentados com dieta padrão *ad libitum* durante 15 dias; 2. grupo desnutrição (DNT), alimentados dieta aprotéica *ad libitum* durante 15 dias e 3. grupo renutrição (RNT), alimentados com dieta aprotéica *ad libitum* por 15 dias e renutridos no pré-operatório por 7 dias com dieta padrão. Nos dias 15 ou 21, dependendo do grupo, os ratos foram anestesiados e submetidos à hepatectomia parcial à 70%, descrita por HIGGINS & ANDERSON (1931). Os ratos foram mortos com 24 horas de pós-operatório e os fígados remanescentes foram ressecados e enviados para análise histológica da regeneração hepática. Foi realizada a contagem do número de figuras de mitose na lâmina corada pelo HE e a contagem do número de núcleos corados pelo PCNA. O grau de esteatose hepática também foi avaliado. A análise estatística incluiu os testes t de Student e Kruskal Wallis com nível de significância de $p < 0,05$. **Resultados:** A média da contagem de figuras de mitose foi de $3,22 \pm 0,43$ (M \pm EP) no grupo CTL, de $1,99 \pm 0,79$ no grupo DNT e de $2,57 \pm 0,54$ no grupo RNT, sem diferença estatística na análise inter-grupos ($p > 0,05$). A média de núcleos corados pelo PCNA de foi $13,91 \pm 0,86$ (M \pm EP) no grupo CTL, $16,48 \pm 1,14$ no grupo DNT e $19,67 \pm 0,86$ no grupo RNT, houve diferença estatística apenas na comparação do grupo CTL com o grupo RNT ($p < 0,003$). A presença de esteatose foi intensa no grupo DNT, leve no grupo RNT e ausente no grupo CTL. Houve diferença estatística na comparação do grupo DNT com os grupos CTL e RNT ($p < 0,001$), entretanto não houve diferença estatística entre os grupos CTL e RNT ($p = 0,31$). **Conclusões:** Conclui-se que a desnutrição protéica associa-se a redução na contagem das figuras de mitose e aumento dos núcleos corados pelo PCNA. A renutrição recupera o número de figuras de mitose em relação aos ratos desnutridos e aumenta o número de núcleos corados pelo PCNA em relação aos ratos do grupo controle após hepatectomia parcial. Quanto ao grau de esteatose, a desnutrição e está associado a esteatose hepática intensa após hepatectomia parcial. A renutrição é capaz de reverter este quadro e está associada à esteatose hepática leve.

Palavras-chave: **Regeneração hepática; Desnutrição protéica; Nutrição pré-operatória; PCNA; índice mitótico; esteatose hepática.**

ABSTRACT

“Liver regeneration in rats after partial hepatectomy: effects of protein malnutrition and pre-operative renutrition.”

Background: Liver transplantation is the ultimate therapy for end-stage liver disease (ESLD). Few organs donors and increasing amount of patients lead to a development of techniques where only a part of the liver is used, such as split-liver and living donor liver transplantation. The good results of liver transplantation are related to the ability of the liver on regeneration. The ESLD impairs the nutritional state, worsen the surgical results and may reduce the liver regeneration process. **Objective:** to determine the effects of protein malnutrition and pre-operative nutrition on liver regeneration after 70% partial hepatectomy in rats. **Methods and Materials:** Thirty adult male *Wistar* rats, weighing in average 235,2g were used, divided into three groups: 1. control (CTL), feed with regular rat chow *ad libitum* for 15 days; 2. malnutrition (DNT) feed with low-protein rat chow *ad libitum* for 15 days and 3. renutrition (RNT), feed with low-protein rat chow *ad libitum* for 15 days and with regular rat chow *ad libitum* for 7 days pre-operative. On days 15 or 21, rats were submitted to 70% partial hepatectomy (HIGGINS & ANDERSON, 1931) under ether anesthesia. The animals were killed on first day after surgery. The remnant livers were removed and send to histological analysis. The mitotic index on HE and the PCNA nucleus account were measured. The liver steatosis was evaluated too. Student's *t* and Kruskal Wallis tests were applied and the level of significance was set at $p < 0,05$ **Results:** The average of the mitotic figures were 3.22 ± 0.43 in CTL group, 1.99 ± 0.79 in DNT group and 2.57 ± 0.54 in RNT group, there was no significant difference among the groups ($p < 0.05$). The averages of the PCNA labeling nucleus were 13.91 ± 0.86 in CTL group, 16.48 ± 1.14 in DNT group and 19.67 ± 0.86 in RNT group. The presence of steatosis was severe in group DNT, mild in group RNT and absent in group CTL. The difference was significant among group DNT and groups CTL and RNT ($p < 0.001$), therefore there was no difference between CTL and RNT groups ($p = 0.31$). **Conclusions:** protein malnutrition reduces the account of mitotic figures and increases the number of PCNA labeling nucleus. The 7 days pre-operative renutrition recovered the mitotic figures when compared with malnutrition rats and increase the number of nucleus PCNA labeling when compared with control group after 70% partial hepatectomy. The malnutrition was related with intense steatosis after partial hepatectomy. Renutrition was capable to recover this picture and is related with mild steatosis.

Key-Words: Liver regeneration; protein malnutrition; pre-operative nutrition; PCNA; mitotic index; hepatic steatosis.

1. INTRODUÇÃO

A cirurgia hepática evoluiu a partir dos conhecimentos anatômicos de segmentação do fígado (COUINAUD 1999). O avanço tecnológico possibilitou a prática de ressecções anatômicas, diminuindo-se a morbi-mortalidade destes procedimentos (BELGHITI, HIRAMATSU, BENOIST, MASSAULT, SAUVANET & FARGES, 2000). Paralelamente, a cirurgia de transplante hepático também evoluiu. A escassez de doadores e a mortalidade de pacientes em fila de espera (LIU, LAM, LO & FAN, 2003), conduziram ao desenvolvimento de novas técnicas (REDING, GOYET, DELBEKE, SOKAL, JAMART, JANSSEN & OTTE, 1999; KAMEL, KRUSKAL, POMFRET, KEOGAN, WARMBRAND & RAPTOPOULOS, 2001). O Hospital Paul Brousse, em Paris, foi um dos pioneiros a preparar fígado de cadáver adulto para criança, *reduced size allograft transplantation* (BISMUTH & HOUSSIN, 1984), contornando, assim, o grande problema da escassez de doadores para esta faixa etária. O passo seguinte foi a divisão do fígado doado, bipartição hepática (*split liver transplantation*), proposta em 1988 por Rudolf Pichlmayr, de Hannover (CHAIB, MORALES, BORDALO, ANTONIO, FEIJO, ISHIDA, LIMA JR & NUNES, 1995; STRONG, FAWCETT & LYNCH, 2003) e por Henry Bismuth, de Paris (BISMUTH, MORINO, CASTAING, GILLON, DESCORPS, SALIBA & SAMUEL, 1989), de tal forma que ambas as partes pudessem ser transplantadas em pacientes diferentes.

O transplante com doadores vivos desenvolveu-se inicialmente em pacientes pediátricos, sendo posteriormente utilizado em adultos. Desde sua primeira aplicação clínica em 1988 (RAIA, NERY & MIES, 1989) e sucesso em 1989 (STRONG, LYNCH, ONG, MATSUNAMI, KOIDO & BALDERSON, 1990), vem conquistando espaço de forma gradativa. Apresenta, atualmente, resultados semelhantes ou ainda superiores ao transplante de fígado cadavérico, com a vantagem de ser procedimento cirúrgico eletivo (BROELSCH, EMOND, WHITINGTON, THISTLETHWAITE, BAKER & LICHTOR, 1990). Trata-se, no entanto, de procedimento audacioso, onde a segurança do doador deve ser absoluta. Nesses casos sabe-se que o sucesso do transplante, tanto para o doador quanto para o receptor, está diretamente relacionado com a capacidade de regeneração hepática.

Regeneração é a habilidade de recuperar massa tecidual e função após ressecção parcial ou lesão do tecido (COURT, WEMYSS-HOLDEN, DENNISON & MADDERN, 2002). A maioria dos órgãos é incapaz de aumentar o número de células após uma lesão

enquanto que alguns deles são capazes de hipertrofiar as células restantes. O fígado é um órgão proliferativo em neonatos, mas os hepatócitos cessam a proliferação com um a dois meses de vida. Após este período, o fígado é capaz de restabelecer o volume ideal para o peso corporal após lesão e/ou perda celular através da síntese de DNA e de mitoses. Dois conceitos são importantes durante este processo. O primeiro é que os lobos ressecados durante a operação não voltam, mas sim os lobos remanescentes se expandem até atingir o peso do fígado original. Segundo, o crescimento do fígado remanescente acontece mesmo após hepatectomias seqüenciais (FAUSTO, 2001).

A desnutrição na população hospitalizada já foi amplamente estudada. WAITZBERG, CAIAFFA & CORREIA mostraram, em 2001, que 48% dos pacientes hospitalizados no Brasil são desnutridos. Da mesma forma, CORREIA & CAMPOS (2003) demonstraram semelhante resultado na ocorrência de desnutrição hospitalar na América Latina. Inclui-se neste grupo pacientes com doenças hepáticas avançadas de etiologia alcoólica e não alcoólica (MCCULLOUGH, 1992). Especificamente no grupo dos hepatopatas, a perda de peso ocorre em 20% dos pacientes compensados e em 80% dos pacientes descompensados clinicamente (CAMPOS, MATIAS & COELHO, 2004). A desnutrição afeta o sistema imune e aumenta a suscetibilidade a infecções, em pacientes cirróticos. Existe correlação entre desnutrição protéico-calórica, com piora da função hepática e com a gravidade da doença hepática. Intervenções dietéticas podem melhorar o estado nutricional em pacientes com doença hepática; reduzir as complicações, as hospitalizações e seus custos e melhorar a qualidade de vida (CAMPOS, MATIAS & COELHO, 2002).

A hepatectomia parcial em ratos, descrita por HIGGINS & ANDERSON (1931) é modelo clássico para avaliação da regeneração tecidual englobando todos os eventos do ciclo celular.

Alguns estudos demonstraram que jejum e alterações na composição da dieta são capazes de retardar a atividade mitótica após hepatectomia parcial em ratos (STIRLING, LAUGHLIN & WASHINGTON, 1973; TALARICO, FELLER & NEVILLE, 1971).

Em contraste com estes dados, ratos alimentados com dieta hipoprotéica apresentaram aumento da síntese protéica e redução da degradação das proteínas hepáticas após hepatectomia parcial (MCGOWAN, ATRYZEK & FAUSTO, 1979).

Portanto, não existe consenso na literatura sobre a influência da desnutrição e da renutrição na regeneração do fígado após ressecções hepáticas.

1.1 OBJETIVO

Determinar os efeitos da desnutrição protéica e da renutrição na regeneração hepática após hepatectomia parcial em ratos, mediante:

- Índice Mitótico
- Síntese de DNA – coloração com PCNA
- Grau de Esteatose.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 TRANSPLANTE HEPÁTICO

2.1.1 Considerações Gerais

O transplante hepático ortotópico é reconhecido como terapia definitiva para grande variedade de doenças hepáticas terminais (QUADRO 01). Realizado em humanos pela primeira vez em 1963, por Thomas E. Starzl, permaneceu por mais de uma década com resultados precários, sendo apenas praticado em selecionados centros europeus e americanos. (STARZL, MARCHIORO, VON KAULLA, HERMANN, BRITAIN & WADDELL, 1963). Somente a partir de 1979, quando Borel e Calne introduziram o uso da ciclosporina A, o transplante hepático passou a apresentar resultados mais satisfatórios (CALNE, ROLLES, WHITE, THIRU, EVANS, MACMASTER, DUNN, CRADDOCK, HENDERSON, AZIZ & LEWIS, 1979).

Em 1983, outro grande passo foi dado, quando o Instituto Nacional de Saúde Americano declarou que o transplante hepático deveria ser utilizado como modalidade terapêutica para pacientes com doença hepática terminal e não somente como cirurgia experimental (NIH, 1984).

Desde então, mais de 60.000 pacientes já foram submetidos ao transplante hepático em mais de 250 centros distribuídos mundialmente. Contando com constantes avanços na técnica, cuidados pré e pós-operatórios, métodos diagnósticos, novas drogas no combate às infecções e rejeição, índices de sobrevida em adultos aumentam chegando à média de 87% e 73% em um e cinco anos, respectivamente (VIANNA, 2005; GANE & MUNN, 1998). As descrições de sobrevida após transplante pediátrico variam de 80 a 90% em um ano e 70 a 80% em cinco anos (CIARDULLO, D'AGOSTINO & MCCORMACK, 2001).

Com a lista de espera por um órgão cada vez maior, aumenta a disparidade entre a disponibilidade de doadores cadáveres oferecidos e o número de potenciais receptores. Como resultado, o aparecimento de técnicas como bipartição hepática (*split-liver*) e doadores vivos surgiram na tentativa de compensar a escassez de órgãos (RAIA, NERY & MIES, 1989; HEFFRON, 1995).

QUADRO 01: PRINCIPAIS INDICAÇÕES PARA TRANSPLANTE HEPÁTICO.

- Doenças Hepatocelulares	
• Doença hepática viral crônica B ou C	• Atresia biliar
• Doença hepática alcoólica	• Doença hepática crônica auto-imune
• Cirrose criptogênica	• Hepatite tóxica
- Doença hepática colestática	
- Cirrose biliar primária	
- Colangite esclerosante primária	
- Cirrose biliar secundária	
- Falência hepática fulminante (FHF)	
• FHF induzida por vírus (A, B, C, D, E)	• Hepatite alcoólica aguda
• FHF induzida por drogas	• Falência hepática aguda da gravidez
- Doença hepática metabólica	
• Doença de Wilson	• Galactosemia
• Hemocromatose	• Hipercolesterolemia familiar tipo IIa
• Deficiência de alfa-1-antitripsina	• Doenças de armazenamento do glicogênio
• Deficiências no ciclo da uréia	• Deficiência de proteína C ou S
• Tirosinemia	• Deficiência de antitrombina III
• Síndrome de Crigler-Najjar tipo II	• Entre outras
• Doença de Gaucher	
- Doença hepática vascular	
• Síndrome de Budd-Chiari	
• Fistulas arteriovenosas portais	
• Doença hepática venoclusiva	
- Neoplasias	
• Hepatoblastoma	• Hemangioendotelioma
• Hepatocarcinoma	• Doença hepática maligna
- Outras	
• Fibrose hepática congênita	
• Hidatidose	
• Trauma hepático	

Nota: gráfico adaptado de VIANNA & NERY, 2001.

Como será visto a seguir, o sucesso dessas duas técnicas depende da capacidade regenerativa do fígado, para não deixar seqüelas funcionais. No caso do transplante com doador vivo, a regeneração é igualmente importante para o doador.

2.1.2 Transplante hepático por bipartição (*split-liver*)

A escassez de doadores e a dificuldade em encontrar doadores para crianças com falência hepática terminal induziu o aparecimento de técnicas que utilizam segmentos do fígado adulto. Esta técnica permite o máximo aproveitamento do *pool* de doadores cadavéricos e para sua prática se requer grande experiência em anatomia hepática, ressecções hepáticas maiores e implante de fígado reduzido. Introduzida inicialmente por Bismuth, três tipos diferentes de enxertos, de acordo com a classificação de COUINAUD, 1999, podem ser utilizados: 1. fígado direito; 2. fígado esquerdo e 3. segmentos laterais esquerdos (BISMUTH & HOUSSIN, 1984; ROGIERS; MALAGO; HABIB; KNOEFEL; POTHMANN; BURDELSKI; MEYER-MOLDENHAUER; BROELSCH, 1995).

Crianças normalmente recebem o fígado esquerdo ou segmentos laterais esquerdos. Aproximadamente 75% dos transplantes hepáticos pediátricos são feitos com redução do enxerto nos EUA (VIANNA & NERY, 2001).

A técnica de *split* ou bipartição hepática nasceu com o conceito de que fígados reduzidos poderiam ser utilizados em dois receptores diferentes. Pacientes transplantados com fígados reduzidos ou divididos apresentam complicações específicas para essas técnicas, entre elas: maior tempo de isquemia fria, rotação do segmento com trombose dos vasos, complicações biliares de origem técnica ou devido à dissecação excessiva da artéria hepática. (ROGIERS; MALAGO; HABIB; KNOEFEL; POTHMANN; BURDELSKI; MEYER-MOLDENHAUER; BROELSCH, 1995).

2.1.3. Transplante Hepático com Doadores Vivos

O transplante hepático de doadores vivos representa uma das inovações cirúrgicas mais importantes da época atual e vem sendo realizado em número cada vez maior de centros de transplante.

Realizado pela primeira vez no Brasil, pelo Dr. Silvano Raia, em 1988, a técnica foi inicialmente desenvolvida para transplantes pediátricos nos quais o lobo esquerdo ou

segmentos laterais eram utilizados como enxerto (RAIA, NERY & MIES, 1989). Atualmente, é praticada não apenas em crianças, mas também em paciente adultos nos quais o lobo direito do doador tem sido implantado (VIANNA & NERY, 2001).

Deve-se dar atenção a duas características para o bom resultado do transplante com doador vivo. A não identidade do sistema ABO contribui com redução em torno de 20% da sobrevida dos pacientes em cinco anos. O tamanho do enxerto a ser ressecado deve ser cuidadosamente avaliado, pois deve ter tamanho suficiente para atender às necessidades metabólicas do receptor sem afetar o metabolismo do doador. Enxertos pequenos para o tamanho do receptor (<1% do peso do receptor) resultam em menor sobrevida do enxerto (VIANNA, 2005). Ao mesmo tempo, ressecções muito alargadas podem comprometer a função hepática do doador. Este fato realça a importância do processo regenerativo hepático tanto para o receptor como para o doador.

2.2. DESNUTRIÇÃO E HEPATOPATIA

2.2.1 Desnutrição

JELLIFE (1966) definiu desnutrição como sendo estado mórbido resultante da deficiência ou do excesso, relativo ou absoluto, de um ou mais nutrientes essenciais. As causas de desnutrição são variadas, e incluem doença primária (neoplasias, tuberculose), procedimentos que previnem o paciente de receber ingestão nutricional adequada por tempos prolongados (exemplo: cirurgias) ou deficiência da ingesta nutricional.

Nas últimas quatro décadas tem ocorrido maior conscientização sobre a prevalência da desnutrição em pacientes hospitalizados. Estudos demonstram que 20 a 60% dos pacientes admitidos no hospital apresentam algum grau de deficiência nutricional (HILL, BLACKETT, PICKFORD, BURKINSHAW, YOUNG, WARREN, SCHORAH & MORGAN, 1977; WAITZBERG, CAIAFFA & CORREIA, 2001; CORREIA & CAMPOS, 2003). Estudos sobre o estado nutricional em pacientes cirúrgicos sugerem que a desnutrição e a perda de peso de 11,5% são bastante comuns (HILL *et al.*, 1977).

CORREIA & CAMPOS, em 2003, publicaram o ELAN (Estudo Latino-Americano de Nutrição), estudo que avaliou a desnutrição em hospitais da América Latina e concluiu que a desnutrição aumenta a morbi-mortalidade dos pacientes internados. A desnutrição também

aumenta o risco de desenvolvimento de úlceras de pressão, reduz a força de tração na ferida, retarda a cicatrização, favorece a deiscência da ferida e aumenta a suscetibilidade a infecções.

Nos pacientes com doença hepática avançada, a desnutrição está relacionada a anormalidades do metabolismo geral, como por exemplo: a redução na oxidação da glicose e aumento na oxidação dos lipídeos.

2.2.2 Desnutrição na doença hepática avançada:

A desnutrição é frequentemente observada em pacientes com doença hepática avançada de etiologia alcoólica e não alcoólica. O fígado é o maior órgão metabólico do corpo humano e abrange grande variedade de processos bioquímicos complexos e metabólicos. Logo, lesões significativas no parênquima hepático causam grande número de alterações metabólicas (QUADRO 02), que colaboram com o desenvolvimento de desnutrição protéico-calórica nestes pacientes. Independente da etiologia da lesão, a desnutrição está presente em 20% dos pacientes com doença hepática compensada e em mais de 80% daqueles com doença descompensada (CAMPOS, MATIAS & COELHO, 2004; PLAUTH, CABRÉ, RIGGIO, ASSIS-CAMILO, PIRLICH & KONDRUP, 2006). A anorexia está presente em até 87% dos casos (BORGES, WAITZBERG, OLIVEIRA e SILVA, D'ALBUQUERQUE & CAMILO, 2004). A desnutrição afeta o sistema imune e aumenta a suscetibilidade a infecções em pacientes cirúrgicos. Existe correlação da desnutrição com a piora da função e com a gravidade da doença hepática. A prevalência de desnutrição pode variar de 10-100% dependendo da série avaliada, da etiologia da doença hepática, do grau de comprometimento do fígado e do local onde o estudo foi realizado (MCCULLOUGH, 1992).

As alterações hormonais do hepatopata terminal incluem hiperinsulinemia, resistência à insulina, aumento do glucagon, catecolaminas, cortisol, hormônio do crescimento. Estas alterações hormonais alteram o metabolismo de macro e micro nutrientes. A desnutrição também pode ser exacerbada por sintomas como anorexia, náuseas, vômitos, má absorção e restrição dietética (SILVA & WAITZBERG, 2004).

Existem outros fatores que contribuem para a desnutrição protéica neste grupo de pacientes. No QUADRO 03 estão resumidos os principais fatores para o desenvolvimento da desnutrição em hepatopatas crônicos.

QUADRO 02 PRINCIPAIS ALTERAÇÕES METABÓLICAS NOS HEPATOPATAS.

Taxa de metabolismo

- Normal
- Hipermetabolismo

Metabolismo da glicose

- Redução das reservas de glicogênio
- Hiperinsulinemia
- Diminuição da oxidação da glicose
- Intolerância a glicose
- Diabetes melito

Metabolismo das proteínas

- Catabolismo protéico aumentado
- Aumento da gluconeogênese a partir dos aminoácidos

Metabolismo dos lipídeos

- Aumento da oxidação lipídica
- Deficiência de ácidos graxos essenciais
- Ingesta inadequada: quantitativa ou iatrogênica (restrições alimentares).

Fonte: Adaptado CAMPOS; MATIAS & COELHO, 2002.

QUADRO: 03 FATORES ETIOLÓGICOS PARA A DESNUTRIÇÃO EM HEPATOPATAS CRÔNICOS.

- Ingesta inadequada: quantitativa ou iatrogênica (restrições alimentares).
- Má absorção: deficiência pancreática ou de sais biliares.
- Anorexia, náuseas e vômitos.
- Toxicidade alcoólica.
- Alteração no metabolismo energético protéico: catabolismo protéico; aumento da oxidação de gorduras e da gluconeogênese.
- Alteração neurológica.
- Sangramento digestivo: melena, hematêmese.
- Medicções laxantes e de esterilização da flora intestinal (lactulona, neomicina)

Fonte: Adaptado de BORGES *et al.*, 2004.

2.2.3 Desnutrição no transplante hepático

Justamente por ser o transplante de órgãos indicado em doenças de alta mortalidade e como última opção terapêutica, os doentes encontram-se em fase avançada da doença de base e, na maioria das vezes, são portadores de desnutrição. Por outro lado, o transplante envolve importante trauma físico e aplicação imediata de drogas imunossupressoras. A imunossupressão cursa com efeitos colaterais associados, como a dificuldade de aporte alimentar, menor absorção digestiva e distúrbios do metabolismo intermediário e, ainda, com o aumento das necessidades energéticas (SILVA & WAITZBERG, 2004). Todos estes fatores associados causam piora do estado nutricional.

Procedimentos cirúrgicos em pacientes desnutridos constituem ambiente adverso para a recuperação orgânica. O mecanismo adaptativo da desnutrição inclui diminuição da demanda metabólica compatível com o nível mais baixo de nutrientes disponíveis. Por outro lado, o trauma cirúrgico desencadeia resposta hipercatabólica na tentativa de preservar a cicatrização e as defesas imunes do organismo. O conceito da Prioridade Biológica da Cicatrização (MOORE, 1959) sustenta a evidência de que a maioria das feridas cicatriza independentemente de alterações nutricionais. Entretanto, ao longo do tempo surgiram estudos que revelaram prejuízos da desnutrição, também, sobre o reparo tecidual.

Enquanto candidatos ao transplante hepático aguardam pelo órgão, a desnutrição piora e intervenção nutricional está claramente indicada (PLAETH *et al.*, 2006). A melhora do estado nutricional pode influenciar no metabolismo hepático, função muscular e estado imunológico deste pacientes. O estado nutricional dos hepatopatas relaciona-se diretamente com a mortalidade aguda e longo prazo e deve ser considerada tão importante quanto às demais manifestações da doença hepática. Justificando, assim, a intervenção nutricional nesses doentes, pois a correção de deficiências nutricionais nos portadores de doença hepática avançada pode melhorar a função imune e diminuir os riscos de infecção (PLAETH *et al.*, 2006).

2.2.4 Alterações na taxa metabólica

Alterações na composição corporal são freqüentes em candidatos ao transplante hepático o que, conseqüentemente, altera a taxa metabólica (CAMPOS, MATIAS & COELHO, 2002). A massa celular corporal (MCC), compartimento metabolicamente ativo, é

diretamente responsável pelo gasto energético basal (GEB), que pode ser determinado através da utilização das várias equações, como por exemplo, a equação de Harris-Benedict, ou através da calorimetria indireta (CAMPOS, MATIAS & COELHO, 2002). Reportam-se, ainda, grandes variações na determinação do GEB na doença hepática avançada.

Já foi demonstrado que dois terços dos candidatos a transplante hepático, clinicamente estáveis, apresentam GEB próximo ao normal. Deve-se lembrar que o restante desses pacientes (um terço) apresenta-se com comprovado quadro de hipermetabolismo (MÜLLER, BOTTCHEER, SELBERG, WESELMANN, BOKER, SCHWARZE, VON ZUR MUHLEN & MANN, 1999). O estado hipermetabólico, quando presente, tende a persistir após o transplante hepático e parece estar relacionado mais a fatores extra-hepáticos que hepáticos propriamente ditos.

DESCHENES, VILLENEUVE, DAGENAIS, FENYVES, LAPOINTE, POMIER-LAYRARQUES, ROY, WILLEMS & MARLEAU (1997) demonstraram que a MCC é melhor indicador prognóstico, a curto prazo, após transplante hepático que a tradicional classificação de Child-Turcotte (QUADRO 04).

QUADRO: 04 CLASSIFICAÇÃO DE CHILD-TURCOTTE.

Grupo	A	B	C
Bilirrubina (mg/dL)	↓ 2,0	2,0 – 3,0	↑ 3,0
Albumina (g/dL)	↑ 3,5	3,5 – 3,0	↓ 3,0
Ascite	Não	Facilmente controlável	Difícil controle
Alterações Neurológicas	Não	Leves	Acentuadas
Condição Nutricional	Boa	Regular	Má

Fonte: Adaptado de MINCIS, 1996.

2.2.5 Alterações no metabolismo dos carboidratos

O organismo utiliza glicose continuamente. Nos períodos de jejum o fígado mantém a glicemia estável através da glicogenólise e neoglicogênese hepática, fornecendo substratos para os tecidos periféricos.

A resistência periférica a insulina associada à hiperinsulinemia e a hiperglicagemia, presentes na doença hepática avançada, podem levar os pacientes ao desenvolvimento de

intolerância a glicose. E mais de um terço desses pacientes vai evoluir para diabete melito (CAMPOS, MATIAS & COELHO, 2002).

Os depósitos de glicogênio hepático estão reduzidos nestes pacientes, levando-os a utilizar as gorduras como principal substrato energético em longos períodos de jejum. Por isso, após jejum noturno, pacientes com doença hepática avançada apresentam evidências bioquímicas do aumento da neoglicogênese, oxidação lipídica e catabolismo protéico (MCCULLOUGH & TAVILL, 1991).

O distúrbio no metabolismo dos carboidratos pode produzir esteatose hepática, assunto que será abordado posteriormente.

2.2.6 Alterações no metabolismo das proteínas

O fígado é um dos órgãos mais ativos na reciclagem (*turnover*) protéica. Metaboliza os aminoácidos (principalmente os de cadeia aromática) para suas necessidades imediatas e para os tecidos periféricos. Capta glutamina dos músculos e intestinos para processo de neoglicogênese, sendo exclusivo na síntese de determinadas proteínas plasmáticas e hormônios. Nas doenças hepáticas agudas e crônicas, o metabolismo protéico está alterado em virtude da redução da massa hepática funcional, da derivação porto-sistêmica e das alterações hormonais sobre o metabolismo protéico muscular (BORGES *et al.*, 2004).

O aumento do catabolismo protéico pode ser visto precocemente na cirrose. As deficiências protéicas aumentam conforme a disfunção hepática progride. Alterações no metabolismo dos aminoácidos podem estar presentes. Ocorre aumento na oxidação da leucina. Tirosina e cisteína tornam se essenciais na doença hepática crônica. O aumento da proteólise é evidente e não é suprimido pela alimentação (CAMPOS, MATIAS & COELHO, 2002). A deficiência de reservas de gordura nestes pacientes pode ser resultante da somatória do aumento da proteólise, da síntese diminuída de ácidos graxos e lipólise aumentada.

2.2.7 Alteração no metabolismo dos lipídeos

Sabendo-se que o fígado é o órgão mais importante para a síntese de ácidos graxos poliinsaturados a partir de seus precursores essenciais, a deterioração na função hepática causa grave deficiência de ácidos graxos poliinsaturados (BORGES *et al.*, 2004).

Em pacientes com doença hepática avançada portadores de deficiências plasmáticas de ácidos graxos essenciais e de ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa ocorre redução na concentração plasmática de ácidos graxos em geral. Quando estas deficiências são importantes ocorre redução das frações lipídicas insaturadas do plasma. Este fato tem sido associado a maior gravidade, tanto da desnutrição quanto da doença hepática. Estes pacientes apresentaram perda do tecido celular subcutâneo e muscular (CAMPOS, MATIAS & COELHO, 2002).

Na insuficiência hepática ocorre redução da oxidação hepática de corpos cetônicos, por redução da atividade enzimática, nos outros tecidos orgânicos ela permanece normal. Portanto, é baixa a freqüência de cetoacidose na insuficiência hepática, ocorrendo, sim, na associação com ingestão excessiva de álcool e jejum alimentar.

2.3 REGENERAÇÃO HEPÁTICA

2.3.1 Considerações gerais

Desde a antiguidade, já se conhecia o fenômeno da regeneração hepática através da tragédia grega escrita por *Aeschylus*, 470 a.C. Neste clássico da mitologia grega, Prometeu roubou o fogo de Zeus e o entregou aos humanos como símbolo do intelecto e do saber. Zeus puniu-o cruelmente. Além de baní-lo, acorrentou-o no Monte Cáucaso, condenando-o a ser a vítima de um abutre, que se alimentava diariamente de seu fígado. Durante a noite o órgão sofria o processo de regeneração, o que proporcionava ao animal fonte eterna de alimento e, também, mantinha Prometeu vivo para sua tortura eterna (SERVI, 2005; MICHALOPOULOS & DEFRANCES, 1997).

A publicação de HIGGINS & ANDERSON, em 1931, foi um marco e conseguiu transformar a lenda de Prometeu em objeto de estudo experimental. Os autores realizaram hepatectomia de 67% em ratos e conseguiam provar a ocorrência da regeneração hepática. Após este, muitos outros estudos avaliando a regeneração hepática foram desenvolvidos. Em especial, o estudo de STOCKER, WULLSTEIN & BRAU (1973) validou o mito de Prometeu. Os autores realizaram, em ratos, 12 hepatectomias parciais consecutivas nos mesmos ratos e comprovaram a ocorrência da regeneração hepática após cada uma delas.

O termo regeneração é derivado do latim (*regenerare* = gerar outra vez) e é definido como reconstituição da forma, da função e da massa do tecido lesado. Está presente, nesta

forma conceitual, apenas nos répteis, pois os mamíferos não são capazes de recuperar a forma (MICHALANY, 2000). Apesar de biologicamente incorreto, o termo regeneração hepática é largamente utilizado, uma vez que a resposta induzida pelo dano tecidual hepático promove hiperplasia e hipertrofia compensatória do tecido remanescente até o restabelecimento da massa hepática primitiva. No entanto, os lóbulos ressecados não são recuperados (JESUS, WAITZBERG & CAMPOS, 2000; PALMER & SPIEGEL, 2004). Este fato sugere que o crescimento induzido por perda de tecido (ressecção hepática) seja controlado principalmente por fatores fisiológicos. Tais fatores parecem ser precisos, uma vez que o crescimento é interrompido quando o fígado restabelece o seu peso original, ou então, uma vez que este seja capaz de executar o trabalho metabólico necessário às demandas funcionais do organismo (KOUNTOURAS, BOURA & LYGIDAKIS, 2001).

2.3.2 O Fígado e os Hepatócitos:

O fígado é a maior massa glandular do organismo. É irrigado por sangue arterial via artéria hepática, e sangue venoso via veia porta. Fica localizado entre os vasos sanguíneos que transportam as substâncias absorvidas pelo tubo digestivo e a circulação sistêmica. Embora essa posição permita que ele seja o primeiro órgão a metabolizar essas substâncias, também faz com que ele seja o primeiro órgão a ser exposto a substâncias tóxicas ingeridas (ROSEN & PIMENTEL, 2005).

A unidade estrutural e funcional clássica do fígado é o lóbulo hepático. Este tem forma semelhante à de um prisma poliédrico. Em corte transversal é semelhante a um hexágono, com as tríades portais em seus ângulos e a veia centrolobular como estrutura central, atravessando longitudinalmente o lóbulo. Muitos autores atribuem ao fígado função endócrina e exócrina (ROSS & ROWRELL, 1993).

O fígado tem seu parênquima constituído principalmente por hepatócitos, que perfazem cerca de 80% da população celular e são os responsáveis por desempenhar a maior parte das funções deste órgão (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1995).

O hepatócito é uma célula de natureza epitelial altamente diferenciada e classificada como estável porque possui baixa taxa de duplicação. Em ratos, somente um hepatócito, entre cerca de vinte mil, pode estar se duplicando a qualquer momento. Contudo, sua capacidade de replicação, como acontece com as demais células estáveis, pode aumentar quando estimulada. Hepatócitos podem ser induzidos a sintetizar DNA e a se duplicar após hepatectomias parciais

ou administração de agentes hepatotóxicos, como o tetracloreto de carbono, o acetaminofem e o etanol (FAUSTO, 1986; PALMES & SPIEGEL, 2004; MICHALOPOULOS & DEFRANCES, 1997).

Microscopicamente, o hepatócito tem núcleo esférico, geralmente central. Os núcleos dos hepatócitos podem conter um ou mais nucléolos e aglomerados espalhados de cromatina (cariossomos), além de serem circundados por halo de cromatina. O citoplasma do hepatócito tem aspecto variado. Nos indivíduos bem alimentados, há áreas de ergastoplasma que representam basofilia devida ao ácido nuclear ribonucléico (RNA) e espaços irregulares e arredondados no citoplasma criados pela perda de glicogênio e lipídeos, respectivamente, durante a preparação histológica. Ao contrário, no indivíduo desnutrido, quando há esgotamento dos estoques de glicogênio e lipídeos, há redução do ergastoplasma e o citoplasma cora-se com razoável uniformidade pela eosina (ROSS & ROWRELL, 1993).

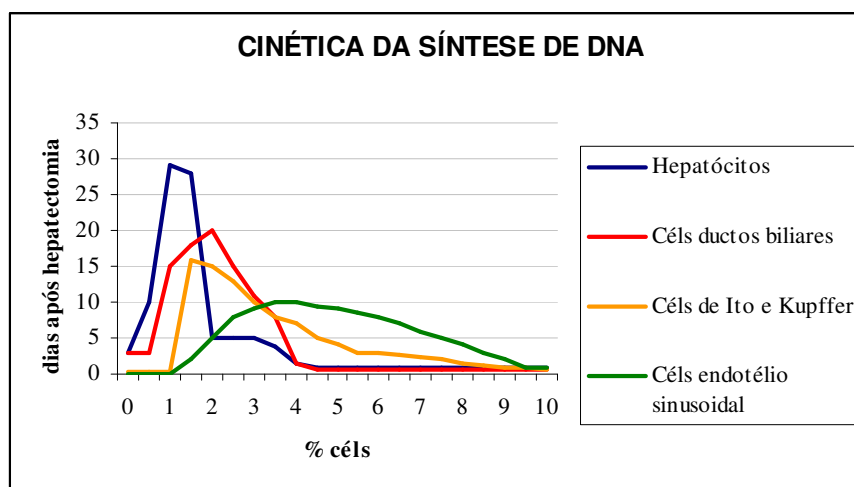
Após ressecção hepática, podem ser evidenciadas, precocemente, alterações nos hepatócitos. À microscopia ótica ocorre, inicialmente, o desaparecimento progressivo dos corpos basófilos no citoplasma, da periferia para o centro. Aparecem, após duas a três horas, numerosos vacúolos de gordura, os quais se acumulam de forma muito rápida e muito intensa. Ao mesmo tempo, os hepatócitos perdem rapidamente o seu conteúdo de glicogênio. Neste momento, ocorre também aumento do volume dos hepatócitos, em especial em seus núcleos e nucléolos. Os hepatócitos aumentados de volume comprimem os sinusóides, reduzindo a luz. Os nucléolos apresentam sinais de atividade, crescendo o seu diâmetro e aumento sua afinidade pelos corantes (CAMPOS & ANDRIGUETTO, 1986).

Para se estudar o processo de regenerativo é essencial que se entenda o ciclo celular. Ele é constituído de quatro fases distintas: G1, S, G2 e M. A fase G1 ou *gap 1* é a fase que as células preparam a síntese de DNA, e este processo preparatório não é visível ao microscópio ótico. A fase S se refere à síntese de DNA no ciclo celular. Durante esta fase ocorre a replicação comossomal de DNA na célula. A fase G2 ou *gap 2* é a fase onde a célula se prepara para a mitose ou para a divisão celular física. A fase M, ou fase mitótica, é a fase do ciclo celular mais aparente e pode ser facilmente reconhecida ao microscópio ótico (ASSY & MINUK, 1997; HASHIMOTO & SANJO, 1997). Transpondo essas informações para a replicação dos hepatócitos, encontraremos que a cinética da resposta proliferativa inicia-se pela síntese de DNA, que ocorre 12 a 16 horas após a hepatectomia parcial, sendo o pico máximo observado em 24 a 26 horas após a cirurgia. O aparecimento de mitoses sucede o início da síntese de DNA em seis a oito horas, atingindo o ápice 48 horas depois da cirurgia

(JESUS, WAITZBERG & CAMPOS, 2000; TARLA, RAMALHO, RAMALHO, CASTRO e SILVA, BRANDÃO, FERREIRA, CASTRO e SILVA & ZUCOLOTO, 2006; PISTOI & MORELLO, 1996). Tendo em vista que dois terços do tecido hepático são ressecados, a restauração do número original de hepatócitos requer, teoricamente, 1,66 ciclos proliferativos por hepatócito residual. Assim, maioria dos hepatócitos nos lobos residuais participará de apenas um ou dois eventos proliferativos (MICHALOPOULOS & DEFRANCES, 1997).

A proliferação do hepatócito inicia nas áreas lobulares, ao redor das tríades portais (espaço periporal), e depois progride para as áreas centrais em 36 a 48 horas. As outras células do fígado (células endoteliais, ductais biliares, de Kupffer e de Ito) iniciam a síntese de ácido nuclear desoxiribonucléico (DNA) aproximadamente 24 horas após os hepatócitos, com o pico de síntese de DNA 48 horas após a hepatectomia ou mais tarde. A cinética da proliferação celular e da produção de fatores de crescimento pelos hepatócitos em proliferação sugere que estes forneçam estímulo mitogênico que estimula a proliferação das demais células hepáticas. (GRÁFICO 01) (MICHALOPOULOS & DEFRANCES, 1997; BLACK, LYMAN, HEIDER & BEHRNS, 2004).

GRÁFICO 01: CINÉTICA DA SÍNTESE DE DNA NAS DIFERENTES CÉLULAS DURANTE O PROCESSO DE REGENERAÇÃO HEPÁTICA EM RATOS.



Fonte: adaptado de MICHALOPOULOS & DEFRANCES, 1997.

Talvez, mais notável que a capacidade dos hepatócitos se proliferarem é a sua capacidade de manter, simultaneamente a este processo, todas as funções essenciais para a homeostase. Essas funções incluem o metabolismo energético, armazenamento do glicogênio, síntese de glicose, fornecimento de ATP (adenosina trifosfato), metabolismo dos ácidos

graxos, síntese de proteínas envolvidas na coagulação, secreção da bile, biodegradação de toxinas, entre centenas outras funções. Poucas alterações nessas funções são percebidas quando restam apenas 30% do órgão e que 90% das células deste órgão residual estão em processo de proliferação ou mitose ou ambos (ROSEN & PIMENTEL, 2005; MICHALOPOULOS & DEFRANCES, 1997; COURT *et al*, 2002).

Alguns fatores intrínsecos aos hepatócitos controlam a fisiologia do fígado normal. São eles o glicogênio, lipídeos, vitaminas, eletrólitos e as organelas microscópicas, como as mitocôndrias e o retículo endoplasmático (FRANCAVILLA, OVE, POLIMENO, COETZEE, MAKOWKA, BARONE, VAN THIEL & STARZL, 1988).

Avanços recentes na compreensão da regeneração hepática têm sido obtidos com o advento da biologia molecular, cujas técnicas permitem o esclarecimento dos eventos que promovem e controlam a divisão celular (BLACK *et al*, 2004; RUDOLPH, TRAUTWEIN, KUBICKA, RAKEMANN, BAHR, SEDLACZEK, SCHUPPAN & MANNS, 1999). Muitos fatores de crescimento e citocinas estão envolvidos na regeneração hepática após hepatectomia parcial e estão resumidos no QUADRO 05 (FAUSTO, 2001). Eles podem ser divididos em mitogênicos, co-mitogênicos e inibidores. São considerados agentes mitogênicos: hormônio de crescimento; interleucina seis; fator de necrose tumoral alfa; substância estimuladora hepática e os fatores de crescimento do hepatócito, transformador alfa, de fibroblastos e epidérmico (BLACK *et al*, 2004; GORLA JR, FAGUNDES, PARRA, ZAIA, BANDEIRA & TAHA, 2001a; GORLA JR, FAGUNDES, PARRA, ZAIA, BANDEIRA & TAHA, 2001b). Os fatores ditos co-mitogênicos, que são capazes de pontencializar a regeneração hepática, são: norepinefrina, vasopressina, angiotensinas, insulina, glucagon, prostaglandinas, estrógeno, testosterona e fibronectina (KWON, UETSUJI, YAMAMURA, HIOKI & YAMAMOTO, 1990; BIONDO-SIMÕES, GRECA, SMANIOTTO, TECHY, SOARES, KANNENBERG, CASTRO & VASCONCELOS, 2000). Ainda não está bem definido quantos destes fatores são absolutamente necessários para a regeneração hepática após hepatectomia parcial. O que se sabe é que nenhum deles parece agir isoladamente e que maioria possui grande variedade de ações, alguns agem estimulando a proliferação, outros estimulam a divisão celular ou, dependendo de suas concentrações, podem inibir ou estimular o processo (FAUSTO, 2001; ZIMMERMAN, 2004; TARLA *et al*, 2006).

QUADRO 05: PRINCIPAIS CITOCINAS, FATORES DE CRESCIMENTO E FATORES DE TRANSCRIÇÃO ENVOLVIDOS NA REGENERAÇÃO HEPÁTICA.

<u>Citocinas</u>	<u>Fatores de Crescimento</u>	<u>Fatores de Transcrição</u>
<ul style="list-style-type: none"> • FNT • FNT R-1 • IL-6 	<ul style="list-style-type: none"> • TGF - α • EGF • KGF 	<ul style="list-style-type: none"> • Fator nuclear κB • STAT 3 • Proteína ativada 1

NOTA: EGF = fator de crescimento epidérmico. KGF = fator de crescimento do queratinócito. FNT = fator de necrose tumoral. FNT R-1 = fator de necrose tumoral receptor 1. IL-6 = interleucina 6. STAT 3 = Sinal transdutor e ativador da transcrição 3. TGF = fator de crescimento transformador. Adaptado de FAUSTO, 2001.

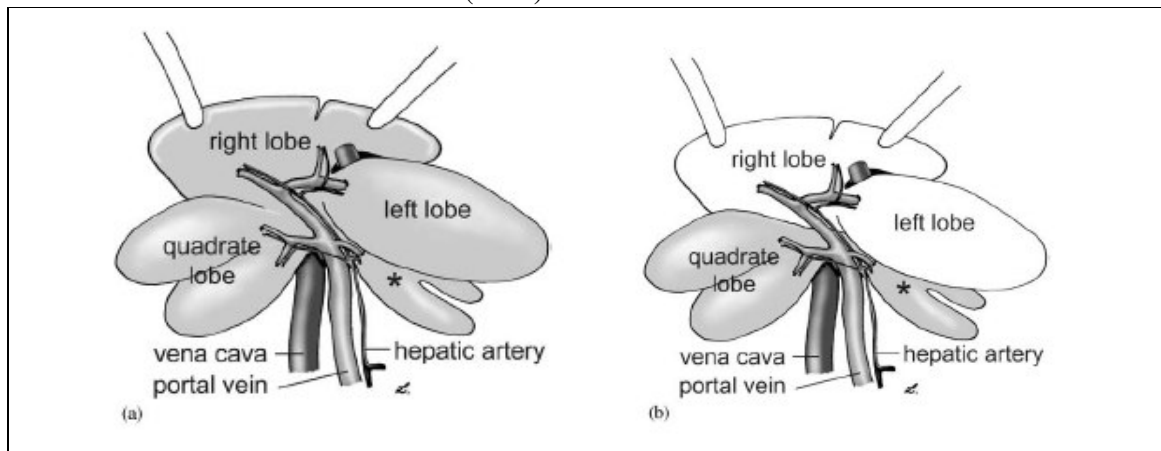
2.3.3 Hepatectomia Parcial a 70%

O modelo experimental proposto por HIGGINS & ANDERSON (1931), se consagrou ao longo dos anos e é tido como o melhor modelo para estudo da regeneração hepática. Constitui-se de operação simples, na qual dois terços do fígado são retirados, deixando os lobos remanescentes intactos (PALMES & SPIEGEL, 2004). (FIGURA 01)

A eficiência da síntese de DNA após a hepatectomia parcial está diretamente relacionada com o déficit tecidual. Em ratos adultos, com remoção inferior a 30% do parênquima hepático, não se verificou aumento da síntese de DNA. Do mesmo modo, com remoção superior a 80% da massa hepática, a regeneração induzida é menos eficiente do que a observada na hepatectomia parcial a 70% (FAUSTO, LAIRD & WEBBER, 1995; RAMALHO, RAMALHO, ZUCOLOTO, CASTRO e SILVA JR, 1993; TANG, HASHIMOTO, CHAO, ITOHK & MANABE, 1997; COURT *et al*, 2002).

A hepatectomia a 70% é o estímulo mais comumente usado para estudar a regeneração hepática porque tem a vantagem de induzir o processo regenerativo sem causar dano ao tecido hepático remanescente. É diferente de outros processos causados por agente hepatotóxicos ou virais, câncer ou cirrose, que estão associados a lesões e inflamação tecidual que reduzem a capacidade regenerativa dos hepatócitos. Além disso, com a hepatectomia parcial o início do estímulo regenerativo pode ser precisamente definido. (MICHALOPOULOS & DEFRANCES, 1997; TARLA *et al*, 2006).

FIGURA 01: ESQUEMA DA HEPATECTOMIA A 70% DESCRITA POR HIGGINS & ANDERSON (1931)



NOTA: (a) anatomia do fígado do rato; (b) em branco: lobos ressecados na hepatectomia a 70%. (*) lobo caudado. Figura adaptada de PALMES & SPIEGEL (2004).

Partindo deste conceito, inúmeros estudos avaliaram a influência de diversas substâncias, medicamentos, hormônios e até plantas medicinais no processo regenerativo hepático (BIONDO-SIMÕES *et al*, 2000a; BIONDO-SIMÕES, PANTE, GARCIA, MACEDO, MORAIS & BOELL, 2000b; PAPALAMPROS, FELEKOURAS, FILIS, ANGELOPOULOU, KOURELIS, TSAMANDAS & BASTOUNIS, 2002; MELO, SILVA, FAKHOURIT, MELO & LIMA, 2003; KWON *et al*, 1990; CASTRO E SILVA JR, SILVA, MELO, MELO, LIMA, ANTONIOLL & BAGNATO, 2003).

Os efeitos da manipulação nutricional na regeneração hepática também foram avaliados. YOSHIDA, YUNOKI, AOYAGI, OHTA, ISHIBASHI, NOAKE & KAKEGAWA, em 1995 avaliaram a influência da suplementação com glutamina no fígado remanescente após hepatectomia parcial em ratos. O estudo era composto por três grupos de dieta: controle, suplementação com solução de aminoácidos e suplementação com alanina-glutamina. Foi avaliado o índice de regeneração hepática através do peso do fígado e a incorporação de bromodeoxiuridina (BrdU). Os autores concluíram que a suplementação com glutamina aumenta o índice de regeneração hepática e reduz o índice de complicações pós-operatórias.

TREJO-SOLIS, CHAGOYA de SANCHEZ, ARANDA-FRAUSTRO, SANCHEZ-SEVILLA, GOMEZ-RUIZ & HERNANDEZ-MUNOZ em 2003 estudaram o efeito do pré-tratamento com vitamina E na regeneração hepática após hepatectomia parcial em ratos. Os métodos de avaliação foram o índice mitótico, o incorporação de BrdU e imunistoquímica

por PCNA, além das dosagens enzimáticas séricas. O estudo concluiu que a vitamina E inibe a síntese de DNA em 24 horas após a cirurgia.

ANDIRAN, AYHAN, TANEYL, ABBASOGLU & SAYEK, em 2000, mostraram que fígados cirróticos de ratos têm menor índice de regeneração quando comparados a fígados normais. A avaliação da regeneração hepática foi feita através da determinação do índice mitótico, da coloração com PCNA e da incorporação de BrdU. Contudo, ao suplementarem os ratos cirróticos com alfa-tocoferol, análogo da vitamina E, houve melhora no índice de regeneração hepática neste grupo. Os autores propõem que o alfa-tocoferol, provavelmente, limita as lesões induzidas pela reação com oxigênio e aumenta o fluxo sanguíneo, o que pode aumentar a concentração intra-hepática de fator de crescimento do hepatócito.

2.3.4 Influência da desnutrição na regeneração hepática

A regeneração hepática, fenômeno anabólico que vai utilizar em um tempo muito curto quantidades importantes de nutrientes destinados à elaboração de novas células, é fortemente influenciada pelo estado nutricional.

O fígado é um dos órgãos mais ativos no *turnover* protéico. Metaboliza os aminoácidos (principalmente de cadeia aromática) para suas necessidades imediatas e para os tecidos periféricos. Nas doenças hepáticas agudas ou crônicas, o metabolismo protéico está alterado em virtude da redução da massa hepática funcional. Logo, o fígado é um dos primeiros órgãos a serem afetados pela desnutrição protéica (BORGES *et al*, 2004).

Um primeiro enfoque experimental é aquele que estuda as repercussões do jejum sobre a regeneração hepática. STIRLING, LAUGHLIN & WASHINGTON, em 1973, mostraram que, quando a hepatectomia é precedida de período de jejum de 48 horas, os hepatócitos restantes conservam a capacidade de proliferar. No entanto, a atividade mitótica manifesta-se com um retardo de oito horas e sua intensidade diminui, quando comparado ao grupo controle.

TALARICO, FELLER & NEVILLE (1971), por sua vez, estudaram as conseqüências da administração de nutrição completa, porém desequilibrada nos seus constituintes. Os autores estudaram o índice mitótico no fígado restante, 20 horas após hepatectomia parcial, no rato alimentado nos sete dias que precederam a intervenção com nutrição especial. O estudo concluiu que a nutrição muito rica em proteínas ou em gorduras diminui a atividade mitótica de forma semelhante ao jejum pré-operatório de 24 horas.

Outro enfoque experimental constituiu em administração de nutrição incompleta. Estudo realizado por SIIMES & DALLMAN, em 1974, comparou a evolução da síntese de DNA e de RNA após hepatectomia parcial em dois grupos de ratos: 1. grupo controle, recebia ração normal contendo 26% de proteínas e 2. grupo experimento, recebia ração com baixa concentração de proteínas (3,5%). A síntese de RNA foi maior no grupo que recebeu alimentação pobre em proteínas. Esses animais apresentavam pico mais precoce de secreção de RNA. Inversamente, a síntese de DNA foi menos estimulada e retardada quando comparada com o grupo controle. Considerando-se que, através de manipulações nutricionais, era possível influenciar negativamente o processo, tornou-se imperativo pesquisar modificações do aporte nutritivo que favorecessem a regeneração hepática.

Em 1979, MCGOWAN, ATRYZEK & FAUSTO estudaram os efeitos de dieta hipoprotéica em ratos submetidos à hepatectomia parcial e concluíram que ratos submetidos a esta dieta tiveram aumento da síntese protéica e redução da degradação de proteínas hepáticas após hepatectomia parcial.

Estudo realizado por ANDRIGUETTO (1982) foi comparou a influência, sobre o índice mitótico, de diferentes regimes nutricionais, em três grupos de cães submetidos à hepatectomia a 65%. O primeiro grupo recebeu alimentação oral, através de ração balanceada de laboratório; o segundo grupo, nutrição parenteral com solução balanceada contendo aminoácidos essenciais e não essenciais e o terceiro grupo recebendo nutrição parenteral com solução enriquecida de aminoácidos de cadeia ramificada (82,5%). Essa última solução foi elaborada a partir das alterações observadas no aminoacidograma plasmático de cães submetidos à hepatectomia parcial. A infusão da solução rica em aminoácidos de cadeia ramificada permitiu aumentar, de forma significativa, o índice mitótico em relação ao grupo recebendo solução equilibrada de aminoácidos, e em relação ao grupo recebendo alimentação oral. Dessa forma, a compensação dos desequilíbrios do aminoacidograma plasmático permitiu estimular a regeneração hepática.

Em outro estudo CAMPOS (1984) procurou estudar as conseqüências da infusão de lipídeos com fonte calórica da nutrição parenteral em cães hepatectomizados a 65%. Foram comparados dois grupos de animais: um grupo recebia nutrição parenteral com solução de aminoácidos balanceada e 30cal/Kg/dia de origem glicídica, e o segundo grupo recebia a mesma solução de aminoácidos (0,25gN/Kg/dia) e 30cal/Kg/dia, sendo dois terços de origem glicídica e um terço de origem lipídica. O aporte de lipídeos correspondia a 1,1g/Kg/dia. Foram utilizados grupos controles recebendo a mesma solução de nutrição parenteral e

submetidos apenas à laparotomia. O autor pôde observar a boa tolerabilidade tanto clínica como biológica do aporte lipídico nesse modelo. A colesterolemia foi mantida no grupo que recebeu infusão lipídica, e decresceu significativamente no grupo sem lipídeos. A dosagem de lipídeos teciduais intra-hepáticos pode evidenciar diminuição significativa do teor de ácido linoléico no grupo que não recebeu lipídeos; no entanto, a sua infusão permitiu manter o teor de ácido linoléico estável. Finalmente, apesar dos índices mitóticos não diferirem entre os dois grupos, pode-se observar um efeito benéfico no padrão histológico do fígado em regeneração, nos animais que receberam lipídeos. Notou-se aspecto de proliferação celular mais homogênea, com poucas atipias celulares. Em contraste, no grupo que recebeu como fonte calórica apenas glicídios, onde se observou anisocitose importante.

MEAD, BRAUN, MARTIN & FAUSTO, em 1990, estudaram os efeitos da manipulação nutricional na regeneração hepática. Os autores estudaram ratos após hepatectomia parcial submetidos a diferentes tipos de regimes nutricionais. O primeiro grupo recebeu ração normal padrão, o segundo, recebeu dieta hipoprotéica por três dias e o terceiro recebeu apenas água e foi chamado de grupo jejum. O estudo demonstrou que a quantidade de DNA era maior no grupo dieta hipoprotéica após a hepatectomia parcial. Em uma segunda etapa eles suplementaram os três grupos com solução de aminoácidos a 50% e observaram que o grupo dieta hipoprotéica iniciou a síntese de DNA mais precocemente e em maior quantidade que os demais, os quais não tiveram o índice alterado pela suplementação.

SKULLMAN, IHSE & LARSSON (1990) estudaram a regeneração hepática em ratos desnutridos. A desnutrição foi induzida mediante a oferta de 25% da ingesta normal (*pair feeding*) ao grupo desnutrido por uma semana no pré-operatório e a mesma dieta foi no período pós-operatório. Demonstrando atraso no processo de regeneração neste grupo. Os mesmo autores, utilizando o modelo semelhante, em 1991, avaliaram o metabolismo energético destes animais e concluíram que a desnutrição, apesar das alterações encontradas no metabolismo energético, não influenciou a regeneração hepática após hepatectomia parcial em ratos (SKULLMAN, IHSE & LARSSON, 1991).

Estudo publicado por CARRILLO, CARNOVALE, FAVRE, MONTI & SCARPINI (1996) avaliou os efeitos da desnutrição na regeneração hepática de ratos jovens e velhos após hepatectomia parcial. Eles concluíram que a regeneração hepática não é influenciada pela desnutrição em ratos jovens e que os efeitos da idade se tornam mais evidentes quando os ratos são expostos a desnutrição.

2.3.5 Nutrição pré-operatória e regeneração hepática

STUDLEY (1936), estudo clássico demonstrou aumento da mortalidade em pacientes submetidos à cirurgia para úlcera duodenal que apresentavam perda maior do que 20% do peso habitual no pré-operatório. Dessa forma abriu novas perspectivas para o melhor preparo pré-operatório dos pacientes com o intuito de reduzir a morbi-mortalidade cirúrgica.

Há diversos estudos prospectivos e randomizados na literatura que avaliaram os efeitos da nutrição pré-operatória nos resultados cirúrgicos, com resultados conflitantes.

DESTSKY, BAKER, O'ROURKE & GOEL (1987) usaram a técnica de metanálise para avaliar a efetividade da nutrição parenteral total (NPT) pré-operatória. Foi demonstrada redução no índice de complicações em cirurgias de grande porte e redução no índice de casos fatais no grupo que recebeu NPT pré-operatória em relação ao grupo controle que não recebeu terapia nutricional. Por outro lado, foi relatado maiores índices de complicações iatrogênicas no grupo NPT. Os autores ressaltam, entretanto, que fatores como amplo intervalo de confiança, grande variação no tratamento entre os estudos, riscos de complicações iatrogênicas secundárias a NPT e potencial bias devido às falhas na metodologia dos trabalhos, devem ser considerados na interpretação desses resultados. Os autores concluem que até a data do estudo, o uso rotineiro de NPT pré-operatória em pacientes não selecionados submetidos à cirurgia de grande porte não é indicado, entretanto, esta intervenção pode ter utilidade em subgrupos de pacientes de alto risco tais como: 1. pacientes gravemente desnutridos submetidos à cirurgia de grande porte; 2. pacientes bem nutridos que desenvolvem complicações que resultam em períodos de íleo prolongados e ingestão nutricional inadequada e; 3. pacientes bem nutridos submetidos a cirurgias que resultam em períodos prolongados de ingestão inadequada de nutrientes.

KLEIN, KINNEY, JEEJEEHOY, ALPERS, HELLRSTEIN, MURRAY & TWOMEY (1997) reviram várias publicações e recomendações do Instituto Nacional de Saúde Americano (NIH), da Sociedade Americana de Nutrição Parenteral e Enteral (ASPEN) e da Sociedade Americana de Nutrição Clínica (ASCN). Os autores avaliaram 13 estudos clínicos prospectivos randomizados envolvendo 1250 pacientes submetidos ou não a NPT pré-operatória. Foi observado que os pacientes geralmente receberam NPT por ao menos sete a dez dias antes da cirurgia. Nove dos treze estudos demonstraram que pacientes que receberam NPT pré-operatória apresentaram menor índice de complicações pós-operatórias que nos grupos controles. Entretanto, apenas cinco estudos demonstraram diferença estatisticamente

significativa. A NPT proporcionou diminuição de aproximadamente 10% no risco de complicações pós-operatórias. Com relação à nutrição enteral pré-operatória os autores encontraram dois grandes estudos clínicos prospectivos e randomizados que compararam o uso de nutrição enteral pré-operatória com dieta oral *ad libitum*. A maioria dos pacientes estudados tinha o diagnóstico de neoplasia. A incidência geral de complicações foi menor nos pacientes que receberam nutrição enteral (12%) em relação ao grupo controle (30%).

A Sociedade Americana de Nutrição Parenteral e Enteral, ASPEN, por meio do seu *Board of Directors and the Clinical Guidelines Task Force* (2002) estabeleceu roteiro para a administração de nutrição parenteral e enteral em pacientes adultos e pediátricos. Segundo o consenso, a nutrição pré-operatória está indicada em pacientes desnutridos que irão ser submetidos à cirurgia gastrointestinal de grande porte. A recomendação é de nutrição por período de sete a quatorze dias se a cirurgia puder ser postergada.

Em 2002, um grupo de autores italianos introduziu o conceito de se oferecer nutrição pré-operatória com dieta enriquecida com nutrientes imunomoduladores a pacientes com pouca desnutrição e que serão submetidos à cirurgia de grande porte. Neste caso a dieta é ofertada com o intuito de modular o sistema imunológico e não somente renutrir o paciente (BRAGA, GIANOTTI, NESPOLI, RADAELLI & DI CARLO, 2002).

BRAGA *et al.* (2002) elaboram estudo para avaliar a efetividade da nutrição pré-operatória em relação à nutrição peri e pós-operatória na redução de complicações pós-operatórias. Foram utilizados pacientes com perda de peso pré-operatória superior a 10% e neoplasia gastrintestinal, que foram divididos em três grupos (suplementação oral pré-operatória; suplementação oral e enteral perioperatória e controle). Os autores relataram incidência de complicações pós-operatórias de 13,7% no grupo que recebeu nutrição pré-operatória, 15,8% no grupo que recebeu nutrição perioperatória e 30,4% no grupo controle. Os autores concluem que a terapia nutricional pré-operatória é tão efetiva quanto à administração perioperatória na melhora da evolução clínica.

Mais especificamente no tratamento de hepatopatas, a ESPEN (Sociedade Européia de Nutrição Parenteral e Enteral) publicou, no início deste ano, suas diretrizes para nutrição enteral e classificou a nutrição pré-operatória de pacientes cirróticos que serão submetidos à cirurgia de grande porte ou a transplante hepático com grau de recomendação A (PLAUTH *et al.*, 2006).

A nutrição pré-operatória também foi avaliada em estudos experimentais. BLANCHARD, STEIGER, O'NEIL, NAITO, SEBECK & SHAMBERGER (1979)

elaboraram estudo para avaliar os efeitos da desnutrição protéica no fígado de ratos. O estudo foi composto por três grupos: grupo 1 – controle, recebeu dieta normal; grupo 2 – aprotéica, recebeu dieta onde a caseína foi substituída por amido de milho por seis semanas e grupo 3 – renutrição, recebeu dieta aprotéica por seis semanas seguidas de realimentação endovenosa por sete dias. Os parâmetros avaliados foram os pesos dos ratos e dos fígados e a estrutura dos hepatócitos a microscopia óptica e eletrônica. Os autores encontraram redução de aproximadamente 30% no peso dos ratos recebendo dieta aprotéica. A dieta aprotéica também reduziu o número de organelas à microscopia eletrônica e apresentou maior acúmulo de gordura à microscopia ótica. Esses achados que foram revertidos com realimentação. A suplementação protéica endovenosa foi capaz de recuperar o peso dos animais.

Da mesma forma, WAITZBERG *et al.* (1989) mostraram que a realimentação de ratos desnutridos promove recuperação da composição corporal mesmo na existência de tumor maligno associado. Mais especificamente, MEAD *et al.*, 1990 comprovaram melhora da síntese de DNA nos hepatócitos após hepatectomia parcial em ratos submetidos à suplementação com aminoácidos após três dias de dieta hipoprotéica.

2.4 MÉTODOS PARA AVALIAÇÃO DA REGENERAÇÃO HEPÁTICA

Muitos são os métodos disponíveis para avaliar a regeneração hepática. Os métodos mais usados estão utilizados podem ser vistos no QUADRO 06.

Nesta sessão comentaremos apenas os métodos com importância para o presente estudo.

2.4.1 Peso do Fígado

Em estudos experimentais, as massas hepáticas ressecada e remanescente podem ser determinadas através da mensuração e cálculo dos pesos dos fígados através do peso dos animais. Obviamente, este método não está disponível para a prática clínica. Entretanto, a tomografia computadorizada e, mais recentemente, a ressonância magnética têm sido sugeridas como alternativas viáveis para este propósito. O problema é que o peso hepático varia muito de acordo com o depósito de lipídeos, carboidratos e com a presença de células inflamatórias. Por estas razões, o cálculo da massa do fígado como um marcador de regeneração hepática esta confinada ao uso em estudos experimentais em animais de

laboratório e raramente representa um parâmetro sólido (BERTICELLI, 2005; ASSY & MINUK, 1997).

QUADRO 05: MÉTODOS E MARCADORES DISPONÍVEIS PARA AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR

Nos tecidos	No soro
<ul style="list-style-type: none"> • Peso do fígado • Contagem de mitoses • Métodos de fase S • Timedina triciada • BrdU • Citometria de fluxo 	<ul style="list-style-type: none"> • TK • ODC • Fibronectina • AFP • EPF
<p><u>Expressão gênica</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Histona RNA 3 	
<p><u>Imunoistoquímica</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • PCNA • Ki-67 • DNA polimerase alfa • proteínas NOR 	

NOTA: AFP = alfafetoproteína; BrdU = incorporação de bromodeoxiuridina; EPF = fator precoce da gestação; Ki-67 = antígeno nuclear; ODC = ornitina descarboxilase; PCNA = antígeno nuclear de proliferação celular; proteínas NOR = proteínas regionais organizadoras do nucléolo; TK = timedinaquinase. Adaptado de ASSY & MINUK, 1997.

O peso do fígado de ratos após a hepatectomia parcial aumenta rapidamente nos primeiros três dias de pós-operatório. Nas duas semanas seguintes, o peso deve aumentar menos de 5%, para alcançar o seu peso original (com variação de 10%) (FAUSTO, 2001). Em seres humanos, apesar de rápido, o processo regenerativo é comparativamente mais lento. Após ressecção semelhante, sabe-se que o fígado histologicamente normal regenera-se em um a dois meses de pós-operatório, enquanto o patológico leva de três a cinco meses (BLACK *et al.*, 2004; RAMALHO *et al.*, 1993).

2.4.2 Contagem de figuras de mitose

A contagem de figuras de mitose em cortes histológicos é um método reconhecido e largamente utilizado para avaliar a proliferação celular. Um dos métodos consiste na incubação dos hepatócitos com cloreto de potássio e álcool, centrifugar a mistura, decantar o sobrenadante e espalhar sobre lâminas para serem avaliadas ao microscópio. Os esfregaços são corados com solução de McNeils e o número de figuras de mitose por 1000 células em campo de grande aumento é calculado (índice mitótico). Outro método utilizado para a contagem de figuras de mitoses e a confecção de lâminas de tecido coradas com hematoxilina-eosina (HE) e avaliadas ao microscópio ótico, no qual as figuras de mitose aparecem coradas em roxo (ASSY & MINUK, 1997). Existem muitos problemas com este método. Primeiramente, é raramente factível em humanos devido aos pequenos espécimes obtidos através das biópsias percutâneas. Segundo, mitose é um processo muito curto, ocupando apenas uma hora das 24 horas necessárias para se processar o ciclo celular completo. Considerando que a vida média de um hepatócito humano é de 300 dias, a chance de haver mitoses no momento do estudo é muito limitada. E em terceiro, a mitose é um evento região dependente, com atividade maior ocorrendo na zona hepática um (espaço periportal) e reduzindo gradativamente para as zonas dois e três (ASSY & MINUK, 1997).

ANDIRAN *et al.* em 2000 utilizaram a contagem da média de mitoses após contagem de dez campos consecutivos de grande aumento corados pelo HE, e observaram concordância com demais resultados da literatura. Eles usaram apenas figuras mitóticas evidentes. SELZNER & CLAVIEN, em 2000, também utilizaram a média da contagem das figuras de mitose, por campo de grande aumento, corados pelo HE ao avaliarem a regeneração hepática em ratos obesos. A contagem de figuras de mitose também foi utilizada para a avaliação da regeneração hepática de cães submetidos à hepatectomia parcial por CAMPOS (1984) e ANDRIGUETTO (1982).

2.4.3 Métodos Imunoistoquímico

A maioria das técnicas imunoistoquímicas são baseadas no uso de anticorpos contra moléculas endógenas como o Antígeno Nuclear de Proliferação Celular (PCNA), o Ki-67 e a DNA polimerase alfa, que são os métodos mais utilizados.

O PCNA é proteína auxiliar da DNA polimerase delta e seu peso molecular é de 36kD. Em células eucarióticas ele é essencial para a replicação do DNA. Sua expressão é ciclo celular dependente e começa a ser detectado ao final da fase G1. Seu pico ocorre na fase S (THEOCHARIS, AGAPITOS, MARGELI, GOUTAS, KITTAS & DAVARIS, 1997).

As técnicas de imunistoquímica são largamente utilizadas para demonstrar PCNA nos hepatócitos. Os espécimes de fígado são incubados com anticorpo anti-PCNA monoclonal primário. Em seguida, são titulados com um segundo anticorpo. Estreptovidina conjugada com hidrogênio peroxidase é aplicada e as células com PCNA positivo coram os núcleos com coloração marrom-avermelhada. As áreas de tecido são avaliadas em aumento de 400 vezes no microscópio ótico e são contados, randomicamente, cinco a dez campos, aproximadamente 1000 células por secção. Núcleos fortemente corados são considerados em fase G1 ou G2 do ciclo celular (ASSY & MINUK, 1997).

O PCNA tem como vantagens a boa correlação com outros marcadores de proliferação celular, bem como pode ser usado em material de arquivo, possibilitando estudos retrospectivos. As desvantagens do PCNA incluem a grande variedade de células intralobulares, levando a super ou sub-estimativas, dependendo da zona avaliada; alteração da intensidade da coloração quando a lâmina é exposta ao calor e a falta de consenso sobre o que considerar positivo, qualquer núcleo corado ou somente aqueles com coloração mais intensa (ASSY & MINUK, 1997).

Em 1994, THEOCHARIS, SKOPELITOU, MARGELI, PAVLAKI & KITTAS compararam a expressão do PCNA à incorporação de timidina triciada e atividade da timidinaquinase após hepatectomia parcial em ratos. Os autores encontraram estreita relação entre a incorporação da timidina e a expressão do PCNA, sugerindo que o PCNA poderia ser usado, com segurança, como marcado de regeneração hepática.

Em 1998, ASSY, GONG, PETTIGREW, PASHNIAK & MINUK publicaram estudo comparando as várias apresentações do PCNA à incorporação da timidina triciada - método clássico de avaliação da regeneração hepática. Eles realizaram hepatectomia a 70% em ratos e os resultados foram avaliados em 12, 24, 36 e 48 horas. Eles concluíram que a avaliação do PCNA por imunistoquímica tem resultados semelhantes aos encontrados com timidina triciada, com o pico em 24 - 36 horas.

Dois estudos avaliando a regeneração hepática em fígados patológicos encontraram correlação entre o resultado da coloração do PCNA quando comparado com a incorporação de BrdU (ANDIRAN *et al.*, 2000; SELZNER & CLAVIEN, 2000).

CORBIN, BUIST, VOLOTOVSKYY, PEELING, ZHANG & MINUK em 2002 comparam alguns métodos de avaliação do fígado após hepatectomia parcial em ratos. O estudo consistiu em grupos com vários graus de hepatectomia parcial e um grupo controle submetido apenas a laparotomia. Os parâmetros avaliados foram a incorporação de timidina triciada, a determinação do PCNA, a dosagem de bilirrubinas e realização da espectroscopia por ressonância nuclear magnética com fósforo-31 (Pi-31) *in vivo*. Eles mostraram que, 48 horas após a operação, os ratos do grupo hepatectomia a 70% apresentavam redução na produção de ATP/Pi, enquanto os ratos do grupo controle permaneciam com nível basal. O estudo do ATP/Pi seguiu padrão semelhante quando comparado aos marcadores de regeneração hepática. Enquanto os níveis de timidina triciada e PCNA estavam aumentados em 24 horas, houve redução da relação ATP/Pi, não pela diminuição do ATP, mas sim pelo aumento do fósforo intracelular.

2.5. ESTEATOSE HEPÁTICA

A esteatose hepática é problema comum encontrado na prática clínica. Resulta de grande variedade de etiologias, entre elas obesidade, diabete melito, intoxicação por álcool e algumas desordens metabólicas. A esteatose hepática também é frequentemente encontrada na insuficiência hepática, devido à capacidade hepática de síntese de lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) ser limitada e a lipólise extra-hepática estar ativada por atuação dos hormônios catabólicos. A esteatose hepática por si só, parece não exercer efeito deletério na função hepática. Este quadro pode ser revertido na correção da anormalidade primária, hepática ou não (BELLENTANI, BEDOGNI, MIGLIOLI & TIRIBELLI, 2004; CAMPOS, MATIAS & COELHO, 2002).

A mortalidade após ressecções hepáticas em fígado com esteatose moderada (30% - 60%) supera o índice de 10%, ao passo que não chega a 2% em pacientes com fígado não esteatótico (SELZNER & CLAVIEN, 2000; HUSSEIN, SZVALB, VAN DEN AKKER-BERMAN & ASSY, 2002; RAO, PAPREDDY, ABECASSIS & HASHIMOTO, 2001). A infiltração gordurosa moderada a grave do órgão tem sido implicada na origem da falência

primária do enxerto, e a maioria dos centros de transplante não utiliza esse tipo de órgão (SELZNER & CLAVIEN, 2000; VIANNA, 2005).

Após hepatectomia parcial algum grau de esteatose pode ser detectada nos exames histológicos. O mecanismo que regula o desenvolvimento e a resolução da esteatose após hepatectomia ainda não está completamente elucidado.

Em 2000, SELZNER & CLAVIEN estudaram o índice de regeneração hepática em ratos obesos com importante esteatose hepática. E concluíram que os ratos com fígado esteatótico tiveram a regeneração hepática afetada negativamente ao ser avaliada pelo PCNA, índice mitótico, incorporação da BrdU e porcentagem de regeneração pelo peso do fígado. Os ratos obesos tiveram pico do índice mitótico apenas no quarto dia de pós-operatório e também o aumento da mortalidade pós-operatória.

RAO *et al.*, 2001 estudaram a regeneração hepática em ratos após hepatectomia parcial. O estudo era composto por dois grupos, um controle e o outro com esteatose hepática e esteatohepatite induzida por dieta deficiente em colina. Os autores não encontraram diferença na regeneração hepática entre os dois grupos mediante o índice mitótico.

PICARD, LAMBOTTE, STARKEL, SEMPOUX, SALIEZ, BERGE & HORSMANS, 2002 estudaram o efeito da esteatose hepática na regeneração hepática 24 horas após a operação. Foram avaliados três tipos de esteatose hepática, ratos obesos, ratos alimentados com ácido orótico e ratos alimentados com dieta deficiente em colina e pobre em metionina. Este estudo concluiu que a esteatose por si só não parece alterar a capacidade de regeneração hepática em ratos após hepatectomia parcial.

SHTEYER, LIAO, MUGLIA, HRUZ & RUDNICK, em 2004, induziram esteatose hepática em camundongos através de dieta deficiente em leptina. O estudo demonstrou que mesmo os ratos com dieta padrão apresentam aumento da adiposidade hepática 12 a 24 horas após a hepatectomia parcial. Porém quando eles bloquearam a adipogênese com a suplementação com leptina observaram que a regeneração hepática também foi afetada o que sugere que a adipogênese precoce após hepatectomia auxilia, de alguma maneira, na iniciação da regeneração hepática.

3. MATERIAL E MÉTODO

Este estudo faz parte da linha de pesquisa em transplante de órgãos e tecidos do Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica da Universidade Federal do Paraná (UFPR). Foi realizado de acordo com as normas de pesquisa animal dispostas na legislação nacional, obedeceu aos Princípios Éticos na Experimentação Animal postulados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Sua normatização seguiu as recomendações do Sistema de Bibliotecas (SIBI) da Universidade Federal do Paraná (UFPR) estabelecidas nas Normas para Apresentação de Documentos Científicos (2001).

3.1 MATERIAL

3.1.1 Animais

Foram utilizados 30 ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), machos, com peso médio de $235,19 \pm 12,88$ g, oriundos do biotério de criação da UFPR, Curitiba-PR.

3.1.2 Ração padrão

Os ratos do grupo controle receberam ração peletizada Nuvilab-CR1[®] (Nuvital - Curitiba/PR) com composição básica demonstrada no QUADRO 07.

A mesma ração foi utilizada no período de realimentação do grupo renutrido.

3.1.3 Dieta aprotéica

Os ratos do grupo desnutrição e do grupo renutrição, na fase de desnutrição, receberam ração confeccionada artesanalmente conforme a composição descrita no QUADRO 08.

A dieta aprotéica utilizada foi descrita por MCGOWAN, ATRYZEK & FAUSTO em 1979 e utilizada por WAITZBERG, LIMA-GONÇALVES, BEVILACQUA, COLOGNI, ROCHA & GOFFI (1989). É baseada em teor próximo ao zero de proteínas, e as calorias são fornecidas quase que exclusivamente pelos carboidratos (90% das calorias totais).

QUADRO 07: COMPOSIÇÃO DA RAÇÃO UTILIZADA PARA ALIMENTAR OS ANIMAIS

COMPOSIÇÃO BÁSICA DO PRODUTO	
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).	
Carboidratos	48 %
Proteína bruta	22 %
Cálcio	1,4 %
Fósforo	0,8 %
Extrato etéreo	4 %
Material mineral	10 %
Matéria fibrosa	8 %
Valor calórico total (VCT)	4,5 Kcal/g
Vitaminas: A, D, E, K, B1, B2, B6, B12, niacina, ácido pantotênico, ácido fólico, biotina e colina.	
Micro elementos: ferro, zinco, cobre, iodo, manganês, selênio e cobalto.	

QUADRO 08: COMPOSIÇÃO DA RAÇÃO APROTÉICA UTILIZADA PARA DESNUTRIÇÃO DOS RATOS

COMPOSIÇÃO DO PRODUTO	
Amido de milho	90 %
Proteína bruta / celulose	0,6 %
Lipídeos/óleo vegetal	0,2 %
Valor calórico total (VCT)	4,61Kcal/g
Vitaminas: A, B1, B2, B6, B12, C, D3, E, K, niacina, ácido pantotênico, ácido fólico e biotina.	
Micro elementos: cálcio, cloro, cobre, estanho, ferro, fósforo, iodo, magnésio, manganês, potássio, selênio, zinco entre outros.	

3.2 MÉTODO

3.2.1 Considerações ambientais

O experimento foi realizado no Laboratório de Cirurgia Experimental do Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica da UFPR. As condições ambientais foram controladas eletronicamente (Cronomat[®], Mallory do Brasil, São Paulo-SP), sendo mantida temperatura de $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$ e ciclo claro-escuro de 12 horas.

Os animais foram identificados e mantidos em caixas de plástico com tampa de aço inoxidável, contendo no máximo quatro animais por caixa (FIGURA 02). Durante o período de aclimação de cinco dias antes do início do experimento os ratos receberam água potável e ração *ad libitum*.

3.2.2 Grupos de Estudo

Após o período de aclimação de cinco dias os animais foram pesados e divididos de forma aleatória em três grupos de acordo com o tipo de dieta que receberiam durante o experimento: grupo controle (CTL), grupo desnutrição (DNT) e grupo renutrição (RNT) com 10 ratos cada.

FIGURA 02: ANIMAIS DISPOSTOS EM SUAS GAIOLAS NO LABORATÓRIO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA DA UFPR.



Nota: caixas plásticas contendo animais dispostas na estante de aço. Laboratório de Cirurgia Experimental da Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica da UFPR.

3.2.3 Desenho do estudo

Os animais do grupo controle (CTL) receberam dieta padrão e água, *ad libitum*, por 15 (quinze) dias no período pré-operatório e a mesma dieta foi mantida durante a fase pós-operatória.

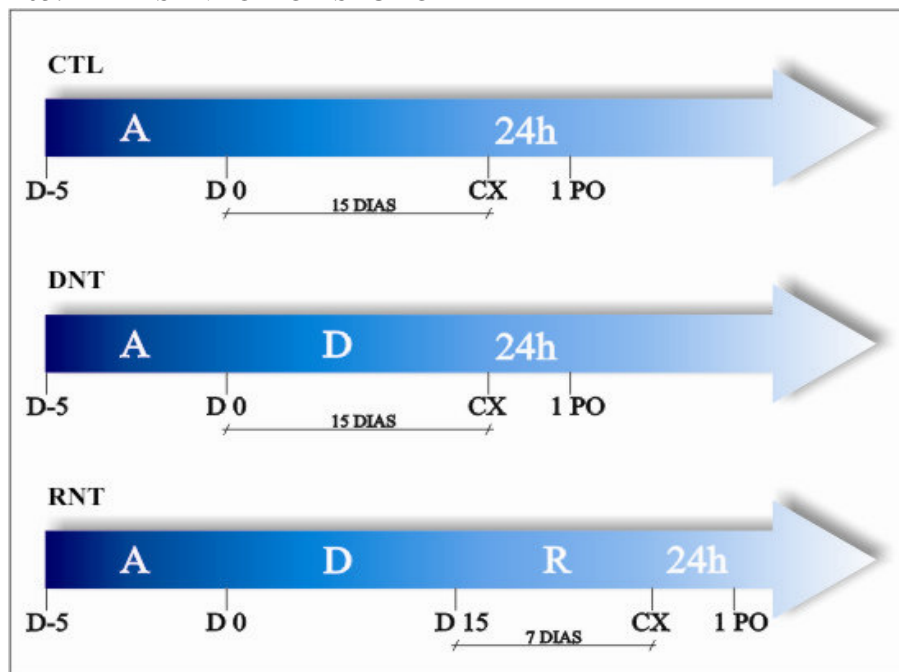
Os animais do grupo desnutrição (DNT) receberam dieta aprotéica e água, *ad libitum*, por 15 (quinze) dias, sendo mantida a mesma dieta durante a fase pós-operatória.

Os animais do grupo renutrição (RNT) receberam dieta aprotéica e água, *ad libitum*, por 15 (quinze) dias e foram realimentados com ração padrão e água, *ad libitum*, por sete dias antes da operação. Foram mantidos com a ração padrão no período pós-operatório.

A morte dos animais foi realizada com 24 horas de pós-operatório.

Adotou-se terminologia padronizada para designar os diferentes períodos do estudo e facilitar a interpretação dos resultados: fase de desnutrição (D); pré-operatório (PRÉ-OP); pós-operatório (PÓS-OP); dia final da desnutrição (D 15), fase de realimentação (R), dia da operação (CX) e 24 horas pós-operatório (1 PO).

FIGURA 03: DESENHO DO ESTUDO



LEGENDA: CTL = grupo controle; DNT = grupo desnutrição; RNT = grupo renutrição; A = período de aclimação; D = fase de desnutrição; R = fase de realimentação; D-5 = dia do início da aclimação; D0 = dia de início do experimento; D15 = dia final da desnutrição; CX = dia da operação; 1 PO = 24horas pós-operatório.

3.2.4 Confeção da dieta aprotéica

Neste estudo, a dieta foi confeccionada artesanalmente pela autora utilizando amido de milho em pó (UNILEVER BESTFOODS BRASIL – LTDA), óleo vegetal e complexo polivitamínico comercial (CENTRUM ® - Laboratórios Wyeth-Whitehall Ltda). Foi utilizado um comprimido de complexo polivitamínico para cada 100g de amido de milho em pó e 10ml de óleo vegetal (FIGURA 04). O produto em pó foi misturado com água e óleo até atingir consistência pastosa, com a qual foi possível simular os “*pelets*” da ração convencional (FIGURA 05). Posteriormente os “*pelets*” foram levados ao forno convencional, em fogo médio (200° C) até adquirirem consistência firme crocante, semelhante à ração padrão (FIGURA 06). Após resfriados em temperatura ambiente foram oferecidos aos animais *ad libitum*.

FIGURA 04: COMPONENTES DA DIETA APROTEICA



Nota: amido de milho, complexo polivitamínico, água e ao fundo: óleo vegetal.

FIGURA 05: *PELETS* DA DIETA APOTÉICA ANTES DE SEREM LEVADOS AO FORNO



Nota: ao fundo vasilhame com massa para *pelets* e no plano anterior *pelets* antes de irem ao forno.

FIGURA 06: *PELETS* DA DIETA APROTÉICA PRONTOS.



Nota: *pelets* prontos ao sair do forno.

3.2.5 Controle de peso

O controle de peso dos animais foi realizado no início do experimento (após a aclimação), semanalmente na fase de desnutrição e realimentação e nos dias da operação e no primeiro dia pós-operatório. Utilizou-se balança eletrônica (AM 5500[®] Marte, São Paulo, SP) para a aferição e a unidade utilizada foi o grama (g). As medidas serviram para avaliação nutricional.

3.2.6 Morbi-mortalidade

Durante o estudo, todos os eventos de morbi-mortalidade foram documentados, e esses animais foram excluídos do estudo.

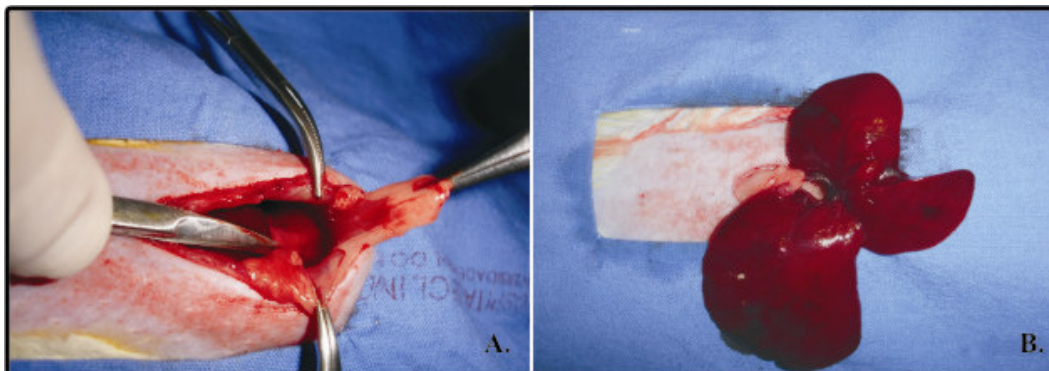
3.2.7 Ato operatório

A equipe cirúrgica foi composta por uma única cirurgiã (autora) e um auxiliar que deu suporte para as reavaliações e ajustes anestésicos. O animal foi submetido à anestesia inalatória com éter etílico e posteriormente fixado à mesa cirúrgica em decúbito dorsal, com elásticos de látex, colocando os quatro membros em extensão para expor o campo operatório. Em seguida, realizou-se degermação com polivinilpirrolidona-iodo (PVP-I) e tricotomia da região abdominal média. Foi utilizada laparotomia mediana de cerca de 4 cm de comprimento para dar acesso à cavidade abdominal, como mostra a FIGURA 07.

Após realização do inventário da cavidade, localizou-se o fígado e em seguida fez-se ressecção do ligamento hepático. Seguiu-se a ligadura do pedículo vascular para os lobos mediano e lateral esquerdo com fio de algodão 4-0 e posterior ressecção em bloco dos mesmos, resultando em hepatectomia parcial de aproximadamente 70%, conforme descrito por HIGGINS & ANDERSSON (1931) (FIGURA 08).

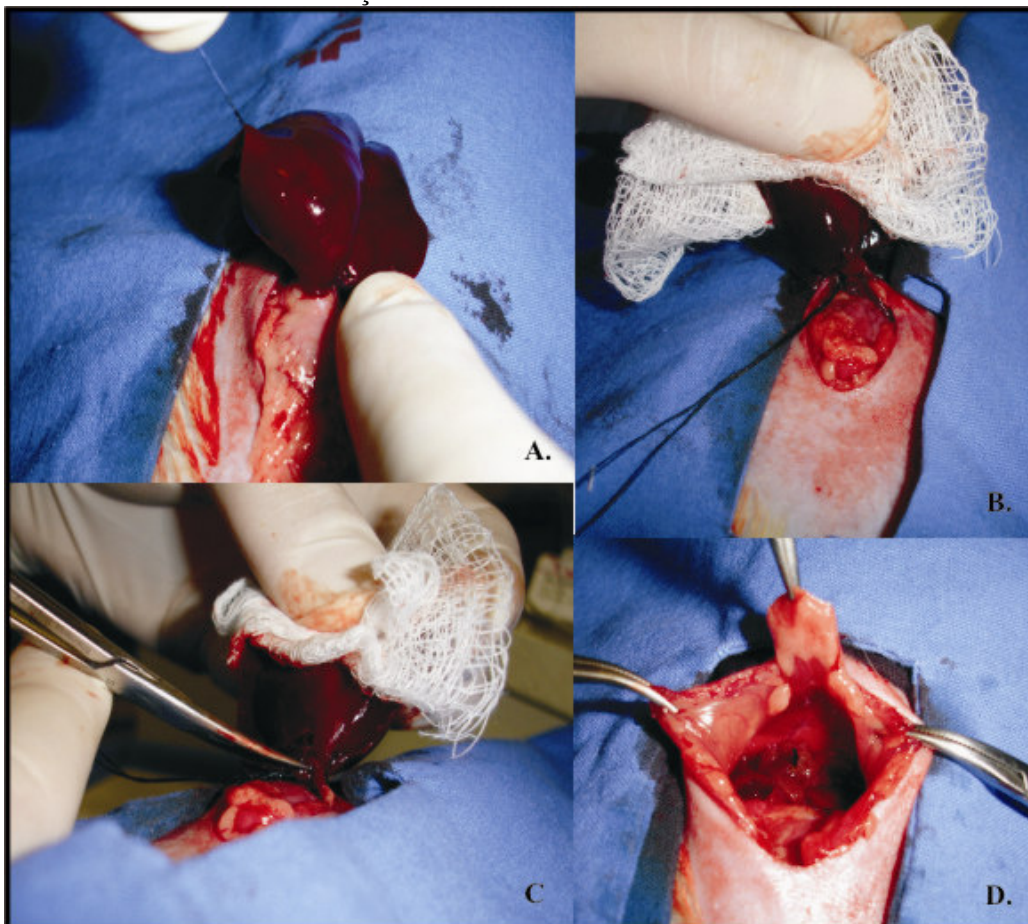
A hemostasia foi cuidadosamente averiguada e então se realizou a síntese cirúrgica da parede abdominal com fio de nylon 4-0 (Shalon, São Luis de Montes Belo, GO) em dois planos de sutura contínua (peritoneo-músculo-aponeurótico e cutâneo).

FIGURA 07: INÍCIO DO ATO OPERATÓRIO



NOTA: Após laparotomia mediana e inventário da cavidade, realizada secção do ligamento hepato-diafragmático (A) e exposição dos lobos a serem ressecados (B).

FIGURA 08: REALIZAÇÃO DA HEPATECTOMIA A 70%



NOTA: Passos da hepatectomia a 70%: A. ligadura do pedículo vascular para os lobos; B. final da ligadura do pedículo vascular para os lobos; C. secção do parênquima após ligadura; D. aspecto final evidenciando coto + lobos remanescentes.

FIGURA 09: LOBOS HEPÁTICOS RESSECADOS



3.2.8 Pós-operatório

A recuperação anestésica completa ocorreu dentro de sua própria gaiola aquecida com luz elétrica, em ar ambiente. O fornecimento de água e ração foi normalizado com duas horas de pós-operatório.

Os animais receberam dipirona em gotas, diluída na água, como analgesia pós-operatória na dose 5mg/ml, no pós-operatório imediato e durante o primeiro dia de pós-operatório.

3.2.9 Morte dos animais

No primeiro dia pós-operatório os animais foram mortos com dose letal de éter etílico em sistema fechado de campânula de vidro. (FIGURA 10). Imediatamente após constatação do óbito, cada rato foi submetido à laparotomia mediana com inspeção cuidadosa da cavidade.

O fígado remanescente foi localizado e cuidadosamente ressecado. Em seguida foi armazenado em frasco com formol tamponado a 10% para estudo anatomopatológico.

FIGURA 10: MORTE DOS ANIMAIS



Nota: rato na campânula após inalação de dose letal de éter

3.2.10. Histologia

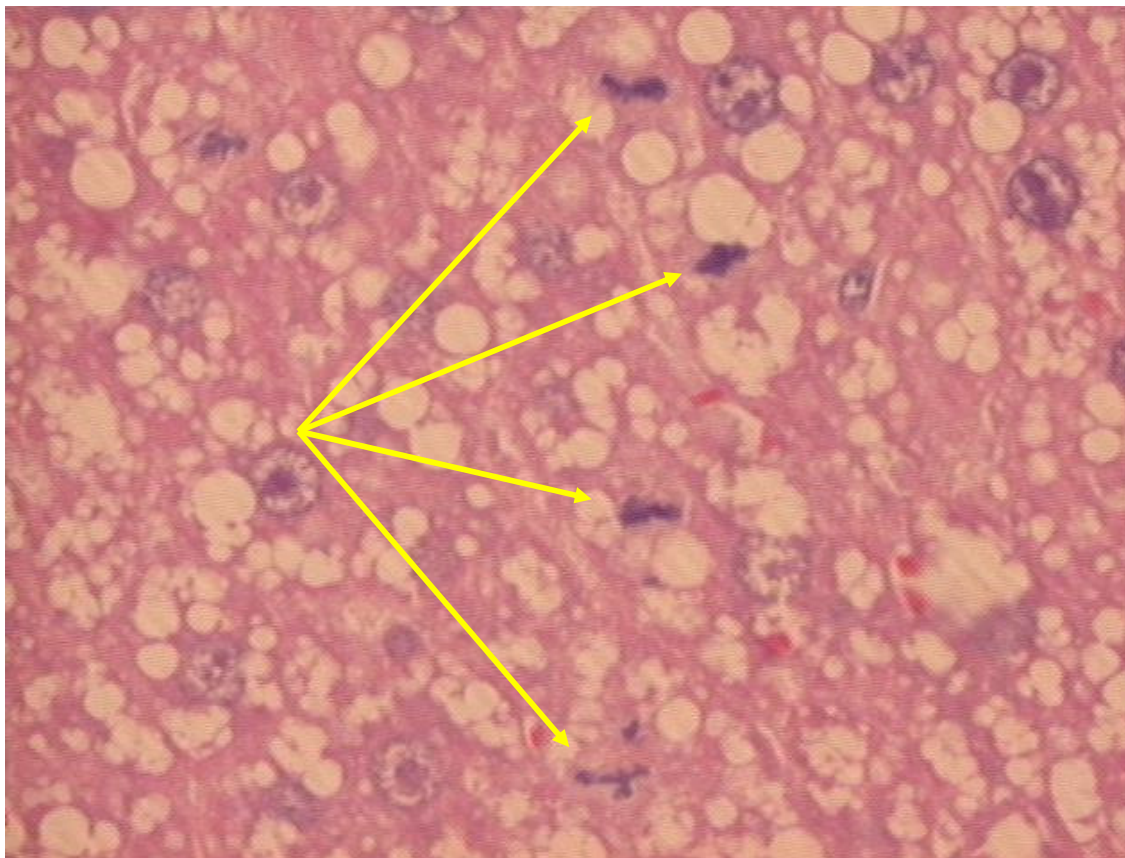
As amostras do tecido hepático foram submetidas a processos de desidratação e diafanização e posteriormente foram emblocadas em parafina. Para preparação das lâminas foram feitos dois cortes seqüenciais com micrótomo (5 μ m de espessura). Foram produzidas duas lâminas para cada espécime retirado, que foram coradas com Hematoxilina-Eosina (HE) e Antígeno Nuclear de Proliferação Celular (PCNA). Na seqüência os cortes foram desidratados e montados com bálsamo e lamínulas de vidro. Todas as lâminas foram analisadas, pelo mesmo patologista, sem a identificação de grupos ou dos animais.

Os cortes histológicos corados com HE foram estudados em microscópio da marca Olympus ® sob fonte de luz, com aumento de quatro, 20 e 40 vezes e as imagens foram captadas por câmera Sony ® CCR Íris, sendo enviadas ao monitor Sony ® Trinitron colorido e digitalizadas no Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná. A calibragem do sistema foi baseada na densidade ótica dos pontos de resolução (pixels) que formam a imagem. Todas as lâminas foram avaliadas sob as mesmas condições de regulagem e pelo mesmo observador.

A coloração de HE foi utilizada para análise da contagem das figuras de mitose e determinação do grau de esteatose.

A contagem de mitoses foi utilizada com o objetivo de quantificar a replicação celular para isso, contou-se o número de mitoses por campo de grande aumento (40 vezes), num total de vinte campos, conforme utilizado por muitos autores (ANDRIGUETTO, 1982; CAMPOS, 1984; ASSY & MINUK, 1997; THEOCHARIS *et al*, 1997; BIONDO-SIMÕES *et al*, 2000a; BIONDO-SIMÕES *et al*, 2000b; RAO *et al*, 2001; MELO *et al*, 2003), como demonstrado na FIGURA 11.

FIGURA 11: FOTOMICROGRAFIA EVIDENCIANDO FIGURAS DE MITOSE EM CORTE HISTOLÓGICO CORADO COM HEMATOXILINA / EOSINA



NOTA: mitoses evidenciadas em campo de grande aumento (setas)

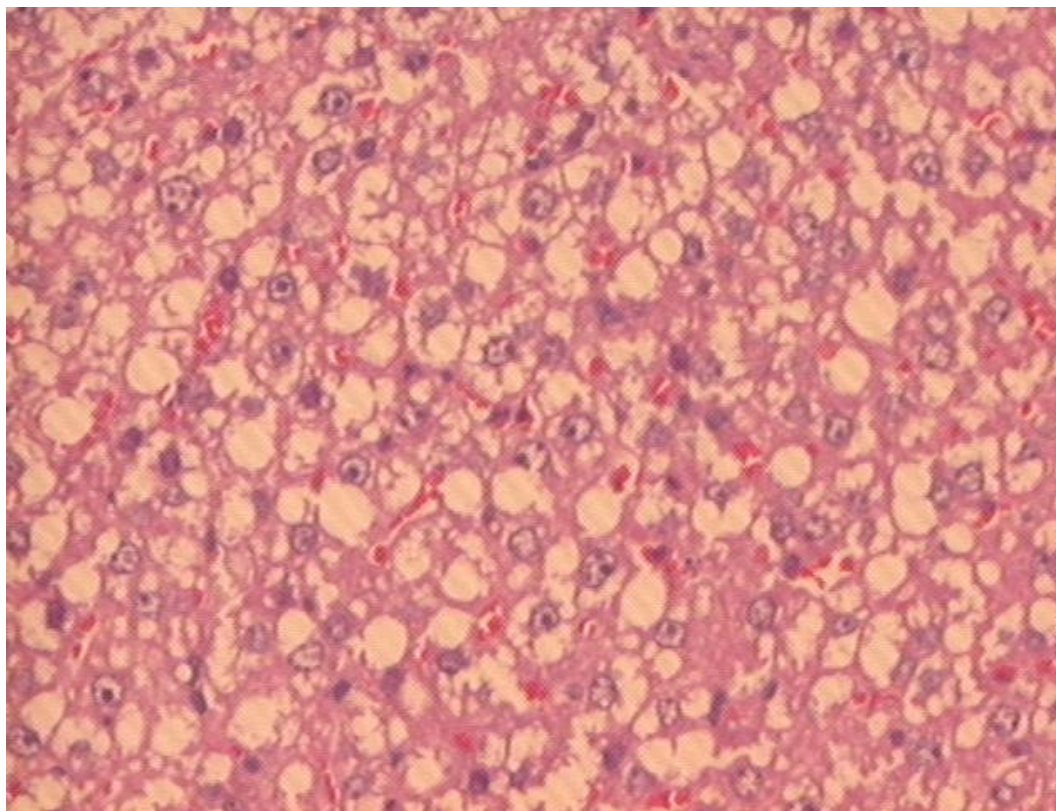
O grau de esteatose foi avaliado através da visualização panorâmica da lâmina (aumento de quatro vezes), e sua quantificação expressa em porcentagem (PICARD *et al*, 2002; SPANNBAUER, OLESZCZUK, TANNAPFEL, BLÜHER, PIETSCH, HENGSTLER, DONAUBAUER, MADAJ-STERBA, FÜRLI, SCHUHMACHER, THIERY, HAUSS & SCHÖN, 2005; MITTENDORFER, JESCHKE, WOLF & SIDOSSIS, 1998; SHTEYER,

LIAO, MUGLIA, HRUZ & RUDNICK, 2004). Utilizou-se a classificação descrita por MAZZA, BERTEVELLO, TORRINHAS, NONOGAKI, ALVES, ROGRIGUES & WAITZBERG (2003) e pode ser vista no QUADRO 09.

QUADRO 09: CLASSIFICAÇÃO DO GRAU DE ESTEATOSE (%)

Nível	Porcentagem de acometimento da lâmina
Nível 0	Ausente
Nível 1	1 – 25%
Nível 2	25 – 50%
Nível 3	50 – 75%
Nível 4	Acima de 75%

FIGURA 12 FOTOMICROGRAFIA EVIDENCIANDO ESTEATOSE - CORTE HISTOLÓGICO CORADO COM HE



NOTA: esteatose em aumento de 20 vezes – grupo DNT

Para o estudo imunistoquímico do PCNA utilizou-se a técnica descrita por HSU (1981). Foram utilizadas lâminas silanizadas para se evitar o descolamento dos cortes histológicos durante a coloração. Os cortes foram submetidos à desparinização e hidratação, sendo então imersos em tampão citrato, pH 6,0, para recuperação antigênica em banho-maria a 98°C por 20 minutos; foram novamente colocados em solução tamponada de citrato. Aplicado o sistema de bloqueio da biotina e na seqüência foram aplicados os anticorpos primários anti-PCNA (*Monoclonal, Código 0879, DakoCytomation – Capintéria, EUA*) incubados por 30 minutos à temperatura ambiente e aplicado a solução de união que contém os anticorpos secundários. Posteriormente retirou-se o excesso da solução de cada lâmina adicionou-se o conjugado peroxidase-estreptavidina. A contracoloração foi feita com *fast green* com adição de sulfato cúprico.

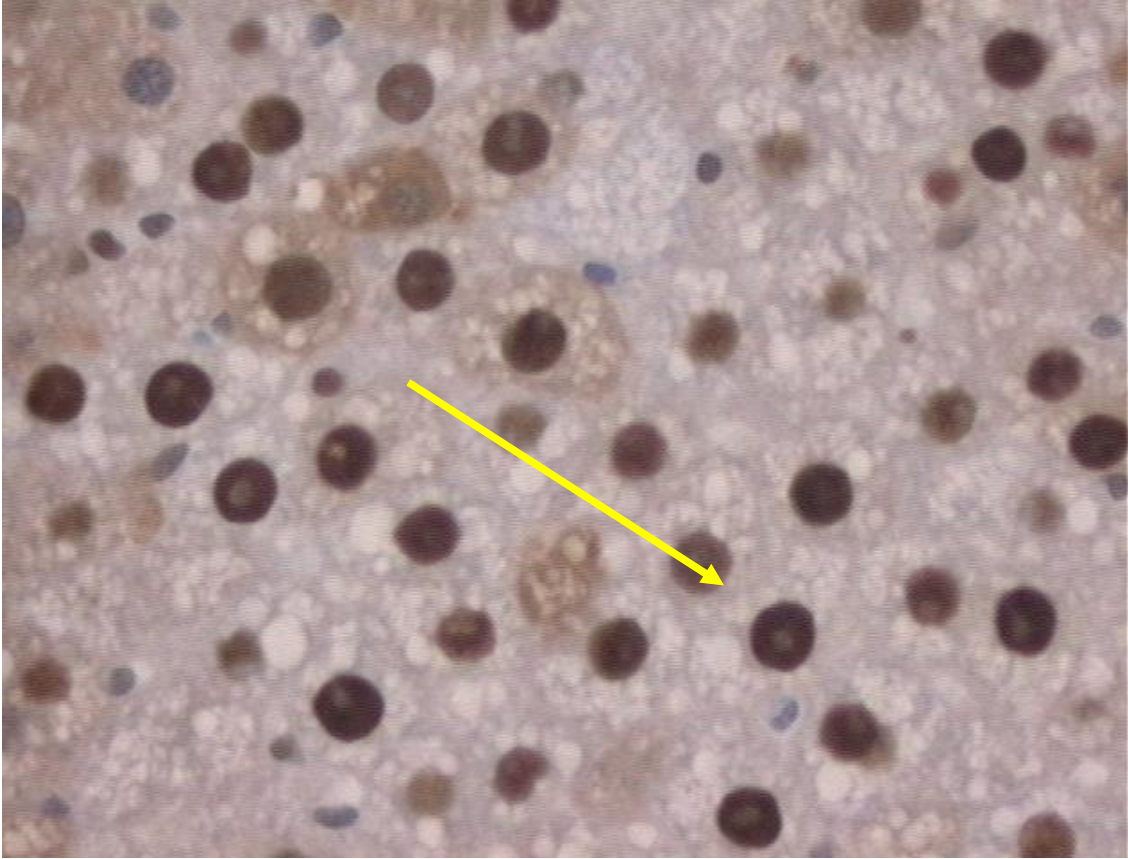
A avaliação do PCNA, utilizada para determinação da atividade nuclear, foi realizada contando-se as células positivamente coradas pelo anticorpo monoclonal anti PCNA em vinte campos de grande aumento (objetiva 40x), correspondendo à área de 17839,38 micrômetros quadrados. Somente hepatócitos com aparência típica foram contadas. A positividade da coloração imunistoquímica foi identificada nas áreas de pigmentação acastanhada. Controles positivos e negativos foram utilizados (ASSY & MINUK, 1997; TOLENTINO, FERREZ, OLIVEIRA, RAMALHO, RAMALHO, ZUCOLOTO & CASTRO e SILVA JR, 2003; ASSY *et al*, 1998; GAGLIO, LIU, DASH, CHENG, DUNNE, RATTERREE, BASKIN, BLANCHARD, BOHM JR, THEISE & LaBRECQUE, 2002) (FIGURA 13).

3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Procedeu-se ao tratamento estatístico conforme a natureza dos dados dos grupos CTL, DNT e RNT. Observou-se o pré-requisito da distribuição normal (Gaussiana) das variáveis para a escolha do teste estatístico, com os todos os resultados expressos como média \pm erro-padrão. Em todos os testes estatísticos, o nível de significância adotado foi $p < 0,05$.

Na análise não-paramétrica foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis apenas para as comparações do peso dos ratos no grupo RNT entre os dias CX e 1 PO. Para as demais comparações foi utilizada a análise paramétrica com o teste t de Student.

FIGURA 13: FOTOMICROGRAFIA EVIDENCIANDO CORTE HISTOLÓGICO CORADO PELO PCNA



NOTA: campo de grande aumento (40x); na seta núcleo corado pelo PCNA.

4. RESULTADOS

4.1 MORTALIDADE

Dos 30 ratos do início da pesquisa, apenas dois foram a óbito antes que completassem todas as fases do estudo, e foram excluídos da análise histológica. A taxa de mortalidade total foi de 6,7% e ocorreram em dois grupos: CTL e DNT. Não houve diferença significativa de mortalidade entre estes dois grupos. Não houve mortalidade no grupo RNT. Os óbitos foram relacionados a complicações anestésicas durante o ato operatório.

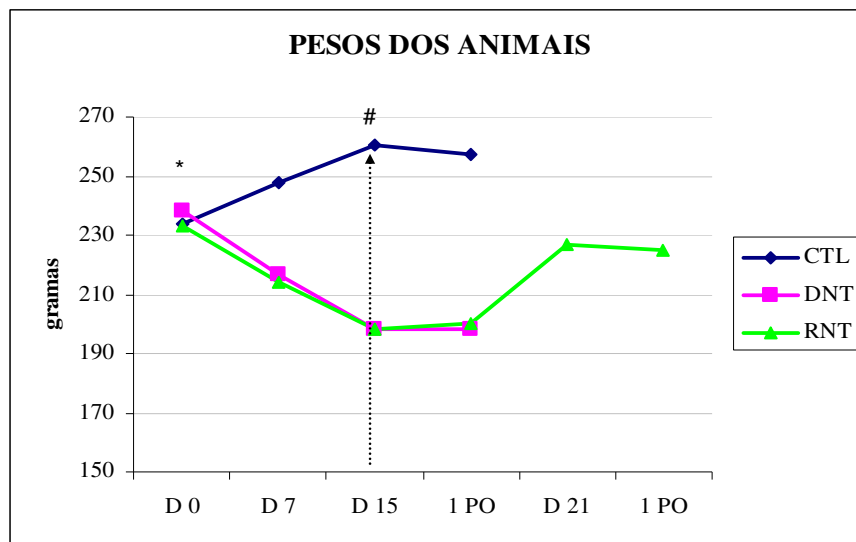
4.2 MORBIDADE

Não foram constatadas complicações relacionadas ao ato operatório nos grupos estudados.

4.3 PESO DOS ANIMAIS

O peso dos animais variou conforme o grupo e a fase do estudo (GRÁFICO 02) e as alterações foram analisadas dentro de cada um dos três grupos e entre os mesmos. Os dados foram comparados levando em conta os momentos mais críticos dessas variações: D0 (primeiro dia do experimento); D 15 (peso ao final da desnutrição dos grupos DNT e RNT e dia da operação nos grupos CTL e DNT); D 21 (peso ao final do período de realimentação e dia da operação do grupo RNT); 1 PO (peso no primeiro dia pós-operatório).

GRÁFICO 02: COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DOS PESOS (g) DOS RATOS DOS GRUPOS CTL, DNT E RNT, NOS DIAS 0; DIA 15; CX E SX.



Nota: Valores expressos em gramas (g) , Média ± Erro Padrão

* CTL: 234,07±3,6; DNT: 238,33±4,46 e RNT: 233,15±4,39 (p>0.05);

CTL: 260,20±6,10; DNT: 198,48±6,09 e RNT: 196,52±6,09
(CTL vs. DNT: p= 0,0001 e CTL vs. RNT: p = 0,0044);

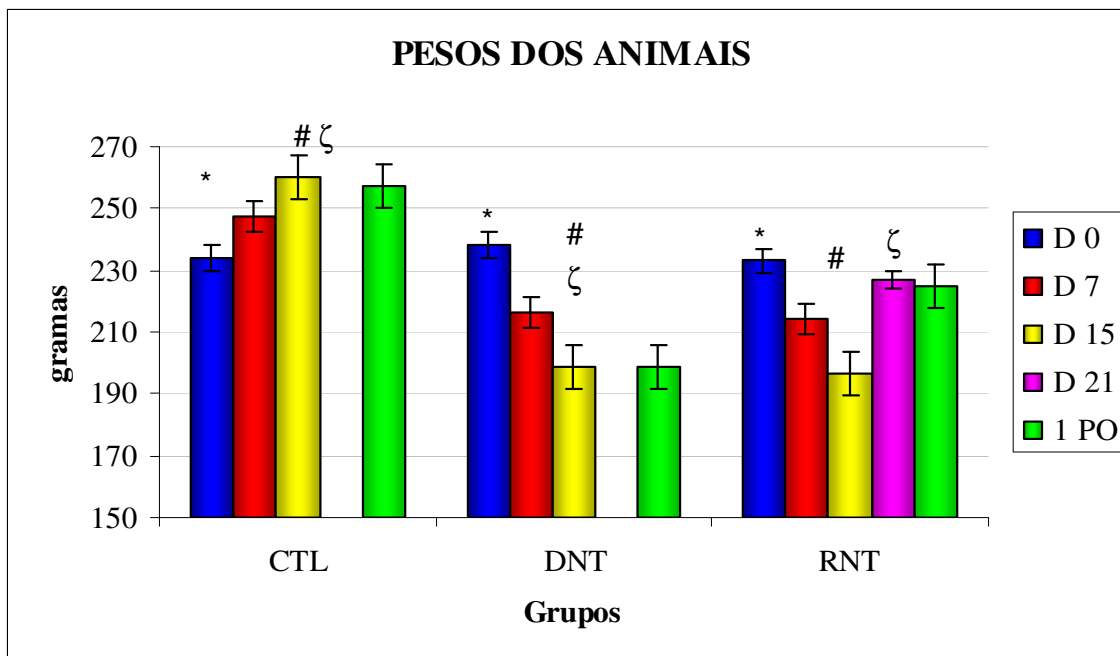
A diferença de peso entre o grupo CTL e os grupos DNT e RNT foi de 25% ao final do período de desnutrição. Após a renutrição diferença entre o grupo CTL e o grupo RNT foi de apenas 12,7%.

Na análise intragrupo, o grupo CTL obteve ganho ponderal médio de 11,12% durante a fase inicial, sendo que durante esse período o aumento atingiu diferença significativa. No período entre o dia da cirurgia e o primeiro pós-operatório, houve pequena perda ponderal, que não apresentou diferença estatística, como demonstrado no GRÁFICO 03.

O grupo DNT teve perda de peso de 16,72% durante a fase de desnutrição, sendo esta diferença significativamente estatística. No período entre o dia da cirurgia e o primeiro pós-operatório, houve pequena variação do peso, que não representou diferença estatística (GRÁFICO 03).

No grupo RNT (GRÁFICO 03) observou-se perda de peso de 15,71% durante a fase de desnutrição e ganho ponderal de 15,47% durante a fase de realimentação.

GRÁFICO 03: COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DOS PESOS (g) NOS GRUPOS CTL, DNT E RNT ENTRE OS DIAS 0, 15, 21 e 1 PO.



Nota: Valores expressos em gramas (g) , Média ± Erro Padrão

* Dia 0: CTL: 234,07±3,6; DNT: 238,33±4,46 e RNT: 233,15±4,39 (p>0.05);

Dia 15: CTL: 260,20±6,10; DNT: 198,48±6,09 e RNT: 196,52±6,09 (CTL vs. DNT: p=0,0001 e CTL vs. RNT: p = 0,0044);

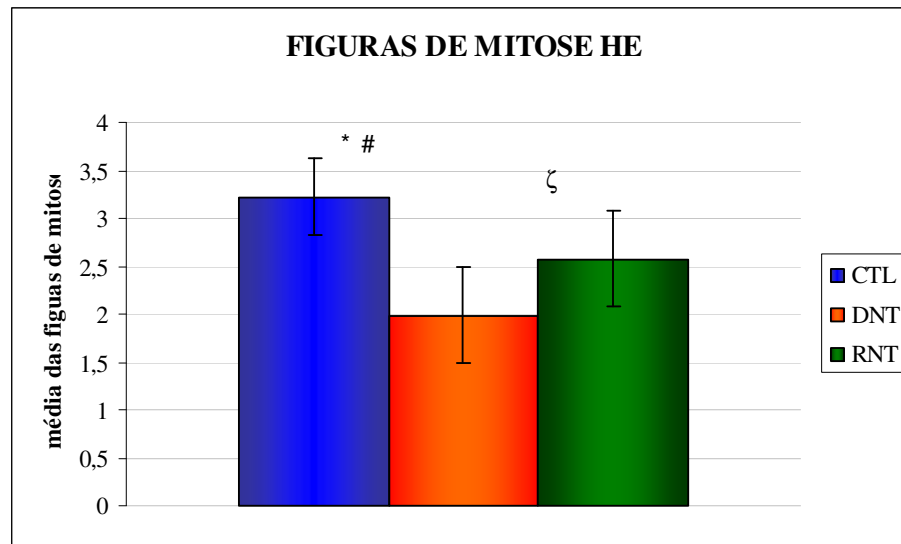
ζ CX (dia da operação): CTL: 260,20±6,10; DNT: 198,48±6,09 e RNT: 226,92±3,25 (CTL vs. DNT: p=0,001; CTL vs. RNT: p=0,004 e DNT vs. RNT: p=0,002)

4.4 VARIÁVEIS HISTOLÓGICAS

4.4.1 Contagem do Número de Figuras de Mitose

A diferença do número de mitoses entre os grupos CTL; DNT e RNT está demonstrada no GRÁFICO 04. Não houve diferença estatística na análise intergrupos (p>0,05) Um animal do grupo DNT apresentou sofrimento celular, e pequena quantidade de figuras de mitose foram identificadas. (FIGURA 14)

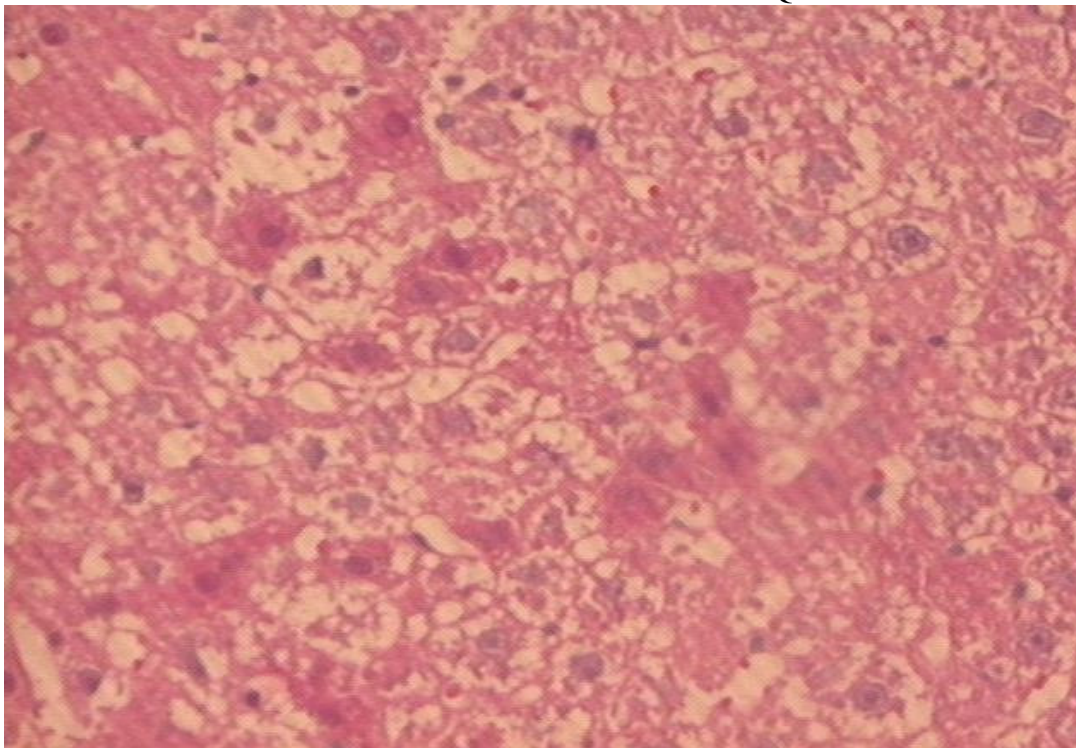
GRÁFICO 04: CONTAGEM DO NÚMERO DE FIGURAS DE MITOSE / HE NOS GRUPOS CTL, DNT E RNT.



Nota: Valores expressos médias de figuras de mitose (n), Média \pm Erro Padrão

* CTL vs. DNT: $p= 0,20$; # CTL vs. RNT: $p= 0,36$; ζ DNT vs. RNT: $p= 0,56$.

FIGURA 14: EXEMPLO DE SOFRIMENTO DE PARÊNQUIMA – GRUPO DNT

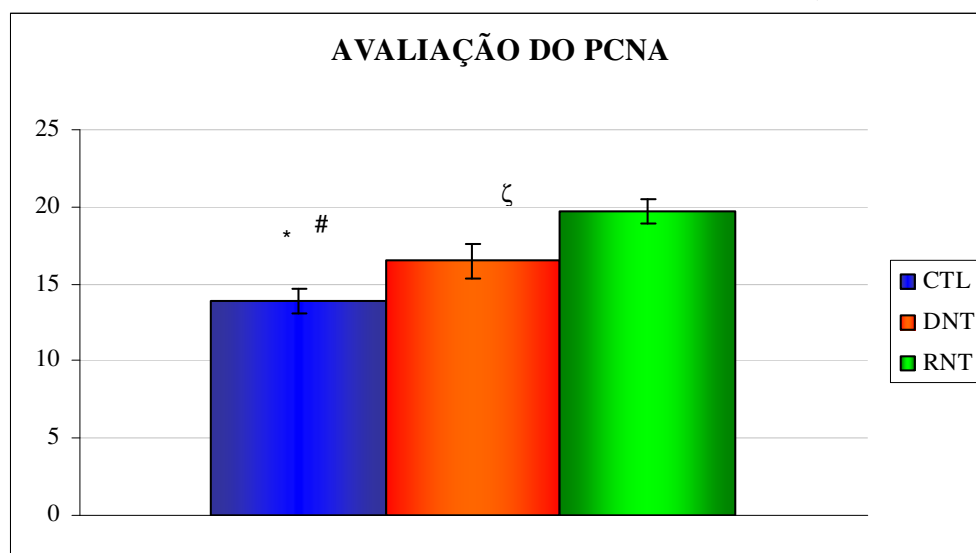


Nota: fotomicrografia demonstrando grande área de sofrimento tecidual e ausência de mitoses. (aumento 20x) Grupo DNT – animal 4

4.4.2 Avaliação dos núcleos corados pelo PCNA

A diferença da média dos números de núcleos corados pelo PCNA, considerados como PCNA positivo, entre os grupos CTL, DNT e RNT está demonstrada no GRÁFICO 05.

GRÁFICO 05: COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DOS NÚMEROS DE NÚCLEOS CORADOS PELO PCNA ENTRE OS GRUPOS CTL; DNT E RNT.

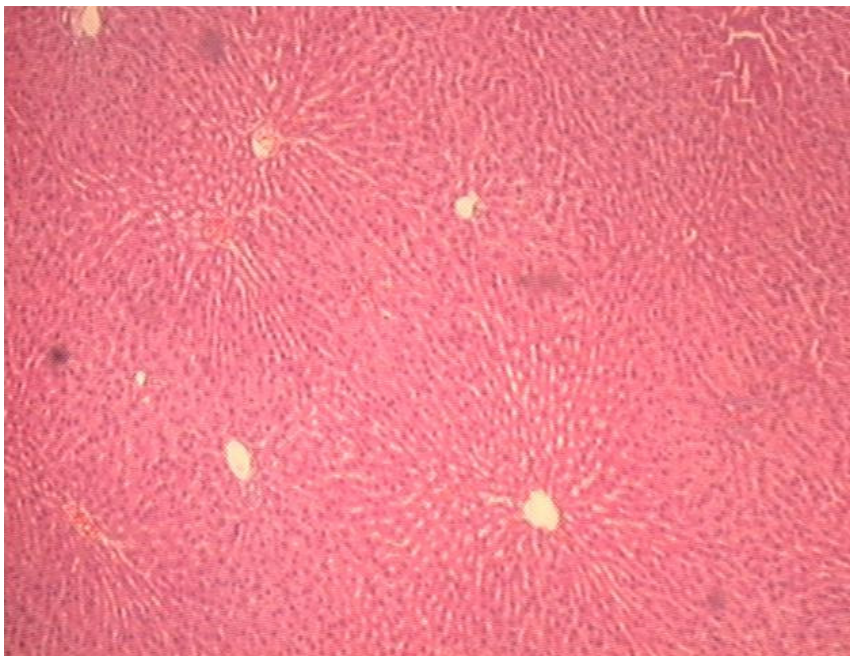


Nota: Valores expressos médias de núcleos corados pelo PCNA (n), Média \pm Erro Padrão
 * CTL vs. DNT: $p=0,10$; # CTL vs. RNT: $p=0,0003$; ζ DNT vs. RNT: $p=0,04$

4.4.3 Avaliação do Grau de Esteatose

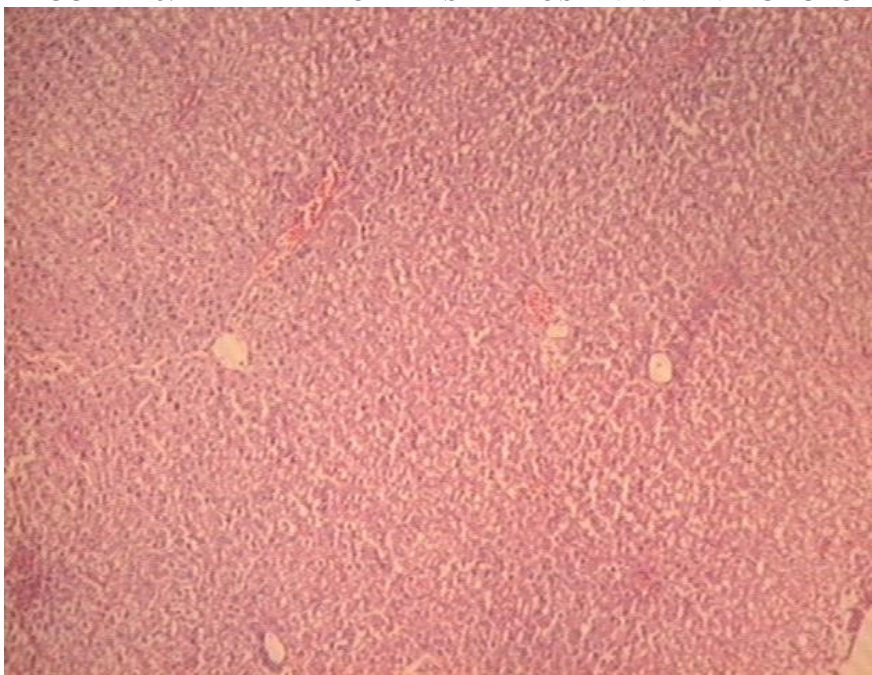
As médias de área ocupada por esteatose nos três grupos estão demonstradas nas FIGURAS 15, 16 e 17, valores expressos em média \pm erro padrão. Pode-se constatar aumento significativo da esteatose no grupo DNT ($p<0,001$). Os grupos CTL e RNT apresentaram esteatose nível I e tenha havido diferença estatística entre os dois resultados ($p=0,31$).

FIGURA 15: ESTEATOSE NÍVEL I- GRUPO CTL



NOTA: fotomicrografia de lâmina corada pelo HE, aumento 4x, demonstrando esteatose nível I; que correspondeu à área ocupada por $8,33\% \pm 2,63$ ($M \pm EP$) da lâmina.

FIGURA 16: EXEMPLO DE ESTEATOSE NÍVEL IV - GRUPO DNT



NOTA: fotomicrografia de lâmina corada pelo HE, aumento 4x, demonstrando esteatose nível IV; que correspondeu à área ocupada por $79,44\% \pm 5,43$ ($M \pm EP$) da lâmina.

FIGURA 17: EXEMPLO DE ESTEATOSE NÍVEL I - GRUPO RNT



NOTA: fotomicrografia de lâmina corada pelo HE, aumento 4x, demonstrando esteatose nível I; que obteve à área ocupada $12,50\% \pm 2,91(M \pm EP)$ da lâmina.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Neste estudo foi avaliado o efeito da desnutrição protéica na regeneração hepática em ratos após hepatectomia parcial

5.1 TRANSPLANTE HEPÁTICO

Disfunções hepáticas de várias etiologias podem progredir para insuficiência hepática não responsiva a terapia convencional e são indicações de transplante hepático. O transplante hepático ortotópico é aceito como terapia definitiva para grande variedade dessas doenças. No Brasil, em 2003, foram realizados 792 procedimentos em 54 centros de transplantes de fígado (VIANNA, 2005).

A escassez de doadores e a dificuldade em encontrar doadores para crianças com falência hepática terminal induziu o aparecimento de técnicas que utilizam segmentos do fígado adulto. São elas a bipartição hepática (*split-liver*) e o transplante com doador vivo (VIANNA & NERY, 2001).

Considerando-se que as duas técnicas acima utilizam apenas parte do fígado, pode-se inferir que nestes casos o processo de regeneração hepática é parte essencial para sucesso terapêutico, para restituição da massa hepática ressecada no doador como no receptor.

O estágio final da doença hepática crônica predispõe os pacientes a graus progressivos de desnutrição, que podem levar a elevada morbi-mortalidade cirúrgica. As alterações metabólicas que acompanham a cirrose terminal freqüentemente levam à desnutrição. Associado a isso, o transplante hepático causa importante trauma físico e necessita aplicação de drogas imunossupressoras, que cursam com efeitos colaterais associados, como a dificuldade de aporte alimentar, menor absorção digestiva e distúrbios do metabolismo intermediário e, ainda, com o aumento das necessidades energéticas. (SILVA & WAITZBERG, 2004) Todos estes fatores associados conduzem a piora do estado nutricional.

Já foi observado clinicamente que quando é transplantado um fígado pequeno-para-o-tamanho (*small-for-size*) do receptor, ocorre rápido aumento do tamanho do órgão e ele atinge tamanho semelhante ao normal para o receptor em aproximadamente duas semana (FRANCAVILLA *et al.*, 1988).

YAMANAKA, OKAMOTO, KAWAMURA, KATO, ORIYAMA, FUJIMOTO, FURUKAWA, TANAKA, TOMODA & TANAKA, em 1993, estudaram a regeneração

hepática em humanos através da tomografia computadorizada após hepatectomia por diversos motivos (hepatoma, metástases, doença benigna). Concluíram que a regeneração hepática em fígados cirróticos é mais lenta e incompleta. Aquele estudo mostrou que para o mesmo volume de ressecção, fígados normais regeneram duas vezes mais rápido no primeiro mês, quando comparado com fígados cirróticos, e geralmente recuperam seu peso original, enquanto os cirróticos não o fazem. Dosagens sistemáticas dos níveis de hormônios de crescimento sérico e/ou hepático em humanos após hepatectomia parcial ainda não foram realizadas.

A terapia nutricional pré-transplante tem por objetivo melhorar ou manter o estado nutricional e reduzir o peso de pacientes desnutridos, nutridos ou obesos, respectivamente. Já na fase aguda pós-transplante, o objetivo da terapia nutricional é promover a cicatrização adequada, fornecer energia para a regeneração dos hepatócitos, prevenir infecções e repor estoques de nutrientes.

5.2 O MODELO EXPERIMENTAL

5.2.1 Escolha dos animais

A dificuldade de avaliar clinicamente a regeneração hepática obriga que a maioria dos estudos seja realizada a partir de modelos experimentais. Boa parte deles, e esse estudo em particular, utilizam murinos para testar suas hipóteses. O rato é animal resistente, dócil, de baixo custo, prático em estudos experimentais, com boa resistência endógena à peritonite, a qual não influencia o processo de regeneração celular. Além disso, este animal possui regime de alimentação rudimentar, o que permite a introdução de alterações dietéticas com certa facilidade, bem como a análise das variáveis desejadas de maneira simples e objetiva (PULASKI, NOYES, EVANS & BRAME, 1954; PALMES & SPIEGEL, 2004). No entanto, apesar desses aspectos favoráveis, resultados dos estudos realizados em animais pequenos têm aplicação limitada para a espécie humana, porque há diferenças entre o tamanho e a anatomia dos fígados das duas espécies (PALMES & SPIEGEL, 2004).

Estudos envolvendo desnutrição de ratos revelam a alta taxa metabólica basal por unidade de peso desses animais, sendo que moderada depleção ponderal em rato adulto representa injúria comparável em gravidade à perda de peso em um humano recém-nascido. Além disso, a tolerância ao jejum também é muito menor no rato que no homem, pois curtos

períodos de jejum (menor que uma semana) geralmente são letais somente para o primeiro (GONÇALVES, 2005; SCHMITZ, 2006). Infelizmente, os modelos animais de desnutrição simulam apenas moderadamente a situação nos humanos. Isto porque os animais são alimentados com dieta deficiente em nutrientes específicos, objetos de estudo, com quantidade suficiente de todos os outros elementos. A dieta é oferecida de maneira programada, os animais são mantidos em condições ideais, com ciclo claro-escuro, e normalmente são protegidos das agressões externas, como doenças infecciosas (KEUSCH, 2003).

No presente estudo, os ratos aceitaram bem as dietas ofertadas e sua conclusão foi possível com baixa morbi-mortalidade, relacionada com os procedimentos anestésicos.

5.2.2 Morbi-mortalidade

Dois ratos morreram antes de completar o estudo, um no grupo CTL e outro no grupo DNT. Ambos ocorreram durante no início do ato cirúrgico, devido a acidente anestésico. Como já discutido previamente, apesar da anestesia com éter ser a melhor escolha para avaliar regeneração hepática ela possui problemas com o ajuste da dose, propiciando a perda de amostras. Outros estudos, que utilizaram éter como anestésico, também relatam perda de amostras durante o ato anestésico, é o caso do estudo de BIONDO-SIMÕES *et al.*, em 2000, onde três animais morreram devido à anestesia.

Não foram registradas complicações pós-operatórias neste estudo. PALMES & SPIEGEL (2004) apontam a baixa morbidade como sendo mais uma das vantagens do modelo de hepatectomia parcial a 70% em ratos. COURT *et al.* (2002) descreveram morbi-mortalidade praticamente nula, após hepatectomia parcial em ratos.

5.2.3 Anestesia

A anestesia é estado de inconsciência induzida. Os três componentes da anestesia são: analgesia (alívio da dor), amnésia (perda da memória) e imobilização. As drogas usadas para atingir a anestesia possuem efeitos variáveis sobre cada um destes campos. A anestesia inalatória é superior à maioria das formas injetáveis em termos de segurança e eficácia e fácil de ajustar à profundidade anestésica. Os agentes são eliminados do sangue pela expiração, diminuindo o risco de toxicidade droga-induzida. As desvantagens da anestesia inalatória são

os possíveis efeitos nocivos à equipe pesquisadora, principalmente com relação ao estoque e manuseio dos agentes (FERREIRA, 2004).

O anestésico utilizado foi o éter etílico devido a sua praticidade e pelo fato de não possuir potencial hepatotóxico, como gases halogenados, e não induzir o metabolismo de drogas ao nível do sistema microsomial hepático como os barbitúricos (BERTELLI, 1993). O uso de anestésicos por via intra peritoneal não foi possível devido à necessidade de manipulação do fígado e de se manter os lobos remanescentes intactos.

Embora o éter seja o anestésico mais adequado para avaliação da função hepática, a difícil regulação da dose necessária para a anestesia adequada causa não desprezível perda de amostras. No presente estudo, os dois óbitos foram relacionados com o procedimento anestésico.

5.2.3 Hepatectomia parcial a 70%

Com o conhecimento atual, talvez o fígado seja o órgão cujo controle da proliferação celular seja mais bem compreendido. Não obstante o enorme progresso, o universo da regeneração hepática permanece ainda com inúmeros territórios obscuros, que com o tempo serão explorados e conquistados.

Experiências com animais de laboratório demonstraram que o fígado intacto não é muito sensível a ação dos agentes mitogênicos. Hepatócitos *in vivo*, necessitam de estímulo primário para iniciar o processo de replicação. (FAUSTO, 2001; JIRTLE & MICHALOPOULOS, 1982).

O estudo regeneração hepática já foi realizado em cães (ANDRIGUETTO 1982; CAMPOS 1984); suínos (BERTICELLI, 2005; KAHN, HICKMAN & TERBLANCHE, 1988), macacos (GAGLIO *et al.*, 2002) e em humanos (NAKAGAMI, MORIMOTO, ITO, ARIMA, YAMAMOTO, IKAI & YAMAOKA, 1998; MAETANI, ITOH, EGAWA, SHIBATA, AMETANI, KUBO, KIUCHI, TANAKA & KONISHI, 2003; KAMEL, ERBAY, WARMBRAND, KRUSKAL, POMFRET & RAPTOPOULOS, 2003). Porém, devido às vantagens já expostas, a grande maioria dos estudos é realizada em ratos (MICHALOPOULOS & DEFRANCES, 1997; JESUS, WAITZBERG & CAMPOS, 2000; PALMES & SPIEGEL, 2004).

A técnica cirúrgica usada neste estudo baseou-se nos princípios da hepatectomia parcial a dois terços descrita por HIGGINS & ANDERSON (1931). Há grande variedade na

tradução do termo dois terços na literatura, diversos autores usam denominações desde 65 até 70% de ressecção do parênquima hepático. Neste estudo convencionou-se caracterizá-la por hepatectomia a 70%. Este modelo é muito utilizado por ser de fácil reprodução, bem tolerado pelos ratos, ter morbi-mortalidade quase nula e se poder precisar exatamente o momento do início do estímulo regenerativo (COURT *et al.*, 2002). Além disso, tem a vantagem de induzir o processo regenerativo sem causar dano ao tecido hepático remanescente. É diferente de outros processos causados por agente hepatotóxicos ou virais, câncer ou cirrose, que estão associados a lesões e inflamação tecidual que reduzem a capacidade regenerativa dos hepatócitos (MICHALOPOULOS & DEFRANCES, 1997; TARLA *et al.*, 2006).

Os modelos de regeneração medicamentosos possuem grande variabilidade do conteúdo gorduroso, do número de células inflamatórias, da hipertrofia dos hepatócitos e da quantidade de colágeno encontrada, o que torna a avaliação de seus resultados mais complexa e menos confiável (PALMES e SPIEGEL 2004).

Outra vantagem da hepatectomia parcial em ratos é que a anatomia deste animal é bem descrita e uniforme, o que praticamente anula a possibilidade do operador ressecar porções diferentes das descritas, conferindo grande acurácia ao método (PALMES & SPIEGEL, 2004).

Sabe-se, hoje, que a intensidade do processo de regeneração hepática está diretamente ligada à quantidade de parênquima ressecado. Já foi descrito que ressecções de 30% ou menos da massa hepática resultam em crescimento lento e desorganizado do fígado remanescente. Grandes ressecções envolvendo mais de 85% do tecido hepático causam alta mortalidade e regeneração deficiente (DELANY, JOHN, THE, LI, GLIEDMAN, STEINBERG & LEVERSON, 1994; FAUSTO, 2000; PALMES & SPIEGEL, 2004).

Há marcante similaridade entre os processos de regeneração hepática entre os animais de laboratório e os humanos. Logo, é razoável que se pense que os mecanismos que regulam a regeneração hepática também sejam similares, e que os conhecimentos adquiridos com os estudos experimentais em ratos possam ser aplicados ao tratamento dos humanos (FAUSTO, 1986). Os estudos experimentais sobre regeneração hepática após hepatectomia parcial podem ser aplicados clinicamente em pacientes após ressecções hepáticas por câncer, trauma ou transplante hepático (FAUSTO 2001).

Existem duas importantes considerações neste processo. A primeira é que os lobos ressecados durante a operação não voltam, mas sim os lobos remanescentes se expandem até

atingir o peso do fígado original. E segundo, o crescimento do fígado remanescente acontece mesmo após diversas hepatectomias (FAUSTO, 2000).

5.2.4 Data da morte dos animais

JESUS, WAITZBERG & CAMPOS (2000) separaram os eventos desencadeados após hepatectomia parcial em dois períodos distintos: o período pré-replicativo (de 0-14 horas) e o período replicativo (14-36 horas), caracterizando o processo de regeneração. Em estudos prévios diversos autores confirmaram que o pico de mitoses ocorre entre 24-28 horas para ratos após hepatectomia parcial. Este dado coincide com o pico máximo da síntese de DNA nos hepatócitos detectado pela timidina triciada (PISTOI & MORELLO, 1996; THEOCHARIS *et al.*, 1997).

Considerando que a cinética da resposta proliferativa inicia-se pela síntese de DNA e ocorre dentro de 12 a 16 horas após a hepatectomia parcial com o pico máximo observado em 24 a 26 horas após a cirurgia (JESUS, WAITZBERG & CAMPOS, 2000; COURT *et al.*, 2002; TARLA *et al.*, 2006), optou-se por realizar a avaliação dos animais com 24 horas de pós-operatório.

5.3 DESNUTRIÇÃO

5.3.1 O Modelo de Desnutrição

Para realizar esse estudo foi necessário causar desnutrição em ratos previamente eutróficos, simulando situação clínica encontrada freqüentemente em pacientes hepatopatas crônicos. Diversos métodos de desnutrição artificial são utilizados para esse propósito.

Apesar de que a ingesta calórica dos dois grupos pudesse ser controlada através do *pair-feeding* (GONÇALVES, 2005), esta técnica não foi usada por duas razões. A primeira, isto poderia restringir muito a ingesta de calorias pelos ratos dos grupos DNT e RNT, pois a maioria das dietas hipoprotéicas acarreta redução da ingesta por porção dos animais (SKULLMAN, IHLSE & LARSON, 1990; MEAD *et al.*, 1986). E segundo, com apenas uma pequena parte de alimento oferecido, os animais poderiam consumir toda a sua parte em pequeno espaço de tempo e permanecer o restante do tempo em jejum, esta alternância entre

jejum e realimentação poderia afetar a síntese de DNA (MCGOWAN, ATRUZEK & FAUSTO, 1979).

A aferição do déficit ponderal é um dos principais parâmetros para comprovar a desnutrição. O grupo CTL apresentou ganho de peso de 11,12% e ratos dos grupos DNT do grupo RNT cursaram com déficit ponderal de 16,72% e 15,71% ao final de 15 dias. Resultados semelhantes puderam ser encontrados quando analisamos estudos com o mesmo método de desnutrição (SIIMES & DALLMAN, 1974; BLANCHARD *et al.*, 1979; WAITZBERG *et al.*, 1989). Existem outros métodos de desnutrição protéica que apresentam resultados variados quanto à perda ponderal (MAZZA *et al.*, 2003; CUNHA, FRIEDLER, VAITSBERG, EGAMI & COSTA ROSA, 2003; SKULLMAN, IHLSE & LARSON, 1990). Este fato se deve às diferentes concentrações dos nutrientes nos diferentes métodos utilizados (FAUSTO, 2001).

Neste estudo, assim como nos anteriores, o objetivo de desnutrir os ratos foi obtido. A perda de peso dos grupos DNT e RNT somado ao ganho de peso do grupo controle mostrou a eficácia deste método de desnutrição, pois a diferença entre o peso encontrado e o estimado chegou a 25% e as diferenças dos pesos ao final da fase D foram estatisticamente significativas entre os grupos DNT e RNT em relação ao grupo CTL ($p < 0,01$).

O mecanismo pelo qual a manipulação nutricional aumenta a expressão de alguns protooncogenes na regeneração hepática ainda é desconhecido. O efeito pode ser consequência do estresse induzido pela mudança nutricional ou especificamente induzido pelas alterações nutricionais e as adaptações metabólicas que ela proporciona. Adaptações metabólicas ocorrem imediatamente após hepatectomia parcial causadas pelo aumento da demanda funcional requerida pelo fígado remanescente. Independente do método de desnutrição utilizado ocorre alteração na regeneração hepática após hepatectomia parcial e a manipulação nutricional favorece este processo (MEAD *et al.*, 1996).

Os animais submetidos à dieta hipoprotéica conservam proteína através da redução da degradação de proteínas. Este mecanismo parece ser importante componente para a resposta regenerativa após hepatectomia parcial em ratos, tanto naqueles submetidos à dieta hipoprotéica como a dieta padrão (MCGOWAN, ATRUZEK & FAUSTO, 1979).

SKULLMAN, IHSE & LARSSON (1991) concluíram que o suporte energético não é o único fator a influenciar a regeneração hepática e que a sua redução não prejudica este processo.

Após três dias de dieta hipoprotéica, os hepatócitos perdem aproximadamente um terço do conteúdo de proteínas. Após hepatectomia parcial os ratos do grupo dieta hipoprotéica falham em acumular proteína tão rapidamente como fazem com o RNA (MCGOWAN, ATRUZEK & FAUSTO, 1979).

5.3.2 Nutrição pré-operatória

A utilização da nutrição perioperatória dos ratos foi baseada em comprovações clínicas e experimentais de que a mesma pode melhorar os resultados pós-operatórios em situações de desnutrição (THE VETERANS AFFAIRS TOTAL PARENTERAL NUTRITION COOPERATIVE STUDY GROUP, 1991; BOZZETTI, GAVAZZI, MICELI, ROSSI, MARIANI, COZZAGLIO, BONFANTI & PIACENZA, 2000; BEATTIE, PRACH, BAXTER & PENNINGTON, 2000; GONÇALVES, 2005; PLAUTH, 2006).

No presente estudo, a renutrição foi capaz de reverter os resultados encontrados nos ratos desnutridos. Entretanto, não foi suficiente para atingir os valores do grupo controle. Resultados semelhantes foram encontrados por MCGOWAN, ATRYZEK & FAUSTO (1979) mostraram que o início da realimentação reativava a regeneração hepática após hepatectomia parcial submetidos a um pequeno período de jejum.

BLANCHARD *et al.* (1979) encontraram resultados semelhantes aos do presente estudo. Os autores relataram redução do peso dos ratos com dieta aprotéica e recuperação do peso com realimentação, porém não o suficiente para alcançar o grupo controle.

Atualmente a uso de dieta imunomodulada teve suas aplicações ampliadas (BRAGA *et al.*, 2002), desta maneira, o uso de dieta imunomodulada poderia induzir melhora nos resultados encontrados neste estudo.

Transpondo esses estudos para a prática clínica, MAIO, DICHI & BURINI (2000) concluíram, após revisão da literatura, que intervenções dietéticas podem melhorar o estado nutricional em pacientes com doença hepática crônica; reduzir as complicações, as hospitalizações e seus custos e melhorar a qualidade de vida dos pacientes.

5.3.3 Peso

Conforme demonstrado nos GRÁFICOS 02 e 03, as principais alterações ponderais ocorreram em períodos críticos: sete dias após o início da desnutrição para os grupos DNT e

RNT e sete dias após o início da realimentação para o grupo RNT. Quando os pesos dos grupos foram analisados em cortes transversais não houve diferença estatística entre os grupos DNT e RNT no D 15 (dia final da desnutrição; $p=0,81$). Entretanto quando comparamos o grupo RNT com os grupos DNT e CTL no dia CX (dia da operação) houve diferença estatisticamente significativa em ambos os casos ($p=0,002$ e $p= 0,004$; respectivamente), o que mostra que com a realimentação o grupo RNT recuperou peso, mas não o suficiente para atingir o grupo controle.

Estes resultados assemelham-se com o estudo publicado por BLANCHARD *et al.* (1979), os quais encontraram que a perda de 32% do peso corporal e redução de 30% no nível de albumina sérica após dieta hipoprotéica. Eles também demonstraram a recuperação do peso e dos níveis de albumina sérica dos animais com sete dias de realimentação, sem, no entanto, o grupo realimentado alcançar o grupo controle.

5.4. AVALIAÇÃO DA REGENERAÇÃO HEPÁTICA

Para se quantificar a regeneração hepática, existem diversos métodos: análise ponderal do parênquima, índice ponderal (ANDRIGUETTO 1982; CAMPOS 1984); determinação do número de mitoses em fragmentos teciduais corados com hematoxilina-eosina, índice mitótico (ANDRIGUETTO 1982; CAMPOS 1984); imunistoquímica, análise volumétrica do parênquima, índice volumétrico (BERTICELLI 2003); imunistoquímica com dosagem de PCNA (ASSY *et al.*, 1998; THEOCHARIS *et al.*, 1994).

Um método padrão ouro de avaliação da regeneração hepática ainda não foi identificado. Cada método está associado a várias vantagens e desvantagens, e ainda existe muita discrepância entre eles. Portanto, sempre que possível, deve-se utilizar pelo menos dois métodos diferentes para avaliar com segurança a regeneração hepática.

“...assim como toda rosa tem seus espinhos, cada método tem suas desvantagens...” (ASSAY E MINUK, 1997).

O mecanismo exato de regeneração e as interações entre as células ainda não estão claramente definidas (TARLA *et al.*, 2006). A regeneração hepática eficiente depende da ativação de mais de 100 diferentes genes e da participação de vários fatores de crescimento e citocinas (FAUSTO, 2001).

A pesquisa de fatores de crescimento hepáticos na regeneração hepática deve levar em conta os seguintes aspectos: 1. nenhum fator único é suficiente para regular todo o processo

regenerativo; fatores positivos e negativos podem estimular e inibir a proliferação de hepatócitos. A relação entre estes fatores pode ser mais importante que seus níveis absolutos; 2. o local de síntese destes fatores pode ser o fígado ou outros tecidos. No fígado, tanto células parenquimatosas como não-parenquimatosas podem originar estes fatores e 3. a presença de fatores de crescimento hepáticos no soro de animais parcialmente hepatectomizados não necessariamente implica que tais fatores sejam responsáveis pelo desencadeamento do processo regenerativo (RAMALHO *et al.*, 1993; JIRTLE & MICHALOPOULOS, 1982).

A avaliação do peso dos fígados é um método bastante discutido e controverso na literatura. Alguns autores relatam como problema o fato do peso hepático variar muito dependendo da quantidade de lipídeos, glicídios e células inflamatórias presentes no fígado em consequência da dieta (BERTICELLI, 2005; ASSY & MINUK, 1997). Contrariando estes autores, ANDIRAN *et al.* (2000) descreveram o peso do fígado como método objetivo para se avaliar o índice de regeneração hepática, sendo bastante utilizado e de fácil reprodutibilidade.

Ainda nesta discussão, CORBIN *et al.* (2002) demonstraram a existência de métodos não invasivos capazes de monitorar a atividade e a regeneração hepáticas com igual, ou melhor, credibilidade. Eles usaram a ressonância magnética associada à espectrofotometria com fósforo marcado e compararam com métodos convencionais de avaliação da função hepática e chegaram a resultados similares, com a vantagem de poder ser utilizada na prática clínica. Considerando as controvérsias envolvendo o peso do fígado dos animais, optou-se por não usá-los como parâmetro neste estudo.

5.4.1 Contagem das Figuras de Mitozes

A contagem de figuras de mitose coradas pela HE é um dos métodos mais utilizados para avaliação da regeneração hepática por ser de fácil reprodutibilidade e baixo custo; assim sendo é considerado método de referência para estudos experimentais (ASSY & MINUK, 1997).

Nesse estudo a avaliação o grupo CTL apresentou média da contagem das figuras de mitose ligeiramente superior aos grupos DNT e RNT, e o grupo RNT apresentou contagem do número de figuras de mitose superior ao grupo DNT, porém inferior ao grupo CTL, conforme demonstrado no GRÁFICO 04. Não houve diferença estatística na análise intergrupos. ($p > 0,05$). O resultado do grupo DNT pode ser explicado pelo conceito de prioridade biológica

induzida, sugerido inicialmente por MOORE (1959) que sustenta a evidência da recuperação dos tecidos independente das alterações nutricionais. As mudanças metabólicas ou reações de estresse são consideradas prioridade biológica no processo de proliferação do fígado (MEAD *et al.*, 1996). Já o grupo RNT pode não ter alcançado os resultados do grupo CTL pelos menos motivos já discutidos anteriormente, em particular, o tempo e a composição da dieta para realimentação. Nos estudos abaixo, os autores ofereceram dieta manipuladas no período de realimentação, proporcionando melhores resultados.

BLANCHARD *et al.* (1979) renutriram ratos submetidos à dieta aprotéica com nutrição parenteral total balanceada por sete dias e conseguiram demonstrar os benefícios da realimentação através da reversão dos resultados adversos obtidos com a desnutrição.

Da mesma forma, ANDRIGUETTO (1982) mostrou que a infusão da solução rica em aminoácidos de cadeia ramificada permitiu aumentar, de forma significativa, o índice mitótico em relação ao grupo recebendo solução equilibrada de aminoácidos, e em relação ao grupo recebendo alimentação oral. Assim, compensando os desequilíbrios do aminoácido plasmático permitiu estimular a regeneração hepática.

Em relação ao grupo DNT, SKULLMAN, IHSE & LARSSON (1990) mostraram atraso no processo de regeneração hepática no grupo de ratos que recebeu dieta aprotéica. Demonstraram, ainda, em estudo experimental, que o metabolismo energético do fígado dá preferência à regeneração hepática em ratos desnutridos (SKULLMAN, IHSE & LARSSON, 1991).

Dado importante no processo de regeneração hepática é que a ocorrência de mitoses sofre alteração no decorrer do dia. O ciclo circadiano ajuda na regulação da regeneração hepática no rato, sendo que no rato o índice mitótico dos hepatócitos é três vezes maior às dez horas da manhã do que às oito horas da noite (FAUSTO, 2001). Estudos relataram que a ciclo circadiano afeta o momento de iniciação da síntese de DNA, no entanto não afeta o pico de síntese de DNA ou o pico das mitoses (JIRTLE & MICHALOPOULOS, 1982). No presente estudo, as operações e as mortes foram realizados no período entre meio dia e quatorze horas.

Em avaliação geral o número de figuras de mitose foi baixo, e isto pode ser explicado porque o pico de mitoses ocorre em 36 horas e o estudo foi realizado em 24 horas após a hepatectomia parcial, momento do processo regenerativo onde ocorre a síntese de DNA (MICHALOPOULOS & DEFRANCES, 2004; BLACK *et al.*, 2003).

5.4.2 Avaliação do PCNA

O PCNA é método aceito e comumente usado para monitorar a atividade regenerativa, por ser de fácil reprodutibilidade e ter seus resultados comparados aos demais métodos de avaliação com sucesso (SELZNER & CLAVIEN, 2000). O PCNA tem meia vida de 20 horas, explicando o porquê de ele permanecer positivo quando o índice mitótico já está em declínio (THEOCHARIS *et al.*, 1997).

Considerando que o pico da síntese de DNA ocorre em 24-28 horas, HASHIMOTO & SANJO, 1997 mostraram aumento do PCNA com 24 horas, em estudo da regeneração hepática de ratos submetidos à hepatectomia parcial.

Estudos demonstraram que o PCNA pode ser comparado a timedina triciada, método consagrado de avaliação da regeneração hepática (ASSY *et al.*, 1998; WOLF & MICHALOPOULOS, 1992).

GAGLIO *et al.*, em 2002, mostraram a que os resultados do Ki-67, do índice mitótico e do PCNA foram semelhantes em estudo de regeneração hepática em modelo primata não-humano (*Macaca mulata*) após hepatectomia parcial.

Outro parâmetro considerado excelente para a avaliação da cinética da regeneração hepática é a incorporação de bromodeoxiuridina (BrdU). ANDIRAN *et al.* em 2000 encontraram similaridade entre os resultados da BrdU com o PCNA, validando, mais uma vez, este método para seu uso na avaliação da proliferação celular após ressecção hepática.

No presente estudo a positividade do PCNA foi maior no grupo RNT quando comparado aos grupos CTL e DNT, sendo significativamente estatístico, $p < 0,001$ e $p = 0,04$, respectivamente (GRÁFICO 05). Não houve diferença significativa entre os grupos CTL e DNT ($p = 0,10$). Os resultados podem ser explicados pelo fato da desnutrição protéica induzir acúmulo de RNA nos hepatócitos como forma de proteção, facilitando a síntese de DNA quando requisitada.

Resultado semelhante foi publicado por MEAD *et al.* (1990) que relataram que hepatócitos de ratos submetidos à dieta com baixo teor de proteínas alcançam o nível máximo de proliferação de DNA mais precocemente que os ratos alimentados com dieta normal ou que os ratos mantidos em jejum. Ao fornecer solução de aminoácidos a todos os grupos, o grupo com dieta hipoprotéica respondeu mais rapidamente ao estímulo.

Em 1978, LEWIS & WINICK relataram aumento da síntese de RNA nuclear em fígado de ratos alimentados com dieta com 6% de proteínas por uma semana. O fenômeno

pôde ser explicado pelo fato de que a meia-vida do RNA é muito menor do que o DNA (seis dias para o RNA e 100 dias para o DNA). Dessa forma, a síntese de RNA torna-se altamente prioritária para a formação de novas proteínas, e o é tanto mais quanto mais pobre é o teor protéico da alimentação (SIIMES & DALMAN, 1974; CAMPOS & ANDRIGUETTO, 1986). Pode-se concluir, dessa forma, que o jejum e a privação protéica possuem efeito depressivo, mas não supressivo sobre o processo regenerativo.

Confirmando a idéia que uma dieta suplementada melhoraria os resultados do grupo RNT, ITO & HIGASHIGUCHI (1999) concluíram que a administração endovenosa de glutamina após hepatectomia aumenta a síntese de proteínas no intestino, incluindo vários fatores que estimulam a regeneração hepática e inibe a translocação bacteriana pós-operatória. O mesmo resultado foi encontrado por YOSHIDA *et al.* (1995), ao avaliarem a regeneração hepática em ratos desnutridos e posteriormente suplementados com solução de glutamina-alanina 10%.

MCGOWAN, ATRUZEK & FAUSTO (1979) descreveram que a magnitude da síntese de DNA na regeneração hepática em ratos submetidos à dieta aprotéica é igual ou maior que os ratos submetidos à dieta padrão, porém o pico de síntese de DNA está atrasado e as mudanças metabólicas precoces da regeneração estão mantidas.

O mesmo foi encontrado por SIIMES & DALLMANN (1974) que notaram discreto atraso na síntese de DNA no grupo que recebeu dieta hipoprotéica (aproximadamente uma hora).

Diferenças encontradas nos tempos de pico de síntese de DNA podem ser explicadas pelas diferenças nas composições e quantidades de dieta oferecidas aos animais dos grupos experimento.

5.4 ESTEATOSE

Assim como a epidemia global de obesidade, a frequência de fígados esteatóticos está cada vez mais comum. Fígados com infiltração gordurosa estão associados a maior incidência de morbi-mortalidade após ressecções hepáticas e transplantes. Por exemplo, a mortalidade da ressecção hepática em pacientes com esteatose leve ou moderada chega a 10%, enquanto que em pacientes com fígado normal não passa de 2% na maioria dos centros (HUSSEIN *et al.*, 2002). Fígados com infiltração gordurosa não são usados para transplante devido à disfunção primária do enxerto, causada pela alteração da arquitetura sinusoidal ou pela maior

suscetibilidade a injúria de reperfusão ou ambos (SELZNER & CLAVIEN, 2000; RAO *et al.*, 2001; VIANNA, 2005).

Entretanto, a esteatose é alteração celular frequentemente encontrada no processo de regeneração celular após hepatectomia parcial. Durante o processo de regeneração, observa-se redução do conteúdo celular com rarefação das organelas citoplasmáticas e glicogênio com paralelo aumento das inclusões lipídicas. Esteatose hepática após hepatectomia parcial é achado clássico que ocorre de maneira intensa, transitória e ordenado, sem comprometer o processo de regeneração (MAZZA *et al.*, 2003).

SHTEYER *et al.* (2004) mostraram que o acúmulo precoce de adipócitos na regeneração hepática parece ser necessário para o início do processo de regeneração. Esta hipótese pode ser confirmada pelo fato de a proliferação celular de hepatócitos em cultura estar acompanhada a importante acúmulo intracelular de gordura.

O maior acúmulo de gordura no tecido hepático de animais desnutridos submetidos à hepatectomia parcial pode ser explicado pelo fato destes animais apresentarem redução das concentrações das organelas microscópicas intracelulares, especialmente do retículo endoplasmático rugoso (BLANCHARD *et al.*, 1979).

A diferença entre os graus de esteatose encontrada no presente estudo foi significativa e podem ser vistas nas FIGURAS 15, 16 e 17. Pode-se observar pouca ou nenhuma infiltração gordurosa nos grupos CTL e RNT ao passo que o grupo DNT apresentou intensa esteatose ($p < 0,001$).

SELZNER & CLAVIEN (2000) relatam que há quebra no processo de regeneração em fígados esteatóticos. Prova disso é a redução na expressão do PCNA por estes fígados, o que indica falência na indução das proteínas do complexo polimerase necessárias para a síntese de DNA.

Resultados semelhantes foram encontrados por BLANCHARD *et al.* (1979) que identificaram aumento da deposição de gordura no fígado de animais submetidos à dieta hipoprotéica, fato que foi revertido após suplementação de aminoácidos após sete dias.

PICARD *et al.* (2002) induziram esteatose hepática por três mecanismos diferentes (ratos obesos; ratos Wistar alimentados com ácido orótico e ratos Wistar alimentados com dieta pobre em metionina e deficiente em colina) e não encontraram alterações na regeneração hepática comuns aos três mecanismos. Com isso, concluíram que a esteatose hepática isoladamente não afetaria a regeneração hepática e que as alterações encontradas seriam resultado de uma série de fatores associados.

Complementando os achados anteriores, MITTERNDORFER *et al.* (1998) concluíram que a composição da dieta pode ser o principal fator no desenvolvimento do fígado gorduroso em várias circunstâncias. Podendo-se dizer que não o tipo de energia oferecida e sim a falta da ingestão de proteínas afetaria o índice de deposição de gordura no fígado. Índices tradicionais de disfunção hepática podem não corresponder diretamente ao grau de esteatose e o risco para complicações futuras. Os autores sugeriram que a intervenção nutricional ajudaria a reduzir o acúmulo de gordura no fígado e minimizar as complicações.

5.3 PERSPECTIVAS FUTURAS

Pelo exposto, pode-se concluir que é possível se agir nutricionalmente sobre o processo regenerativo. Trata-se de um enfoque relativamente recente do estudo da regeneração hepática, e é sem dúvida um campo promissor. Dessa forma, será possível melhor conhecer e talvez até estimular esse fenômeno admirável que é a regeneração hepática.

CONCLUSÃO

6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos no presente estudo, pode-se concluir que:

- A desnutrição associa-se a redução da contagem das figuras de mitose e ao aumento do número de núcleos corados pelo PCNA em ratos após hepatectomia parcial.
- A renutrição recupera o número de figuras de mitoses em relação aos ratos desnutridos e aumenta o número de núcleos corados pelo PCNA em relação aos ratos do grupo controle.
- A desnutrição está associada à esteatose hepática intensa após hepatectomia parcial em ratos.
- A renutrição está associada à redução da esteatose após hepatectomia parcial em ratos.

REFERÊNCIAS

ANDIRAN, F.; AYHAN, A.; TANEYL, F.; ABBASOGLU, O.; SAYEK, I. Regenerative capacities of normal and cirrhotic livers following 70% hepatectomy in rats and the effect of alpha-tocopherol on cirrhotic regeneration. **J Surg Res**, v. 89, n.2, p.184-8, 2000.

ANDRIGUETTO, P.C. **Regeneration hépatique chez le chien hepatectomisé a 75%**. Montpellier - France, 1982. *Mémoire de chirurgien assistant à titre étranger* – Faculté de Médecine, Université de Montpellier.

AOKI, T.; MURAKAMI, M.; NIIZA, T.; MURAI, N.; SHIMIZU, Y.; KATO, H.; KUSANO, M. Capacity of hepatic regeneration following a second partial hepatectomy in rats. **Hepatol Res.**, v. 21, n. 3, p. 228-241, 2001.

ASSY, N.; GONG, Y.; 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.**, v. 131, n. 3, p. 251-6, 1998.

ASSY, N. & MINUK, G.Y. Liver regeneration: methods for monitoring and their applications. **J Hepat**, v.26, n.4, p.945-952, 1997.

BEATTIE, A.H.; PRACH, A.T.; BAXTER, J.P.; PENNINGTON, C.R. A randomized controlled trial evaluating the use of enteral nutritional supplements postoperatively in malnourished surgical patients. **Gut**, vol. 46, n. 6, p. 813-8, 2000.

BELGHITI, J.; HIRAMATSU, K.; BENOIST, S.; MASSAULT P.; SAUVANET, A.; FARGES O. Seven hundred forty seven hepatectomies in the 1990's: an update to evaluate the actual risk of liver resection. **J. Am. Coll. Surg**, v. 191, n. 1, p. 38-46, 2000.

BELLENTANI, S.; BEDOGNI, G.; MIGLIOLI, L.; TIRIBELLI, C. **The epidemiology of fatty liver.** Eur. J. Gastroenterol. Hepatol., v.16, n.11, p.1087-1093, 2004.

BERTELLI, MSB. **Toxicidade do acetaminofen em ratos submetidos a hepatectomia parcial.** Porto Alegre, 1993. 80 f. Dissertação (Mestrado) – Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre.

BERTICELLI, J. **Estimativa do volume hepático e sua correlação com o peso corpóreo durante a regeneração hepática após hepatectomia parcial em suínos.** Curitiba, 2005. 90 f. Dissertação (Mestrado) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

BIONDO-SIMÕES, M.L.P.; GRECA, F.; SMANIOTTO, G.H.; TECHY, F.; SOARES, D.P.; KANNENBERG, C.; CASTRO, C.C.L.; VASCONCELOS, C.N. Efeito da histamina na regeneração hepática: estudo experimental em ratos. **Acta Cir Bras**, v. 15, n. 1, p. 9-13, 2000a.

BIONDO-SIMÕES, M.L.P; PANTE, M.; GARCIA, R.F.; MACEDO, V.L.; MORAIS, T.H.C.; BOELL, P. Growth hormone on liver regeneration in rats. **Rev Col Bras Cir**, v. 27, n. 2, p. 117-120, 2000b.

BISMUTH, H. & HOUSSIN, D. Reduced-sized orthotopic liver graft in hepatic transplantation in children. **Surgery**, v. 95, n. 3, p. 367-370, 1984.

BISMUTH, H.; MORINO, M.; CASTAING, D.; GILLON, M.C.; DESCORPS, A.D.; SALIBA, F.; SAMUEL, D. Emergency orthotopic liver transplantation in two patients using one donor liver. **Br. J. Surg.**, v. 76, n. 7, p. 722-4, 1989.

BLACK, D.; LYMAN, S.; HEIDER, R.; BEHRNS, K.E. Molecular and cellular features of hepatic regeneration. **J Surg Res**, v. 117, n. 2, p. 306-315, 2004.

BLANCHARD, J.; STEIGER, E.; O'NEIL, M.; NAITO, H.; SEBECK, B.; SHAMBERGER, R.J. Effect of protein depletion and repletion on liver structures, nitrogen content and serum proteins. **Ann Surg.**, v. 190, n. 2, p. 144-150, 1979.

BOARD OF DIRECTORS AND THE CLINICAL GUIDELINES TASK FORCE. Guidelines for the use of parenteral and enteral nutrition in adult and pediatric patients. **JPEN J Parenter Enteral Nutr**, v. 26, n. 1, Suppl, p. 1SA-138SA, 2002.

BORGES, V.C.; WAITZBERG, D.L.; OLIVEIRA e SILVA, A.; D'AALBUQUERQUE, L.A.C.; CAMILO, M.E. Insuficiência hepática aguda e crônica. In: WAITZBERG DL. **Nutrição oral, enteral e parenteral na prática clínica**. 3^a edição. Editora Atheneu, São Paulo, p. 1209-1228, 2004.

BOZZETTI, F.; GAVAZZI, C.; MICELI, R.; ROSSI, N.; MARIANI, L.; COZZAGLIO, L.; BONFANTI, G.; PIACENZA, S. Perioperative total parenteral nutrition in malnourished gastrointestinal cancer patients: a randomized clinical trial. **JPEN J Parent Enteral Nutr**, v. 24, n. 1, p. 7-14, 2000.

BRAGA, M.; GIANOTTI, L.; NESPOLI, L.; RADAELLI, G.; DI CARLO V. Nutritional approach in malnourished surgical patients: a prospective randomized study. **Arch Surg**, v. 137, n. 2, p. 174-80, 2002.

BROELSCH, C.E.; EMOND, J.C.; WHITINGTON, P.F.; THISTLETHWAITE, J.R.; BAKER, A.L.; LICHTOR, J.L. Application of reduced-sized liver transplants as split grafts, auxiliary orthotopic grafts, and living related segmental transplants. **Ann Surg**, v. 212, n. 3, p. 368-375, 1990.

CALNE, R.Y.; ROLLES, K.; WHITE, D.J.; THIRU, S.; EVANS, D.B ; MCMASTER, P. ; DUNN, D.C. ; CRADDOCK, G.N. ; HENDERSON, R.G. ; AZIZ, S. ; LEWIS, P. Cyclosporin A initially as the only immunosuppressant in 34 recipients of cadaveric organs : 32 kidneys, 2 pancreases, and 2 livers. **Lancet**, v. 8151, n. 2, p. 1033-1036, 1979.

CAMPOS, A.C.L. **Metabolisme du foie en regeneration ; effets d'un apport lipidique en melange nutritif chez le chien hepatectomisé a 65%**. Montpellier - France, 1984. *Mémoire de chirurgien assistant a titre étranger* – Faculté de Médecine, Université de Montpellier.

CAMPOS, A.C.L. & ANDRIGUETTO, P.C. Regeneração Hepática. In: **Hepatologia Clínica e Cirúrgica**. Editora Sarvier, São Paulo, 1986.

CAMPOS, A.C.L.; MATIAS, J.E.F.; COELHO, J.C.U. Nutritional aspects of liver transplantation. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, v. 5, n. 2, p. 297-307, 2002.

CAMPOS, A.C.L.; MATIAS, J.E.F.; COELHO, J.C.U. Nutrição Enteral precoce em transplante hepático. **Arq Gastroenterol.**, v. 41, n. 3, p. 145-6, 2004.

CARRILLO, M.C.; CARNOVALE, C.E.; FAVRE, C.; MONTI, J.A.; SCARPINI, C. Hepatic protein synthesis and serum aminoacid levels during liver regeneration in young and old malnourished rats. **Mech Ageing Dev**, v. 91, n. 1, p. 55-64, 1996.

CASTRO e SILVA JR, O.; SILVA, R.L.; MELO, G.B.; MELO, V.A.; LIMA, S.O.; ANTONIOLL, A.R.; BAGNATO, V.S. Proliferative effect of medicinal plants and laser on liver regeneration. A considerable experimental model: from an experimental model to clinical applications. **Acta Cir Bras**, v. 18, Suppl. 5, p. 6-8, 2003.

CHAIB, E.; MORALES, M.M.; BORDALO, M.B.; ANTONIO, L.G.; FEIJO, L.F.; ISHIDA, R.Y.; LIMA JR, J.; NUNES, P.A. Predicting the donor liver lobe weight from body weight for split-liver transplantation. **Braz. J. Med. Biol. Res**, v. 28, n. 7, p. 759-760, 1995.

CIARDULLO, M.A.; D'AGOSTINO, D.; MCCORMACK, L. Transplante hepático na infância. In: KALIL AN; COELHO J; STRAUSS E. **Fígado e Vias Biliares – Clínica e Cirurgia**. Editora Revinter, Rio de Janeiro, p. 507-520, 2001.

CORBIN, I.R.; BUIST, R.; VOLOTOVSKYY, V.; PEELING, J.; ZHANG, M.; MINUK, G.Y. Regenerative activity and liver function following partial hepatectomy in the rat using ³¹P-mr spectroscopy. **Hepatology**, v. 36, n. 2, p.345-353, 2002.

CORREIA, M.I.; CAMPOS, A.C. ELAN Cooperative Study. Prevalence of hospital malnutrition in Latin America: the multicenter ELAN study. **Nutrition**, v. 19, n. 10, p. 823-825, 2003.

COUINAUD, C. **Tell me more about liver anatomy**. Ed. C. Couinaud, 1999.

COURT, F.G.; WEMYSS-HOLDEN, A.S.; DENNISON, A.R.; MADDERN, G.J. The mystery of liver regeneration. **Br J Surg**, v. 89, n. 9, p. 1089-1095, 2002.

CUNHA, W.D.S.; FRIEDLER, G.; VAISBERG, M.; EGAMI, M.I.; COSTA ROSA, L.F.B.P. Immunosuppression in undernourished rats: the effect of glutamine supplementation. **Clin Nutr**, v. 22, n. 5, p. 453-7, 2003.

DELANY, H.M.; JOHN, J.; THE, E.L.; LI, C.S.; GLIEDMAN, M.L.; STEINBERG, J.J.; LEVERSON, S.M. Contrasting effects of identical nutrients given parenterally or enterally after 70% hepatectomy. **Am J Surg**, v. 167, n. 1, p. 135-144, 1994.

DESCHENES, M.; VILLENEUVE, J.P.; DAGENAIS, M.; FENYVES, D.; LAPOINTE, R.; POMIERR-LAYRARQUES, G.; ROY, A.; WILLEMS, B.; MARLEAU, D. Lack of relationship between preoperative measures of the severity of cirrhosis and short-term survival after liver transplantation. **Liver Transpl Surg**, v. 3, n. 5, p. 532-7, 1997.

DETSKY, A.S.; BAKER, J.P.; O'ROURKE, K.; GOEL, V. Perioperative parenteral nutrition: a meta-analysis. **Ann Intern Med**, v. 107, n. 2, p. 195-203, 1987.

FAUSTO, N. New perspectives on liver regeneration. **Hepatology**, v. 6, n. 2, p. 326-7, 1986.

FAUSTO, N. Liver regeneration. **J. Hepatol**, v. 32, n. 1, p.19-31, 2000.

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

FAUSTO, N.; LAIRD, A.D.; WEBBER, E.M. Liver regeneration 2: role of growth factors and cytokines in hepatic regeneration. **FASEB J**, v. 9, n. 15, p. 1527-36, 1995.

FERREIRA, M. **Radioterapia pré e pós-operatória na cicatrização de anastomoses colônicas em ratos avaliada mediante estudo tensiométrico, histológico e da morfometria do colágeno**. Curitiba, 2004. 139f. Dissertação (Mestrado) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná

FRANCAVILLA, A.; OVE, P.; POLIMENO, L.; COETZEE, M.; MAKOWKA, L.; BARONE, M.; VAN THIEL, D.H.; STARZL, T.E. Regulation of the liver size and regeneration: importance in liver transplantation. **Transplat Proc**, v. 20, n. 1, suppl. 1, p. 494-7, 1988.

GAGLIO, P.J.; LIU, H.; DASH, S.; CHENG, S.; DUNNE, B.; RATTERREE, M.; BASKIN, G.; BLANCHARD, J.; BOHM JR, R.; THEISE, N.D.; LaBRECQUE, D. Liver regeneration investigated in a non-human primate model (*Macaca mulatta*). **J Hepatol**, v. 37, n. 5, p. 625-632, 2002.

GANE, E. & MUNN, S. Indications for liver transplantation. **N Z Med J**, v. 111, n. 1066, p. 177-179, 1998.

GONÇALVES; C. **Cicatrização de anastomose colônica e nutrição pré-operatória em ratos desnutridos: estudo tensiométrico e de deposição do colágeno**. Curitiba, 2005. 90 f. Dissertação (Mestrado) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

GORLA JR, J.A.; FAGUNDES, D.J.; PARRA, O.M.; ZAIA, C.T.B.V.; BANDEIRA, C.O.P.; TAHA, M.O. Fatores hepatotróficos e regeneração hepática. Parte I: o papel dos hormônios. **Acta Cir Bras**, v. 16, n. 3, p. 179-184, 2001a.

GORLA JR, J.A.; FAGUNDES, D.J.; PARRA, O.M.; ZAIA, C.T.B.V.; BANDEIRA, C.O.P.; TAHA, M.O. Fatores hepatotróficos e regeneração hepática. Parte II: fatores de crescimento. **Acta Cir Bras**, v. 16, n. 4, p. 261-6, 2001b.

HASHIMOTO, M. & SANJO, K. Functional capacity of the liver after two-thirds partial hepatectomy in the rat. **Surgery**, v. 121, n. 6, p.690-7, 1997.

HEFFRON, T.G. Living related liver transplantation. **Semin Liver Dis**, v. 15, n. 2, p. 165-172, 1995.

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

HILL, G.L.; BLACKETT, R.L.; PICKFORD, I.; BURKINSHAW, L.; YOUNG, G.A.; WARREN, J.V.; SCHORAH, C.J.; MORGAN, D.B. Malnutrition in surgical patients. An inrecognised problem. **Lancet**, v.1, n. 8013, p. 689-92, 1977.

HSU, SM. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled anti-body (PAP) procedures. **J Histochem Cytochem**, v. 29, p. 577, 1981.

HUSSEIN, O.; SZVALB, S.; VAN DEN AKKER-BERMAN, L.M.; ASSY, N. Liver regeneration is not altered in patients with nonalcoholic steatohepatitis (NASH) when compared to chronic hepatitis C infection with similar grade of inflammation. **Dig Dis Sci**, v. 47, n. 9, p. 1926-1931, 2002.

ITO, A. & HIGASHIGUCHI, T. Effects of glutamine administration on liver regeneration following hepatectomy. **Nutrition**, v. 15, n. 1, p. 23-8, 1999.

JELLIFE, D.B. The assessment of nutritional status of the community. **World Health Organization**, Geneva, 1966.

JESUS, R.P.; WAITZBERG, D.L.; CAMPOS, F.G. Regeneração hepática: papel dos fatores de crescimento e nutriente. **Rev Ass Med Brasil**, v. 46, n. 3, p. 242-254, 2000.

JIRTLE, R.L. & MICHALOPOULOS, G. Effects of partial hepatectomy on transplanted hepatocytes. **Cancer Res**, v. 42, n. 8, p. 3000-4, 1982.

JUNQUEIRA LC & CARNEIRO J. Glândulas anexas do Tubo Digestivo. In: JUNQUEIRA LC & CARNEIRO J. **Histologia Básica**. 8ª. Edição, Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 272 – 282, 1995.

KAHN, D.; HICKMAN, R.; TERBLANCHE, J. A porcine model for study of liver regeneration. **J Invest Surg**, n. 1, v. 2, p. 139-42, 1988.

KAMEL, I.R.; ERBAY, N.; WARMBRAND, G.; KRUSKAL, J.B.; POMFRET, E.A.; RAPTOPOULOS, V. Liver regeneration after adult right lobe transplantation. **Abdom. Imaging**, v. 28, n. 1, p. 53-7, 2003.

KAMEL, I.R.; KRUSKAL, J.B.; POMFRET, E.A.; KEOGAN ; WARMBRAND, G.; RAPTOPOULOS, V. Impacto f multidetector CT in donor selection and surgical planning before living adult right lobe liver transplantation. **AJR Am J Roentgenol**, vol.176, n. 1, p.193-200, 2001.

KEUSCH, G.T. The history of nutrition: malnutrition, infection and immunity. **J Nutr**, v. 133, n. 1, p. 336S-340S, 2003.

KLEIN, S.; KINNEY, J.; JEEJEEBHOY, K.; ALPERS, D.; HELLERSTEIN, M.; MURRAY, M.; TWOMEY, P. Nutrition support in clinical practice: review of published data and recommendations for future research directions. National Institutes of Health, American

Society for Parenteral and Enteral Nutrition and American Society for Clinical Nutrition. **JPEN J Parenter Enteral Nutr**, v. 21, n. 3, p. 133-56, 1997.

KHNYCHENKO, L.K.; STEPANOV, I.I.; SAPRONOV, N.S. Regression analysis of relationship between liver weight and body weight after partial hepatectomy in rats. **Bull Exp Biol Med**, v. 141, n. 2, p. 269-271, 2005.

KOUNTOURAS, J.; BOURA, P.; LYGIDAKIS, N.J. Liver regeneration after hepatectomy. **Hepatogastroenterol**, v. 48, n. 3, p.556-562, 2001.

KWON, A.H.; UETSUJI, S.; YAMAMURA, M.; HIOKI, K.; YAMAMOTO, M. Effect of administration of fibronectin or aprotinin on liver regeneration after experimental hepatectomy. **Ann Surg**, v. 211, n. 3, p. 295-300, 1990.

LEWIS, C.G. & WINICK, M. Studies on ribosomal RNA synthesis *in vivo* in rats liver during short-term protein malnutrition. **J Nutr**, v. 108, n.3, p. 329-49,1978.

LIU, C.L.; LAM, B.; LO, C.M.; FAN, S.T. Impact of right lobe live donor liver transplantation on patients waiting for liver transplantation. **Liver Transpl**, v. 9, n. 8, p. 863-9, 2003.

MAETANI, Y.; ITOH, K.; EGAWA, H.; SHIBATA, T.; AMETANI, F.; KUBO, T.; KIUCHI, T.; TANAKA, K.; KONISHI, J. Factors influencing liver regeneration following living-donor liver transplantation of the right hepatic lobe. **Transplantation**, v. 75, n. 1, p.97-102, 2003.

MAIO, R.; DICHI, J.B.; BURINI, R.C. Nutritional consequences of macronutrient metabolism impairment in chronic liver disease. **Arq Gastroenterol**, v. 37, n. 1, p. 52-7, 2000.

MAZZA, R.P.J.; BERTEVELLO, P.L.; TORRINHAS, R.M.M.; NONOGAKI, S.; ALVES, V.A.F.; RODRIGUES, J.G.; WAITZBERG, D.L. Effect of glutamine dipeptide on hepatic regeneration in partially hepatectomized malnourished rats. **Nutrition**, v. 19, n. 11-12, p. 930-935, 2003.

MCCULLOUGH, A.J. **Nutritional state and abnormal metabolism of nutrients**. In: American Association for the Study of Liver Diseases, Postgraduate Course, October 31 – November 1, Chicago/Illinois, 1992.

MCCULLOUGH, A.J. & TAVILL, A.S. Disordered energy and protein metabolism in liver disease. **Semin Liver Dis**, v. 11, n. 4, p. 265-277, 1991.

MCGOWAN, J.; ATRYZEK, V.; FAUSTO, N. Effects of protein-deprivation on the regeneration of rat liver after partial hepatectomy. **Biochim J**, v. 180, n. 1, p. 25-35, 1979.

MEAD, J.E.; BRAUN, L.; MARTIN, D.A.; FAUSTO, N. Induction of replicative competence (“priming”) in normal liver. **Cancer Res**, v. 50, n. 21, p. 7023-7030, 1990.

MELO, G.B.; SILVA, R.L.; FAKHOURIT, R.; MELO, V.A.; LIMA, S.O. Effect of omeprazole and pantoprazole on liver regeneration after partial hepatectomy in rats. **Acta Cir Bras**, v. 18, n. 6, p. 542-4, 2003.

MICHALANY, J. Regeneração e Metaplasia. In: MICHALANY, J. **Anatomia patológica geral – na prática médico-cirúrgica**. 2a. edição. Editora Artes Médicas, São Paulo, p. 267-274, 2000.

MICHALOPOULOS, G.K. & DEFRANCES, M.C. Liver Regeneration. **Science**, v. 276, n. 5309, p. 60-6, 1997.

MINCIS, M. Cirrose Hepática. In: COELHO, J.C.U. **Aparelho Digestivo: Clínica e Cirurgia** – volume 2. 2ª. Edição, Ed. Atheneu, São Paulo, 1996, p. 1033-1061.

MITTERNDORFER, B.; JESCHKE, M.G.; WOLF, S.E.; SIDOSSIS, L.S. Nutritional hepatic steatosis and mortality after burn injury in rats. **Clin Nutr**, v. 17, n. 6, p. 293-9, 1998.

MOORE; F.D. **Metabolic Care of the Surgical Patient**. WB Saunders Co, Philadelphia, 1959.

MULLER, M.J.; BOTTCHEER, J.; SELBERG, O.; WESELMANN, S.; BOKER, K.H.; SCHWARZE, M.; VON ZUR MUHLEN, A.; MANNS, M.P. Hypermetabolism in clinically stable patients with liver cirrhosis. **Am J Clin Nutr**, v. 69, n. , p. 1194-1201, 1999.

NAKAGAMI, M.; MORIMOTO, T.; ITO, K.; ARIMA, Y.; YAMAMOTO, Y.; IKAI, I.; YAMAOKA, Y. Patterns of restoration of remnant liver volume after graft harvesting in donors for living related liver transplantation. **Transplant Proc**, v. 30, n. 1, p.195-9, 1998.

NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH CONFERENCE. **Hepatology**, v. 4, suppl. 1, p. 1S-110S, 1984.

PALMES, D. & SPIEGEL, H. U. Animal models of liver regeneration. **Biomaterials**, v. 25, n. 9, p.1601-1611, 2004.

PAPALAMPROS, E.; FELEKOURAS, E.S.; FILIS, K.; ANGELOPOULOU, R.; KOURELIS, T.; TSAMANDAS, A.C.; BASTOUNIS, E. Liver pathology and cell proliferation after octreotide administration following partial hepatectomy in rats. An experimental study. **Dig Dis Sci**, v. 47, n. 9, p. 1953-8, 2002.

PLAETH, M.; CABRÉ, E.; RIGGIO, O.; ASSIS-CAMILO, M.; PIRLICH, M.; KONDRUP, J. ESPEN Guidelines on enteral nutrition: liver disease. **J Clin Nutr**, v. 25, n. 2, p. 285-294, 2006.

PICARD, C.; LAMBOTTE, L.; STARKEL, P.; SEMPOUX, C.; SALIEZ, A.; BERGE, V.V.D.; HORSMANS, Y. Steatosis is not sufficient to cause an impaired regenerative response after partial hepatectomy in rats. **J Hepatol**, v. 36, n. 5, p. 645-652, 2002.

PISTOI, S. & MORELLO, D. Prometheus' myth revisited: transgenic as a powerful tool to study liver regeneration. **FASEB J**, v. 10, n. 8, p. 819-828, 1996.

PULASKI, E.J.; NOYES, H.E.; EVANS, J.R.; BRAME, R.A. The influence of antibiotics on experimental endogenous peritonitis. **Surg Gyn Obst**, v. 99, n. 3, p. 391-6, 1954.

RAIA, S.; NERY, J.R.; MIES S. Liver transplantation from lives donors. **Lancet**, v. 8661, n. 2, p. 497, 1989.

RAMALHO, F.S.; RAMALHO, L.N.Z.; ZUCOLOTO, S.; SILVA JR, O.C. Regeneração hepática – algumas definições num universo de incertezas. **Acta Cir Bras**, v. 8, n. 4, p. 177-189, 1993.

RAO, M.S.; PAPREDDY, K.; ABECASSIS, M.; HASHIMOTO, T. Regeneration of liver with marked fatty change following partial hepatectomy in rats. **Dig Dis Sci**, v. 46, n. 9, p.1821-6, 2001.

REDING, R.; DE GOYET, J.D.; DELBEKE, I.; SOKAL, E.; JAMART, J.; JANSSEN, M.; OTTE, J.B. Pediatric liver transplantation with cadaveric or living related donors: comparative results in 90 elective recipients of primary grafts. **J. Pediatr**, v. 134, n. 3, p. 280-6, 1999.

ROGIERS, X.; MALAGO, M.; HABIB, N.; KNOEFEL, W.T.; POTHMANN, W.; BURDELSKI, M.; MEYER-MOLDENHAUER, W.H.; BROELSCH, C.E. *In situ* splitting of the liver in the heart-beating cadaveric organ donor for transplantation in two recipients. **Transplantation**, v. 59, n. 8, p. 1081-3, 1995.

ROSEN, C.B. & PIMENTEL, S.K. Anatomia e Fisiologia do Fígado. In: COELHO, J.C.U. **Aparelho Digestivo: Clínica e Cirurgia** – volume 2. 3ª. Edição, Ed. Atheneu, São Paulo, 2005, p. 1185-1192.

ROSS, M.H. & ROWRELL, L.J. Sistema Digestivo III: Fígado, Vesícula Biliar e Pâncreas. In: **Histologia: texto e atlas**. ROSS, M.H.; REITH, E.J.; ROWRELL, L.J., 2ª. Edição, São Paulo, 1993, p. 471-500.

RUDOLPH, K.L.; TRAUTWEIN, C.; KUBICKA, S.; RAKEMANN, T.; BAHR, M.J.; SEDLACZEK, N.; SCHUPPAN, D.; MANNS, M.P. Differential regulation of extracellular matrix synthesis during liver regeneration after partial hepatectomy in rats. **Hepatology**, v. 30, n. 5, p.1159-1166, 1999.

SCHMITZ, LD. **Nutrição perioperatória suplementada com glutamina em ratos desnutridos submetidos à anastomose colônica: avaliação morfológica e tensiométrica**. Curitiba, 2006. 80 f. Dissertação (Mestrado) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

SELZNER, M. & CLAVIEN, P.A. Failure of regeneration of the steatotic rat liver: disruption at two different levels in the regeneration pathway. **Hepatology**, v. 31, n. 1, p. 35-42, 2000.

SERVI, K. Prometheus, the benefactor of mankind. In: SERVI, K. **Greek Mythology**, Ekdotike Athenon S.A., Atenas, 2005, p. 22 -23.

SHTEYER, E.; LIAO, Y.; MUGLIA, L.J.; HRUZ, P.W.; RUDNICK, D.A. Disruption of hepatic adipogenesis is associated with impaired liver regeneration in mice. **Hepatology**, v. 40, n. 6, p. 1322-1332, 2004.

SIIMES, A.D. & DALLMAN, P. Nucleic acid and polyamine synthesis in the rat during short term protein deficiency: response of the liver to partial hepatectomy. **J Nutr**, v. 104, n. 1, p. 47, 1974.

SILVA, M.L.T. & WAITZBERG, D.L. Transplante de órgãos. In: WAITZBERG, D.L. **Nutrição oral, enteral e parenteral na prática clínica**. 3ª. edição. Editora Atheneu, São Paulo, 2004, p. 1417-1429.

SKULLMAN, S.; IHSE, I.; LARSSON, J. Influence of malnutrition on regeneration and composition of the rat liver. **Acta Chir Scand**, v. 156, n. 10, p. 717-722, 1990.

SKULLMAN, S.; IHSE, I.; LARSSON, J. Availability of energy substrates during liver regeneration in malnourished rats. **Scand J Gastroenterol**, v. 26, n. 11, p. 1152-6, 1991.

SPANNBAUER, M.M.; OLESZCZUK, A.; TANNAPFEL, A.; BLÜHER, M.; PIETSCH, U.C.; HENGSTLER, J.; DONAUBAUER, B.; MADAJ-STERBA, P.; FÜRLI, M.; SCHUHMACHER, A.; THIERY, J.; HAUSS, J.P.; SCHÖN, M.R. Micro-macrovesicular steatotic liver models for transplantation induced by ethanol and protein-deficient diet. **Transplant Proc**, v. 37, n. 1, p. 210-1, 2005.

STARZL, T.E.; MARCHIORO, T.L.; VON KAULLA, K.N; HERMANN, G.; BRITAIN, R.S.; WADDELL, N.R. Homotransplantation of the liver in humans. **Surg Gyn Obst**, v. 117, p. 659, 1963.

STIRLING, G.A.; LAUGHLIN, J. & WASHINGTON, S.L.A. Effects of starvation on the proliferative response after partial hepatectomy. **Exp Molec Path**, v. 19, p. 44, 1973.

STOCKER, E.; WULLSTEIN, H.K.; BAU, G. Capacity of regeneration in liver epithelia of juvenile, repeated partially hepatectomized rats. Autoradiographic studies after continuous infusion of 3H-thymidine. **Virchow Arch B Cell Pathol**, v. 14, n. 2, p. 93-103, 1973.

STRONG, R.W.; FAWCETT, J.; LYNCH, S.V. Living-donor and split-liver transplantation in adults: right versus left-sided grafts. **J. Hepatobiliary Pancreat. Surg**, v. 10, n. 1, p. 5-10, 2003.

STRONG, R.W.; LYNCH, S.V.; ONG, T.H.; MATSUNAMI, H.; KOIDO, Y.; BALDERSON, G.A. Successful liver transplantation from a liver donor to her son. **NEJM N Engl J Med**, v. 322, n. 21, p.1505-7, 1990.

STUDLEY, H.O. Percentage of weight loss: a basic indicator of surgical risk in patients with chronic peptic ulcer. 1936. **Nutr. Hosp.**, v. 16, n. 4, p. 141-3, 2001.

TALARICO, K.S.; FELLER, D.D. & NEVILLE, E.D. Mitotic response to various dietary conditions in the normal and regenerating rat liver. **Proc Soc Exp Biol Med**, vol. 136, n. 2, p. 381, 1971.

TANG, T.X.; HASHIMOTO, T.; CHAO, L.Y.; ITOH, K.; MANABE, T. Effects of partial pancreatectomy on liver regeneration in rats. **J Surg Res**, v. 72, n. 1, p. 8 -14, 1997.

TARLA, M.R.; RAMALHO, F.; RAMALHO, L.N.Z.; CASTRO e SILVA, T.; BRANDÃO, D.F.; FERREIRA, J.; CASTRO e SILVA, O.; ZUCOLOTO, S. Cellular aspects of liver regeneration. **Acta Cir Bras**, v. 21, supplem. 1, p. 63-6, 2006.

THE VETERANS AFFAIRS TOTAL PARENTERAL NUTRITION COOPERATIVE STUDY GROUP. Perioperative Total Parenteral Nutrition in Surgical Patients. **NEJM N Engl J Med**, v. 325, n. 8, p. 525-532, 1991.

THEOCHARIS, S.E.; AGAPITOS, E.B.; MARGELI, A.P.; GOUTAS, N.D.; KITTAS, C.N.; DAVARIS, P.S. Effect of two forms of granulocyte-colony-stimulating factor on hepatic regeneration after 70% partial hepatectomy in rats. **Clin Sci**, v. 92, n. 3, p. 315-320, 1997.

THEOCHARIS, S.E.; SKOPELITOU, A.S.; MARGELI, A.P.; PAVLAKI, K.J.; KITTAS, C. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression in regenerating rat liver after partial hepatectomy. **Dig Dis Sci**, v. 39, n. 2, p. 245-252, 1994.

TOLENTINO, E.C.; FERREZ, O.; OLIVEIRA, G.R.; RAMALHO, F.S.; RAMALHO, L.N.Z.; ZUCOLOTO, S; CASTRO e SILVA JR, O. Oxigenoterapia hiperbárica e regeneração hepática. **Acta Cir Bras**, v. 18, supplem. 5, p. 4-5, 2003.

TREJO-SOLIS, C.; CHAGOYA de SANCHEZ, V.; ARANDA-FRAUSTRO, A.; SANCHEZ-SEVILLA, L.; GOMEZ-RUIZ, C.; HERNANDEZ-MUNOZ, R. Inhibitory effect of vitamin E administration on the progression of liver regeneration induced by partial hepatectomy in rats. **Lab Invest**, v. 83, n. 11, p. 1669-1679, 2003.

VIANNA, R.M.M. Transplante Hepático. In: COELHO, J.C.U. **Aparelho Digestivo: Clínica e Cirurgia** – volume 2. 3ª. Edição, Ed. Atheneu, São Paulo, 2005, p. 1568-1599.

VIANNA, R.M.M. & NERY, J.R.. Transplante Hepático. In: KALIL, A.N.; COELHO, J.; STRAUSS, E. **Fígado e Vias Biliares – Clínica e Cirurgia**. Editora Revinter, Rio de Janeiro, 2001, p. 479-505.

WAITZBERG, D.L.; CAIAFFA, W.T.; CORREIA, M.I.T.D. Hospital Malnutrition: The Brazilian National Survey (IBRANUTRI): a study of 4000 patients. **Nutrition**, v. 17, n. 7-8, p. 573-580, 2001.

WAITZBERG, D.L.; LIMA-GONÇALVES, E.; BEVILACQUA, L.R.; COLOGNI, A.M.; ROCHA, C.L.; GOFFI, F.S. Body composition changes in cancer; an experimental study. **Rev Hosp Clin Fac Med S Paulo**, v. 44, n. 3, p. 104-10, 1989.

WOLF, H.K. & MICHALOPOULOS, G.K. Hepatocyte regeneration in acute fulminant and nonfulminant hepatitis: a study of proliferating cell nuclear antigen expression. **Hepatology**, v. 15, n. 2, p. 707-13, 1992.

YAMANAKA, N.; OKAMOTO, E.; KAWAMURA, E.; KATO, T.; ORIYAMA, T.; FUJIMOTO, J.; FURUKAWA, K.; TANAKA, T.; TOMODA, F.; TANAKA, W. Dynamics of normal and injured human liver regeneration after hepatectomy as assessed on the basis of computed tomography and liver function. **Hepatology**, v. 18, n. 1, p. 79-85, 1993.

YOSHIDA, S.; YUNOKI, T.; AOYAGI, K.; OHTA, J.; ISHIBASHI, N.; NOAKE, T.; KAKEGAWA, T. Effect of glutamine supplement and hepatectomy on DNA and protein synthesis in the remnant liver. **J Surg Res**, v. 59, n. 4, p. 475-481, 1995.

ZIMMERMANN, A. Regulation of liver regeneration. **Nephrol Dial Transplant**, v. 19, suppl. 4, p. 6-10, 2004.

APENDICE 1: TABELAS (A, B e C) DEMONSTRANDO A EVOLUÇÃO DOS PESOS DOS ANIMAIS (g), NAS DIVERSAS FASES DO ESTUDO.

TABELA A: PESOS (g) DO GRUPO CTL				
	D 0	D7	CX	1 PO
GNH 1	230,76	229,86	227,31	223,89
GNH 2	217,46	244,15	263,38	260,02
GNH 3	231,67	241,54	252,01	249,79
GNH 4	230,89	259,67	292,12	288,90
GNH 5	234,87	243,72	254,78	251,04
GNH 6	222,65	247,94	260,86	255,79
GNH 7	237,13	258,43	291,72	286,67
GNH 8	229,87	243,62	252,23	249,76
GNH 10	250,67	249,87	252,48	247,64
GNH 9	254,78	257,12	255,13	

Legenda: CTL= grupo controle; GNH= identificação do animal do grupo controle; g= gramas; D0= dia inicial do estudo; D 7= sétimo dia do estudo; CX= dia da operação; 1 PO= primeiro dia pós-operatório.

TABELA B: PESOS (g) DO GRUPO DNT				
	D 0	D7	CX	1 PO
GDH 1	243,34	230,67	215,21	210,01
GDH 2	242,33	235,12	221,56	215,89
GDH 3	223,98	216,42	205,76	200,97
GDH 4	238,87	220,78	194,78	190,02
GDH 5	210,11	189,65	158,64	154,45
GDH 6	234,31	192,24	187,66	181,98
GDH 7	257,33	222,17	201,23	207,21
GDH 8	234,29	212,96	204,48	214,78
GDH 10	243,11	224,73	216,67	211,06
GDH 9	255,64	220,11	178,91	

Legenda: DNT= grupo desnutrido; GDH= identificação do animal do grupo desnutrição; g= gramas; D0= dia inicial do estudo; D 7= sétimo dia do estudo; CX= dia da operação; 1 PO= primeiro dia pós-operatório.

TABELA C PESOS (g) DO GRUPO RNT					
	D 0	D7	D 15	CX	1 PO
GRH 1	252,67	236,75	224,56	246,79	243,81
GRH 2	238,89	221,32	205,98	232,11	228,01
GRH 3	245,78	209,56	187,12	222,67	219,23
GRH 4	237,56	211,53	198,98	219,38	215,54
GRH 5	245,87	226,73	203,87	237,78	233,89
GRH 6	217,15	208,45	199,74	221,06	216,22
GRH 7	210,32	196,75	177,32	211,98	205,97
GRH 8	222,98	198,97	178,91	220,76	215,65
GRH 10	236,54	217,31	186,87	232,84	249,21
GRH 9	223,75	214,11	201,91	223,87	219,11

Legenda: RNT= grupo renutrido; GDH= identificação do animal do grupo renutrição; g= gramas; D0= dia inicial do estudo; D 7= sétimo dia do estudo; D 15= final da desnutrição e início da fase de realimentação; CX= dia da operação; 1 PO= primeiro dia pós-operatório.

APENDICE 2: TABELAS (D, E, F, G e H) DEMONSTRANDO A ANÁLISE ESTATÍSTICA ENTRE OS GRUPOS DOS PESOS DOS ANIMAIS (g), NAS DIVERSAS FASES DO ESTUDO.

TABELA D COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DOS PESOS (g) ENTRE OS GRUPOS CTL E DNT NO D 0; CX E 1 PO.

DIAS	CTL	DNT	p
	(n =9) Média ± Erro Padrão	(n = 9) Média ± Erro Padrão	
D 0	234,07 ± 3,60	238,33 ± 4,42	0,46
CX	260,20 ± 6,10	198,48 ± 6,09	0,0001
1 PO	257,06 ± 6,70	198,49 ± 6,69	0,0001

LEGENDA: CTL = grupo controle. DNT = grupo desnutrido. n = tamanho da amostra. p = nível de significância estatística. g= gramas. D0 = início do experimento. CX = dia da operação. 1 PO= primeiro dia pós-operatório

TABELA E COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DOS PESOS (g) ENTRE OS GRUPOS CTL E RNT NO D 0; CX E 1 PO.

DIAS	CTL	RNT	p
	(n =9) Média ± Erro Padrão	(n = 9) Média ± Erro Padrão	
D 0	234,07 ± 3,60	233,15 ± 4,39	0,42
CX	260,20 ± 6,10	226,92 ± 3,25	0,004
1 PO	257,06 ± 6,69	224,66 ± 4,36	0,0007

LEGENDA: CTL = grupo controle. RNT = grupo renutrido. n = tamanho da amostra. p = nível de significância estatística. g= gramas. D0 = início do experimento. CX = dia da operação. 1 PO= primeiro dia pós-operatório

TABELA F COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DOS PESOS (g) ENTRE OS GRUPOS DNT E RNT NO D 0; CX E 1 PO.

DIAS	DNT	RNT	p
	(n=10) Média ± Erro Padrão	(n = 10) Média ± Erro Padrão	
D 0	238,33 ± 4,42	233,15 ± 4,39	0,87
CX	198,48 ± 6,09	226,92 ± 3,25	0,002
1 PO	198,48 ± 6,70	224,66 ± 4,36	0,004

LEGENDA: DNT = grupo desnutrido. RNT = grupo renutrido. n = tamanho da amostra. p = nível de significância estatística. g= gramas. D0 = início do experimento. CX = dia da operação. 1 PO= primeiro dia pós-operatório

TABELA G DIFERENÇAS DAS MÉDIAS DOS PESOS (g) ENTRE OS GRUPOS DNT E CTL E RNT E CTL APÓS A DESNUTRIÇÃO.

GRUPOS	D 0		D 15	
	M ± EP	p	M ± EP	p
DNT (n = 10)	238,33 ± 4,42	0,46	198,48 ± 6,09	< 0,0001
CTL (n = 10)	234,07 ± 3,60		260,20 ± 6,10	
RNT (n = 10)	233,15 ± 4,39	0,42	196,52 ± 4,51	0,0044
CTL (n = 10)	234,07 ± 3,60		260,20 ± 6,10	

LEGENDA: CTL = grupo controle. DNT = grupo desnutrição. RNT = grupo renutrição. n = tamanho da amostra. p = nível de significância estatística. M = média. EP = erro padrão. D0 = início do experimento. D15 = dia final da desnutrição

TABELA H COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DOS PESOS (g) ENTRE OS GRUPOS CTL E RNT NO D0; D 15; CX E 1 PO.

DIAS	CTL (n =10)	RNT (n = 10)	P
	M ± EP	M ± EP	
D 0	234,07 ± 3,60	233,15 ± 4,39	0,42
D 15	260,20 ± 6,10	196,52 ± 4,51	< 0,0001
CX	260,20 ± 6,10	226,92 ± 3,25	0,0044
1 PO	257,06 ± 6,69	224,66 ± 4,36	0,0007

LEGENDA: CTL = grupo controle. RNT = grupo renutrição. n = tamanho da amostra. p = nível de significância estatística. g = gramas. M = média. EP = erro padrão. D0 = início do experimento. D15 = dia final da desnutrição e início da realimentação. CX = dia da operação. 1 PO = primeiro dia pós-operatório.

APENDICE 3: TABELAS (I, J e L) DEMONSTRANDO A ANÁLISE ESTATÍSTICA INTRAGRUPOS DOS PESOS DOS ANIMAIS (g), NAS DIVERSAS FASES DO ESTUDO.

TABELA I COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DOS PESOS (g) NO GRUPO CTL ENTRE O DIA 0, DIA DA OPERAÇÃO E 1 PO.

DIA	CTL (n =9)	p
	Média ± Erro Padrão	
D0	234,07 ± 3,60	0,002
CX	260,20 ± 6,10	
D0	234,07 ± 3,60	0,006
1 PO	257,06 ± 6,70	
CX	260,20 ± 6,10	0,73
1 PO	257,06 ± 6,70	

LEGENDA: CTL = grupo controle. n = tamanho da amostra. p = nível de significância estatística. g = gramas. D0 = início do experimento. CX = dia da operação. 1 PO = primeiro dia pós-operatório.

TABELA J COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DOS PESOS (g) NO GRUPO DESNUTRIDO ENTRE O DIA 0, DIA DA OPERAÇÃO E 1 PO.

DIAS	DNT (n =9)	p
	Média ± Erro Padrão	
D 0	238,33 ± 4,42	0,0001
CX	198,48 ± 6,09	
D 0	238,33 ± 4,42	0,006
1 PO	198,49 ± 6,69	
CX	198,48 ± 6,09	1,0
1 PO	198,49 ± 6,69	

LEGENDA: DNT = grupo desnutrição. n = tamanho da amostra. p = nível de significância estatística. g = gramas. D0 = início do experimento. CX = dia da operação. 1 PO = primeiro dia pós-operatório.

TABELA L COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DOS PESOS (g) NO GRUPO RENUTRIDO ENTRE O DIA 0; D 15; DIA DA OPERAÇÃO E 1 PO.

DIAS	RNT (n =10)	
	Média ± Erro Padrão	p
D 0	233,15 ± 4,39	0,0001
D 15	196,52 ± 4,51	
D 0	233,15 ± 4,39	0,27
CX	226,92 ± 3,25	
D 0	233,15 ± 4,39	0,19
1 PO	224,66 ± 4,36	
D 15	196,52 ± 4,51	0,0001
CX	226,92 ± 3,25	
D 15	196,52 ± 4,51	0,003
1 PO	224,66 ± 4,36	
CX	226,92 ± 3,25	0,64
1 PO	224,66 ± 4,36	

LEGENDA: RNT = grupo renutrição. n = tamanho da amostra. p = nível de significância estatística. g = gramas. D0 = início do experimento. D15 = dia final da desnutrição e início do período de realimentação. CX = dia da operação. 1 PO = primeiro dia pós-operatório.

APENDICE 4: TABELAS (M, N, O) DEMONSTRANDO A MÉDIA DA CONTAGEM DAS FIGURAS DE MITOSE EM 20 CAMPOS DE GRANDE AUMENTO (40X), POR ANIMAL, NOS GRUPOS CTL, DNT E RNT.

TABELA M: MÉDIA DA CONTAGEM DO NÚMERO DAS FIGURAS DE MITOSE (n) POR CAMPO DE GRANDE AUMENTO – GRUPO CTL

GNH 1	5,50
GNH 2	3,90
GNH 3	1,60
GNH 4	2,25
GNH 5	2,95
GNH 6	3,35
GNH 7	3,90
GNH 8	4,00
GNH 10	1,55

Legenda: CTL= grupo controle; GNH= identificação do animal do grupo CTL.

TABELA N: MÉDIA DA CONTAGEM DO NÚMERO DAS FIGURAS DE MITOSE (n) POR CAMPO DE GRANDE AUMENTO – GRUPO DNT

GDH 1	0,50
GDH 2	2,20
GDH 4	0,15
GDH 5	1,25
GDH 5	1,30
GDH 7	0,75
GDH 8	0,85
GDH 9	3,70
GDH 10	7,20

Legenda: DNT= grupo desnutrição; GDH= identificação do animal do grupo DNT.

TABELA O: MÉDIA DA CONTAGEM DO NÚMERO DAS FIGURAS DE MITOSE (n) POR CAMPO DE GRANDE AUMENTO – GRUPO RNT

GRH 1	4,00
GRH 2	2,95
GRN 3	2,40
GRH 4	2,05
GRH 5	0,85
GRH 6	1,00
GRH 7	1,15
GRH 8	2,55
GRH 9	5,35
GRH 10	3,40

Legenda: RNT= grupo renutrição; GRH= identificação do animal do grupo RNT.

APÊNDICE 5: TABELA P DEMONSTRANDO A ANÁLISE ESTATÍSTICA DA CONTAGEM DO NÚMERO DE FIGURAS DE MITOSE (n) ENTRE OS GRUPOS.

TABELA P COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DAS MITOSES (número de figuras de mitose) ENTRE OS GRUPOS CTL, DNT E RNT.		
GRUPOS	MÉDIA DAS MITOSES	
	Média ± Erro Padrão	
CTL (n = 9)	3,22 ± 0,43	0,20
DNT (n = 9)	1,99 ± 0,79	
CTL (n = 9)	3,22 ± 0,43	0,36
RNT (n = 8)	2,57 ± 0,54	
DNT (n = 9)	1,99 ± 0,79	0,56
RNT (n = 10)	2,57 ± 0,54	

LEGENDA: CTL = grupo controle. DNT = grupo desnutrição. RNT = grupo renutrição. n = tamanho da amostra. p = nível de significância estatística.

APENDICE 6: TABELAS (Q, R, S) DEMONSTRANDO A CONTAGEM DE NÚCLEOS CORADOS PELO PCNA (n) EM 20 CAMPOS DE 17839,38 MICRÔMEROS.

TABELA Q: MÉDIA DA CONTAGEM DO NÚMERO DE NÚCLEOS CORADOS PELO PCNA (n) POR 17839,39 MICRÔMEROS – GRUPO CTL

GNH 1	13,65
GNH 2	16,75
GNH 3	16
GNH 4	13,05
GNH 5	16,05
GNH 6	20,1
GNH 7	21,35
GNH 8	16
GNH 10	15,35

Legenda: CTL= grupo controle; GNH= identificação do animal do grupo CTL.

TABELA R: MÉDIA DA CONTAGEM DO NÚMERO DE NÚCLEOS CORADOS PELO PCNA (n) POR 17839,39 MICRÔMEROS – GRUPO DNT

GDH 1	17,15
GDH 2	15,95
GDH 4	16,1
GDH 5	12,2
GDH 5	14,3
GDH 7	14,3
GDH 8	13,35
GDH 9	11,3
GDH 10	15,85

Legenda: DNT= grupo desnutrição; GDH= identificação do animal do grupo.

TABELA S: MÉDIA DA CONTAGEM DO NÚMERO DE NÚCLEOS CORADOS PELO PCNA (n) POR 17839,39 MICRÔMEROS – GRUPO RNT

GRH 1	21,95
GRH 2	18,35
GRN 3	18,45
GRH 4	20,8
GRH 5	21,2
GRH 6	17,65
GRH 7	19,85
GRH 8	16,6
GRH 9	19,45
GRH 10	22,4

Legenda: RNT= grupo renutrição; GRH= identificação do animal do grupo

APENDICE 7: TABELA T DEMONSTRANDO A ANÁLISE ESTATÍSTICA DA CONTAGEM DE NUCLEOS CORADOS PELO PCNA (n) ENTRE OS GRUPOS.

TABELA T COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DOS NÚMEROS DE NÚCLEOS CORADOS PELO PCNA (n) ENTRE OS GRUPOS CTL, DNT E RNT.

GRUPOS	PCNA positivo	
	Média ± Erro Padrão	p
CTL (n = 9)	13,91 ± 0,86	0,10
DNT (n = 9)	16,48 ± 1,14	
CTL (n = 9)	13,91 ± 0,86	0,0003
RNT (n = 10)	19,67 ± 0,86	
DNT (n = 9)	16,48 ± 1,14	0,04
RNT (n = 10)	19,67 ± 0,86	

LEGENDA: CTL = grupo controle. DNT = grupo desnutrição. RNT = grupo renutrição. n = tamanho da amostra. p = nível de significância estatística

APENDICE 8: TABELAS (U, V, X) DEMONSTRANDO OS GRAUS DE ESTEATOSE E A PERCENTAGEM ENCONTRADOS EM CADA ANIMAL.

TABELA U: GRAU DE ESTEATOSE E PERCENTAGEM NAS LÂMINAS CORADAS POR HE EM CADA ANIMAL DO GRUPO CTL

Rato	Grau de Esteatose	%
GNH 1	micronodular leve	15
GNH 2	ausente	0
GNH 3	ausente	5
GNH 4	micronodular leve	15
GNH 5	micronodular leve	20
GNH 6	ausente	0
GNH 7	ausente	5
GNH 8	ausente	0
GNH 10	micronodular leve	15

Legenda: CTL= grupo controle; GRH= identificação do animal do grupo; HE = coloração de hematoxilina-eosina

TABELA V: GRAU DE ESTEATOSE E PERCENTAGEM NAS LÂMINAS CORADAS POR HE EM CADA ANIMAL DO GRUPO DNT

Rato	Grau de Esteatose	%
GDH 1	intensa	85
GDH 2	intensa	90
GDH 4	moderada	60
GDH 5	intensa	90
GDH 6	moderada	60
GDH 7	intensa	95
GDH 8	intensa	95
GDH 9	moderada	55
GDH 10	Intensa	85

Legenda: DNT= grupo desnutrido; GRH= identificação do animal do grupo; HE = coloração de hematoxilina-eosina

TABELA X: GRAU DE ESTEATOSE E PERCENTAGEM NAS LÂMINAS CORADAS POR HE EM CADA ANIMAL DO GRUPO RNT

Rato	Grau de Esteatose	%
GRH 1	micronodular leve	20
GRH 2	ausente	0
GRH 3	micronodular leve	20
GRH 4	micronodular leve	15
GRH 5	micronodular leve	20
GRH 6	micronodular leve	15
GRH 7	ausente	0
GRH 8	micronodular leve	25
GRH 9	ausente	5
GRH 10	ausente	5

Legenda: NT= grupo renutrição; GRH= identificação do animal do grupo; HE = coloração de hematoxilina-eosina

APENDICE 9: TABELA Z DEMONSTRANDO A ANÁLISE ESTATÍSTICA ENTRE OS GRUPOS DA ÁREA (%) OCUPADA POR ESTEATOSE.

TABELA Z COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DA ÁREA OCUPADA POR ESTEATOSE (%) ENTRE OS GRUPOS CTL, DNT E RNT.		
GRUPOS	GRAU DE ESTEATOSE (%)	
	Média ± Erro Padrão	p
CTL (n = 9)	8,33 ± 2,63	0,0000
DNT (n = 9)	79,44 ± 5,43	
CTL (n = 9)	8,33 ± 2,63	0,31
RNT (n = 10)	12,50 ± 2,91	
DNT (n = 9)	79,44 ± 5,43	0,0000
RNT (n = 10)	12,50 ± 2,91	

LEGENDA: CTL = grupo controle. DNT = grupo desnutrição. RNT = grupo renutrição. n = tamanho da amostra. p = nível de significância estatística