

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARCIANO ANGHINONI

EFEITO DA QUIMIOTERAPIA PRÉ-OPERATÓRIA COM 5-FLUOROURACIL
ENDOVENOSO SOBRE A REGENERAÇÃO HEPÁTICA INDUZIDA POR
HEPATECTOMIA EXTENSA EM RATOS

Curitiba
2013

MARCIANO ANGHINONI

EFEITO DA QUIMIOTERAPIA PRÉ-OPERATÓRIA COM 5-FLUOROURACIL
ENDOVENOSO SOBRE A REGENERAÇÃO HEPÁTICA INDUZIDA POR
HEPATECTOMIA EXTENSA EM RATOS

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

Orientador: Prof. Dr. Jorge Eduardo Fouto Matias.

Curitiba
2013

A588 Anghinoni, Marciano.
Efeito da quimioterapia pré-operatória com 5-fluorouracil endovenoso na regeneração hepática induzida por hepatectomia extensa em ratos / Marciano Anghinoni. – Curitiba, 2013.
104 f.: il.; color.; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Eduardo Fouto Matias.
Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica do Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná.

1. Regeneração hepática. 2. Quimioterapia. 3. Fluoruracila. 4. Hepatectomia. 5. Ratos. I. Título. II. Matias, Jorge Eduardo Fouto.

NLM: QV 269

*Dedico esta obra aos meus pais Hermes e Eida,
à minha esposa Juliana e
à minha filha Gabriela.*

Agradecimentos

À Deus, por permitir a minha existência com saúde, por proporcionar o intelecto necessário à realização desta dissertação, e por me privilegiar com maravilhosas pessoas ao longo de minha existência, como as citadas neste texto.

À minha esposa Juliana, por me encorajar e acreditar, suprimindo-me de esperança e vontade. Por estar presente dia após dia, compartilhando os sonhos, os medos, os erros e as angústias. Obrigado pela sua paciência, dedicação irrestrita, amor e carinho, demonstrados a todo o momento.

À minha filha Gabriela, que na pureza de seus quatro anos de idade, ainda não pode compreender a razão de meu agradecimento. A você, minha gratidão por me dar ânimo, esperança e amor, e também pelo tempo de pai que lhe tomei emprestado em vários momentos dedicados a esta obra.

Aos meus pais Hermes e Eida, que me ensinaram os valores e princípios que moldaram meu caráter. Por sua cumplicidade e amor incondicional, e por seu esforço em buscar sempre o melhor ao investir na minha formação e educação.

Ao orientador e amigo, Professor Dr. Jorge Eduardo Fouto Matias que, com sua sabedoria e espírito científico inspirador, conduziu o meu trabalho com dedicação, seriedade e ética.

Aos amigos cirurgiões Tiago Kuchnir Correa e Felipe Pedrotti Locatelli, pela valorosa ajuda nos procedimentos práticos.

À secretária do Departamento de pós-graduação em Cirurgia, Regina Sass, pela sua atenção, orientações e auxílio com as questões administrativas do Programa.

À amiga Dra. Maria Célia Borges da Fonseca, pelo apoio e incentivo, por me mostrar o caminho da certeza e por me fazer acreditar nesta e em outras conquistas

Aos funcionários da Universidade Federal do Paraná, por toda a ajuda no laboratório de pesquisa.

À CAPES, por prover a bolsa de mestrado.

Ainda, os meus cordiais agradecimentos às pessoas que de uma maneira ou de outra contribuíram para a realização desta dissertação, cujos nomes estão aqui omitidos.

*“Não basta ensinar ao homem uma especialidade,
porque ele se tornará uma máquina utilizável e não uma personalidade.
É necessário que ele adquira um sentimento,
o senso prático daquilo que vale a pena ser empreendido,
daquilo que é belo,
daquilo que é moralmente correto.
Portanto,
jamais considere seus estudos como uma obrigação,
mas como uma oportunidade invejável de aprender sobre a influência
libertadora da beleza no domínio do espírito,
para seu próprio prazer pessoal
e para proveito da comunidade à qual seu trabalho irá pertencer.”*

Albert Einstein

RESUMO

A quimioterapia pré-operatória é utilizada como estratégia neoadjuvante em pacientes portadores de metástases hepáticas de câncer colorretal, com o objetivo de melhorar as taxas de ressecabilidade oncológica. Apesar dos efeitos tóxicos dos diferentes esquemas de quimioterapia ao parênquima hepático serem bem conhecidos, o potencial da quimioterapia neoadjuvante em interferir nos mecanismos de regeneração hepática após procedimentos de ressecção do fígado ainda é desconhecido. Este estudo teve por objetivo avaliar o efeito do quimioterápico 5-Fluorouracil (5-FU) administrado por via endovenosa em dose única, na capacidade de regeneração hepática após uma hepatectomia extensa em ratos. Utilizou-se um modelo experimental de indução da regeneração, que consiste na ressecção de 70% do fígado do rato. Quarenta ratos *wistar* machos foram divididos em dois grupos de 20 animais: Grupo 5-Fluorouracil (GF) e Grupo Controle (GC). O grupo GF foi submetido à administração de 5-Fluorouracil, por via endovenosa na dose única de 20 mg/Kg, 24 horas antes de hepatectomia à 70%. O grupo GC foi submetido à injeção endovenosa de soro fisiológico a 0,9% em dose única, 24 horas antes de hepatectomia a 70%. Após à hepatectomia cada grupo foi dividido em dois subgrupos de 10 animais, de acordo com o dia do sacrifício: 24 horas (GF_{24hs} e GC_{24hs}) ou 7 dias (GF_{7d} e GC_{7d}). Foram coletadas as amostras do fígado dos animais no dia do sacrifício para análise histológica e imuno-histoquímica. Para a avaliação da regeneração hepática, foram utilizados quatro parâmetros: Fórmula de Kwon, Índice Mitótico e os marcadores imuno-histoquímicos de proliferação celular PCNA e Ki-67. Para a análise estatística foram utilizados o teste t de *Student* e o teste Mann-Whitney, com nível de significância < 0,05. Como resultados, não houve interferência da droga utilizada no peso dos animais, quando analisadas as diferenças de peso entre os subgrupos nos diferentes períodos. Em relação ao efeito da droga no peso do fígado dos animais, houve redução ponderal no subgrupo GF_{24hs} em comparação ao subgrupo GC_{24hs} no momento da hepatectomia. Houve também redução ponderal em ambos os subgrupos 5-FU de 24 horas e 7 dias no momento do sacrifício. Analisando-se os parâmetros de regeneração, houve interferência negativa da droga, no período de 24 horas, na análise dos seguintes parâmetros: Fórmula de Kwon e Imuno-histoquímica por PCNA. Na avaliação do efeito do 5-FU no período de 7 dias, houve interferência negativa da droga sobre a regeneração hepática na análise dos seguintes parâmetros: Fórmula de Kwon e Imuno-histoquímica por PCNA e Ki-67. Concluiu-se que, no modelo experimental empregado, a administração pré-operatória do fármaco 5-Fluorouracil por via endovenosa, interferiu negativamente no fenômeno de regeneração hepática induzida hepatectomia à 70% em ratos.

Palavras-chave: Regeneração hepática. Quimioterapia. Fluoruracila. Hepatectomia. Ratos.

ABSTRACT

Preoperative chemotherapy is used as a neoadjuvant strategy in patients with hepatic metastases of colorectal cancer, aiming to improve oncological resectability rates. Despite the well known toxic effects of different chemotherapy schemes over hepatic parenchyma, the potential of neoadjuvant chemotherapy to interfere with hepatic regeneration mechanisms after liver resection procedures is still unknown. This study aimed to evaluate the effect of chemotherapeutical agent 5-Fluorouracil (5-FU), intravenously administered as a single dose, in relation to the capacity of hepatic regeneration after hepatectomy was investigated in rats. Forty male *wistar* rats had been divided into two groups of 20 animals: 5-Fluorouracil Group (GF) and Control Group (GC). GF Group was given a 20 mg/Kg single dose of intravenously administered 5-Fluorouracil, 24 hours before the hepatectomy up to 70%. GC Group was given a single dose of intravenously administered normal saline (0.9%) 24 hours before the hepatectomy up to 70%. We used an experimental model of regeneration induction, consisting of 70% resection of the mouse's liver. After the hepatectomy, each group was divided into two subgroups of 10 animals, according to the day of sacrifice: 24 hours (GF_{24hs} and GC_{24hs}) or 7 days (GF_{7d} and GC_{7d}). The samples from the animals' liver were collected on the day of sacrifice for histological and immunohistochemistry (IHC) analysis. For the assessment of hepatic regeneration, four parameters were used: Formula of *Kwon*, mitotic index and IHC markers of cell proliferation PCNA and Ki-67. For the statistics analysis test t of *Student* and Mann-Whitney tests were applied, with level of significance < 0,05. After analyzing the differences in weight on subgroups at different periods, the result showed no interference of the drug used with the animals' weight. The effect of the drug over the animals' liver weight was a ponderal reduction in subgroup GF_{24hs} compared with subgroup GC_{24hs} at the moment of the hepatectomy. There's also been a weight reduction in both 5-FU subgroups of 24hs and 7 days at the time of the sacrifice. Considering the regeneration parameters, there was negative interference of the drug in the 24hs period, under the analysis of the following parameters: Formula of *Kwon* and IHC (immunohistochemistry) by PCNA. Considering the effect of 5-FU during 7 days time, there was negative interference of the drug over hepatic regeneration, under the analysis of the following parameters: Formula of *Kwon* and IHC (immunohistochemistry) by PCNA and Ki-67. It was concluded that in the experimental model employed the preoperative use of the 5-Fluorouracil intravenously administrated has negatively interfered with the hepatic regeneration phenomenon hepatectomy induced up to 70% in rats.

Keywords: Liver regeneration. Chemotherapy. Fluorouracil. Hepatectomy. Rats.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - ESTRUTURA MOLECULAR DO 5-FLUOROURACIL.....	28
FIGURA 2 - VIAS METABÓLICAS DO 5-FLUOROURACIL	30
FIGURA 3 - ANATOMIA HEPÁTICA NO RATO.....	39
FIGURA 4 - DIAGRAMA ILUSTRATIVO DA HEPATECTOMIA PARCIAL EM RATOS.....	40
FIGURA 5 - VAPORIZADOR DO ANESTÉSICO INALATÓRIO (A) E SISTEMA DE ANESTESIA INALATÓRIA CONTÍNUA (B)	45
FIGURA 6 - BALANÇA DE PRECISÃO UTILIZADA PARA O EXPERIMENTO	46
FIGURA 7 - ANIMAL EM ANESTESIA CONTÍNUA INALATÓRIA POR MÁSCARA PLÁSTICA ADAPTADA À CABEÇA, EM POSIÇÃO PARA OS PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS.....	48
FIGURA 8 - TÉCNICA DE INJEÇÃO ENDOVENOSA EM VEIA DA CAUDA .	50
FIGURA 9 - LAPAROTOMIA NO RATO	51
FIGURA 10 - A HEPATECTOMIA PARCIAL.....	52
FIGURA 11 - COLETA DO FÍGADO REGENERADO.....	53
FIGURA 12 - FÓRMULA DE KWON.....	54
FIGURA 13 - FOTOMICROGRAFIA (HE X 400) REVELANDO FIGURAS DE MITOSES	55
FIGURA 14 - FOTOMICROGRAFIA (X 400) REVELANDO POSITIVIDADE NUCLEAR PARA PCNA	57
FIGURA 15 - FOTOMICROGRAFIA (X 400) REVELANDO POSITIVIDADE DE COLORAÇÃO PARA KI-67	57

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - MÉDIA DOS PESOS INICIAL E NO ÓBITO DE CADA SUBGRUPO.....	59
GRÁFICO 2 - AVALIAÇÃO DA PERCENTAGEM DA REGENERAÇÃO HEPÁTICA PELA FÓRMULA DE KWON	64
GRÁFICO 3 - AVALIAÇÃO DA REGENERAÇÃO HEPÁTICA PELO ÍNDICE MITÓTICO.....	65
GRÁFICO 4 - AVALIAÇÃO DA REGENERAÇÃO HEPÁTICA PELO PCNA ...	66
GRÁFICO 5 - AVALIAÇÃO DA REGENERAÇÃO HEPÁTICA PELO KI-67..	67

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1** - COMPARAÇÃO DOS PESOS ENTRE OS GRUPOS CONTROLE E ESTUDO (5-FU) NO DIA DA ADMINISTRAÇÃO DA DROGA (INICIAL), NO DIA DA HEPATECTOMIA E NO DIA DO SACRIFÍCIO, NOS PERÍODOS DE 24 HORAS DIA E SETE DIAS: TESTE *t*..... 60
- TABELA 2** - ANÁLISE ESTATÍSTICA DAS MÉDIAS DO PESO DO FÍGADO (G) NA HEPATECTOMIA NA COMPARAÇÃO INTERGRUPOS E INTRAGRUPOS: TESTE *t*..... 61
- TABELA 3** - ANÁLISE ESTATÍSTICA DAS MÉDIAS DO PESO DO FÍGADO (G) NO DIA DO SACRIFÍCIO. COMPARAÇÃO INTERGRUPOS E INTRAGRUPOS: TESTE *t*..... 62
- TABELA 4** - ANÁLISE ESTATÍSTICA DAS MÉDIAS DA RELAÇÃO DO PESO DO FÍGADO REGENERADO (g) SOBRE O PESO CORPORAL (g). COMPARAÇÃO INTERGRUPOS: TESTE *t*.....63

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AMP	- Monofosfato de adenosina
ANVISA	- Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CCR	- Câncer colorretal
CEP/SD	- Comitê de ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde
CELIM	- Cetuximab in Neoadjuvant Treatment of Non-Resectable Colorectal Liver Metastases
5-FU	- 5-Fluorouracil
CNS	- Conselho Nacional de Saúde
COBEA	- Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
DHFU	- Dihidrofluorouracil
DNA	- Ácido desoxirribonucléico
dp	- Desvio-padrão
DPD	- Di-hidropirimidina desidrogenase
dTMP	- Desoxitimidina monofosfato
EGF	- Fator de crescimento epidérmico
EORTC	- <i>European organization for research and treatment for cancer</i>
EUA	- Estados Unidos da América
FDA	- <i>Food and Durg administration</i>
FdUDP	- Difosfato de fluorodeoxiuridina
FdUMP	- Monofosfato de fluorodeoxiuridina
FdUTP	- Trifosfato de fluorodeoxiuridina
FGF	- Fator de Crescimento de Fibroblastos
FOLFIRI	- Fluorouracil + leucovorin + Irinotecano
FOLFOX4	- Fluorouracil + leucovorin + oxaliplatina, esquema tipo 4
FOLFOXIRI	- Fluorouracil + leucovorin + oxaliplatina + irinotecano
FUDP	- Fluorouridina difosfato
FUdR	- Fluorodeoxiuridina
FUMP	- Fluorouridina monofosfato

FUTP	- Fluorouridina trifosfato
FUR	- Fluorouridina
GC1	- Grupo controle 1
GC2	- Grupo controle 2
GC2	- Grupo Fluorouracil 2
GF1	- Grupo Fluorouracil 1
HE	- Hematoxilina-eosina
HGF	- Fator de crescimento de hepatócitos
HP	- Hepatectomia parcial
HSS	- Substância estimuladora hepática
IL – 2	- Interleucina – 2
IL - 6	- Interleucina – 6
INCA	- Instituto Nacional de Câncer
InMETRO	- Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
KU	- Uridina quinase
LC	- Lobo caudado
LLD	- Lobo lateral direito
LLE	- Lobo lateral esquerdo
LM	- Lobo mediano
NCCTG	- <i>North Central treatment cancer group</i>
NSABP	- <i>National Surgical Adjuvant Breast an Bowel Project</i>
OPRT	- Orotato fosforibosiltransferase
PRPP	- Pirofosfato de fosforribosil
PCNA	- Antígeno nuclear de proliferação celular
PVPI	- Povinilpirrolidona-iodo
QNA	- Quimioterapia neoadjuvante
RNA	- Ácido desoxirribonucléico
RR	- Ribonucleotideo-redutase
TECPAR	- Instituto de Tecnologia do Paraná
TGF -β	- Fator transformador de crescimento beta
TGF-α	- Fator transformador de crescimento alfa

TNF-α	- Fator de necrose tumoral alfa
TP	- Timidina Fosforilase
TK	- Timidina-quinase
TS	- Timidilato sintase
UFPR	- Universidade Federal do Paraná
UP	- Uridina fosforilase
UK	- Uridina Quinase
μ-TGF	- Fator Transformador do Crescimento-alfa
μm	- Micrômetro ou milésimo de milímetro
XELOX	- Xeloda + Oxaliplatina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 OBJETIVOS	19
1.1.1 <i>Objetivo Geral</i>	19
1.1.2 <i>Objetivos Específicos</i>	19
2 REVISÃO DA LITERATURA	21
2.1 O CÂNCER COLORRETAL	21
2.1.1 <i>Metástases Hepáticas de Câncer Colorretal</i>	21
2.1.2 <i>Quimioterapia Neoadjuvante para Metástases Hepáticas de Câncer Colorretal</i>	23
2.1.3 <i>O 5-Fluorouracil</i>	27
2.1.4 <i>Quimioterapia Neoadjuvante e Hepatotoxicidade</i>	31
2.2 A REGENERAÇÃO HEPÁTICA	33
2.2.1 <i>O Processo Regenerativo</i>	34
2.2.2 <i>Modelo Experimental de Regeneração Hepática</i>	38
2.3 EFEITO DO 5-FU NA REGENERAÇÃO HEPÁTICA	41
3 MATERIAL E MÉTODO	44
3.1 MATERIAL	44
3.1.1 <i>Animais de Experimentação</i>	44
3.1.2 <i>Drogas e Soluções</i>	44
3.1.3 <i>Materiais de Anestesia</i>	45
3.1.4 <i>Material Cirúrgico</i>	46
3.1.5 <i>Outros Materiais</i>	46
3.2 MÉTODO	47
3.2.1 <i>Grupos de Estudo</i>	47
3.2.2 <i>Anestesia Inalatória</i>	47
3.2.3 <i>Técnica de Administração Endovenosa do Quimioterápico</i>	48
3.2.4 <i>Hepatectomia Parcial</i>	50
3.2.5 <i>Sacrifício e Coleta do Fígado Remanescente (regenerado ou não)</i>	52
3.2.6 <i>Avaliação da Regeneração Hepática pela Fórmula de Kwon</i>	53
3.2.7 <i>Avaliação da Regeneração Hepática pelo Índice Mitótico</i>	54
3.2.8 <i>Avaliação da Regeneração Hepática por Imuno-Histoquímica</i>	55
3.2.9 <i>Análise Estatística</i>	58
4 RESULTADOS	59
4.1 PESO DOS ANIMAIS	59
4.2 PESO DO FÍGADO	60
4.3 AVALIAÇÃO DA REGENERAÇÃO HEPÁTICA PELA FÓRMULA DE KWON	63
4.4 AVALIAÇÃO DA REGENERAÇÃO HEPÁTICA PELO ÍNDICE MITÓTICO	64
4.5 AVALIAÇÃO DA REGENERAÇÃO HEPÁTICA PELO PCNA	65
4.6 AVALIAÇÃO DA REGENERAÇÃO HEPÁTICA PELO KI-67	66

5 DISCUSSÃO	68
6 CONCLUSÕES	81
REFERÊNCIAS.....	82
APÊNDICES	95
ANEXOS	101

1 INTRODUÇÃO

A quimioterapia pré-operatória é uma estratégia terapêutica oncológica objetivando melhores resultados, inclusive melhores taxas de sobrevida em pacientes com diversos tipos de câncer. No câncer colorretal (CCR), a quimioterapia pré-operatória, pode ser realizada dentro de um contexto de neoadjuvância, com o intuito de melhorar os resultados cirúrgicos dos pacientes com metástases hepáticas que serão submetidos à ressecção. A quimioterapia neoadjuvante (QNA) tem emergido como um tratamento de vanguarda associado à melhoria das taxas de sobrevida, permitindo o aumento do número de pacientes que podem ser submetidos ao tratamento cirúrgico.

O CCR configura-se como a terceira causa mais comum de câncer ao redor do mundo para ambos os sexos, e a segunda causa em países desenvolvidos. Cerca de 9,4% de todos os cânceres são do cólon e reto, equivalendo a 1 milhão de casos novos por ano no mundo (SIEGEL *et al.*, 2013).

Dependendo do estágio inicial, até 75% dos pacientes desenvolverão metástases hepáticas, as quais se constituem na principal causa de óbito desta patologia. A ressecção cirúrgica permanece, até a presente data, como o único tratamento capaz de oferecer sobrevida longa em 25 a 40% dos pacientes. Apesar das controvérsias acerca dos reais critérios de ressecção com margens satisfatórias e exames que excluam metástases em outros sítios, apenas 15 a 20% dos pacientes com metástases hepáticas de CCR são elegíveis para a ressecção cirúrgica, na avaliação inicial (ADAM *et al.*, 2012).

Os progressos ocorridos nas estratégias multimodais, incluindo a QNA e outras drogas como a oxaliplatina e irinotecano, abriram novas perspectivas no tratamento de metástases ressecáveis e irressecáveis (DE GRAMONT *et al.*, 2000; CUNNINGHAM *et al.*, 2004; HURWITZ *et al.*, 2004). Recentemente, a combinação desses esquemas à terapias alvo, com drogas como o bevacizumabe e o cetuximabe, tem aumentado ainda mais as taxas de resposta (FOLPRECHT, *et al.*, 2010; ADAM *et al.*, 2012).

No entanto, o efeito dessas drogas e suas associações no potencial de regeneração hepática do parênquima remanescente após a realização da hepatectomia ainda é desconhecido. Portanto, a importância do conhecimento dos efeitos da QNA sobre o tecido hepático é crucial já que o número de pacientes tratados com esquemas neoadjuvantes com intenção de otimização da ressecção tem aumentado progressivamente. Além disso, as controvérsias acerca dos reais efeitos da QNA sobre os resultados da ressecção ainda persistem.

A maioria dos estudos clínicos tem focado apenas a sobrevida dos pacientes tratados com essa estratégia multimodal, sendo ignoradas as alterações ocasionadas no parênquima hepático e suas consequências de longo prazo. Da mesma maneira, não está bem estabelecido quando o risco de insuficiência hepática é maior nos diferentes esquemas de quimioterapia ou neoplasias de base.

Os efeitos tóxicos da quimioterapia sobre o parênquima hepático, principalmente dos esquemas contendo irinotecano e oxaliplatina, são bem conhecidos. Embora alguns estudos tenham revelado que a QNA para

metástases hepáticas de CCR aumenta a morbidade e taxa de complicações pós-operatórias (ZORZI *et al.*, 2007; MORRIS-STIFF *et al.*, 2008), estudos mais recentes revelaram que os mesmos esquemas de quimioterapia não aumentam os riscos de uma ressecção hepática e as complicações pós-cirúrgicas (MACOWIEC *et al.*, 2011; WOLF *et al.*, 2013).

Entretanto, não existem estudos de fase III que avaliem especificamente os efeitos da QNA sobre o potencial regenerativo do fígado submetido a uma ressecção.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito do quimioterápico 5-Fluorouracil administrado por via endovenosa pré-hepatectomia no processo de regeneração hepática em um modelo experimental de hepatectomia extensa em ratos.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Determinar a porcentagem de regeneração hepática aferida pela fórmula de Kwon em dois momentos distintos após hepatectomia extensa, em ratos submetidos à administração pré-operatória de 5-fluorouracil endovenoso;
- Estabelecer, através de histologia convencional, o Índice Mitótico dos hepatócitos em dois momentos distintos de

regeneração hepática após hepatectomia extensa, em ratos submetidos à administração pré-operatória de 5-fluorouracil endovenoso;

- Determinar através dos marcadores imuno-histoquímicos PNCA e Ki-67 e o índice de proliferação celular em dois momentos distintos da regeneração hepática, após hepatectomia extensa em ratos submetidos à administração pré-operatória de 5-fluorouracil endovenoso.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 O CÂNCER COLORRETAL

O CCR é considerado um dos maiores problemas de saúde pública mundial. Configura-se como a terceira causa mais comum de câncer no mundo, com um milhão de casos novos diagnosticados por ano. Nos EUA, é a terceira causa mais comum de câncer, e a segunda causa de morte por neoplasia. De acordo com as estimativas do Instituto Nacional de Câncer (INCA) para o ano de 2012, no Brasil ocorreram 14.180 novos casos de CCR em homens e 15.960 em mulheres. Apesar dessas estatísticas, a mortalidade do CCR tem apresentado uma curva decrescente nas últimas décadas, possivelmente em razão de melhores estratégias de rastreamento e avanços nas modalidades terapêuticas. A sobrevida média global em cinco anos é de aproximadamente 55% para todos os estágios.

2.1.1 Metástases Hepáticas de Câncer Colorretal

Apesar dos significativos avanços nas modalidades de diagnóstico e tratamento de pacientes com câncer, a propagação da doença a partir do sítio primário para outros órgãos continua a ser a principal causa de morbidade e mortalidade relacionadas ao câncer (HANAHAN *et al.*, 2011). A metastatização é um processo de várias etapas, através das quais as células cancerosas difundem-se a partir de tumores primários e estabelecem lesões secundárias

em órgãos distantes.

O processo metastático é constituído por uma série de fases distintas (FIDLER, 1990). Essas fases configuram uma sequência de eventos biológicos que incluem fuga do tumor primário, extravasamento linfático ou para os sistemas vasculares, a sobrevivência celular na circulação sanguínea, a passagem pelos mecanismos de defesa do hospedeiro, instalação das células em um novo local, o extravasamento para o tecido e o crescimento celular e tecidual no novo local (CHAMBERS, 2002).

Dessa maneira, o processo de metastatização envolve uma série de interações complexas entre as células tumorais e seu microambiente que afetam a sua eficácia biológica e facilitam a instalação de células neoplásicas em órgãos distantes. As pesquisas têm revelado que determinados tipos de tumor primário são mais propensos a metastatizar para órgãos específicos (FIDLER, 2003). Por exemplo, o CCR, afeta predominantemente o fígado, mas raramente os ossos ou o cérebro (LUX, KANG, 2007). Vários fatores estão relacionados a esse tropismo específico: a origem celular, as propriedades intrínsecas celulares e suas afinidades tumorais em tecidos, sendo que os padrões de circulação determinam os locais de disseminação do tumor (HORAK, STEEG, 2005).

O fígado é um dos principais alvos de disseminação de vários tipos de câncer e geralmente o único sítio de metástases no CCR. As metástases hepáticas são a principal causa de mortalidade em pacientes com CCR; no entanto, as razões para a preferência das células metastáticas do CCR pelo fígado ainda não foram elucidadas. É bem provável que a drenagem portal do

trato gastrointestinal seja parcialmente responsável pela elevada taxa de metástases hepáticas em CCR. No entanto, variáveis moleculares adicionais são, sem dúvida, essenciais para determinar esse mecanismo (NGUYEN *et al.*, 2009).

2.1.2 Quimioterapia Neoadjuvante para Metástases Hepáticas de Câncer Colorretal

A ideia de tratamento quimioterápico pré-operatório existe há mais de duas décadas, sendo que foram publicados diversos estudos clínicos para avaliar o tratamento quimioterápico, com o objetivo de redução de lesões tumorais e posterior ressecção das mesmas. Bismuth *et al.*, em 1996, reportaram uma pequena porcentagem de pacientes que obtiveram uma significativa redução tumoral de suas lesões hepáticas metastáticas com tratamento quimioterápico prévio. Esses pacientes eram submetidos a uma tentativa de ressecção completa, obtendo-se taxas de sobrevida em cinco anos de até 40%. Tais resultados também foram reproduzidos em outros estudos. Nesta época, porém, os critérios de seleção de pacientes eram bem diferentes e mais restritos que os atuais (GIACHETTI *et al.*, 1999; ADAM *et al.*, 2001; WEIN *et al.*, 2001).

Atualmente, vislumbramos outro cenário no tratamento dos pacientes com metástases hepáticas de CCR. Os critérios de indicação para ressecção curativa estão evoluindo, com ênfase em obter uma ressecção completa das lesões, atingindo margens negativas enquanto mantém-se uma função hepática adequada ao invés do critério clássico do tamanho e número das lesões. Avanços também ocorreram no campo do tratamento quimioterápico

sistêmico com a melhora dos resultados, utilizando-se novas combinações de drogas, e dessa forma, proporcionando melhores taxas de resposta (de 20% para cerca de 50%). Tais tratamentos são capazes de tornar pacientes com lesões inicialmente irressecáveis em pacientes com lesões ressecáveis, transformando tratamentos inicialmente paliativos em curativos. Com essas novas estratégias, os ganhos de sobrevida global em cinco anos subiram para 30 a 40%, existindo séries que relataram até 58% (ABDALLA *et al.*, 2004), resultados substancialmente melhores que os observados no tratamento quimioterápico exclusivo, que varia de 4 a 9% mesmo com os melhores esquemas terapêuticos disponíveis (GIACHETTI *et al.*, 1999; ADAM *et al.*, 2001; POZZO *et al.*, 2004; BARONE *et al.*, 2007).

Da mesma forma, a presença de outros sítios de metástases extra-hepáticas limitadas (particularmente de pulmão) não deve ser considerada uma contraindicação à ressecção, desde que a doença extra-hepática também seja passível de ressecção completa. No entanto, os resultados destes pacientes não são tão favoráveis, especialmente quando há múltiplas metástases hepáticas e vários sítios de doença extra-hepática (PULITANO, 2011).

Para os pacientes com doença limitada ao fígado e inicialmente irressecável, o tratamento com quimioterapia pré-operatória está bem estabelecido na prática clínica, com o objetivo de proporcionar uma redução nas dimensões das lesões, tornando-as passíveis de ressecção (terapia de conversão). Porém, o tratamento quimioterápico pré-operatório também pode ser aplicado em doenças inicialmente classificadas como ressecáveis (terapia neoadjuvante). As vantagens para esta abordagem terapêutica incluem o

tratamento precoce das micrometástases, além do fato de ser possível avaliar-se a efetividade do esquema proposto, que pode inclusive ajudar na decisão do tratamento adjuvante e, ainda, evitar um tratamento local desnecessário em pacientes que progridem precocemente.

Como desvantagens, temos o dano hepático induzido pela quimioterapia, perda da oportunidade de ressecção cirúrgica pela ausência de resposta à quimioterapia, e a possível resposta clínica completa, dificultando a avaliação das áreas para ressecção (LEONARD *et al.*, 2005; van VLEDDER, *et al.*, 2010). Nestes pacientes, em que não há mais evidência de doença aos exames de imagem, existem estudos que indicam uma grande possibilidade de haver doença residual viável nos locais das lesões prévias, com taxas de apenas 17% de resposta patológica completa (BENOIST *et al.*, 2006; van VLEDDER *et al.*, 2010).

No estudo de Nordlinger, Sorbye, Glimelius *et al.* (2008), a análise de resposta ao tratamento nos pacientes com doença metastática ressecável ao diagnóstico foi avaliada no estudo fase III EORTC 40983. Nele, os pacientes eram elegíveis para ressecção cirúrgica exclusiva ou quimioterapia peri-operatória (FOLFOX4 por seis ciclos antes e depois da cirurgia). Em três anos, houve um ganho absoluto de sobrevida da ordem de 9,2% ($p=0,025$) para os pacientes submetidos à quimioterapia e cirurgia, em comparação com cirurgia exclusiva. A taxa de resposta após quimioterapia foi de 40% e a mortalidade cirúrgica foi menor que 1%, parecida ou aproximada para os dois grupos. Este benefício de 9,2% é semelhante ao obtido no tratamento adjuvante de pacientes em estágio III. Os resultados de longo prazo do estudo

recém concluído NSABP C-11 ajudarão a avaliar o real benefício da QNA. Nele, os pacientes, todos com doença hepática ressecável, foram divididos em dois grupos: cirurgia seguida de tratamento quimioterápico por 12 ciclos, ou, seis ciclos de QNA, seguida de cirurgia e mais seis ciclos de quimioterapia. Os esquemas quimioterápicos utilizados foram o FOLFOX6 ou FOLFIRI, conforme exposição prévia à oxaliplatina.

Um estudo, de Pozzo, Basso e Cassano (2004), avaliou 40 pacientes com doença irressecável, que foram expostos a esquemas com irinotecano. Destes, 32,5% foram submetidos à ressecção com intuito curativo após quimioterapia. Embora os índices de resposta objetiva sejam semelhantes entre esquemas com oxaliplatina ou irinotecano, os esquemas quimioterápicos contendo oxaliplatina apresentaram maiores índices de ressecabilidade hepática (TOURNIGAND *et al.*, 2004). Outro estudo fase II do NCCTG avaliou o tratamento de conversão com esquema baseado em oxaliplatina em 42 pacientes, sendo que 60% obtiveram resposta objetiva e 40% foram submetidos à ressecção cirúrgica (ALBERTS *et al.*, 2005).

Na tentativa de aumentar as taxas de resposta e consequente ressecabilidade, Falcone, Ricci, Brunetti *et al.* (2007), realizaram um estudo em que compararam o esquema FOLFOXIRI versus FOLFIRI em 244 pacientes. Houve no grupo FOLFOXIRI, um incremento significativo na taxa de resposta (35 vs 58%), taxas de ressecção completa (6 vs 15% entre todos os pacientes e 12 vs 36% naqueles com apenas metástases hepáticas), além de ganho na sobrevida livre de progressão e sobrevida global (16,7 vs 22,6 meses), porém, com aumento significativo nos índices de neuropatia periférica e neutropenia.

Vários estudos avaliaram a inclusão dos anticorpos monoclonais aos esquemas quimioterápicos, na tentativa de melhorar as taxas de resposta e como consequência, os índices de ressecção. O estudo de fase II CELIM avaliou 114 pacientes, que foram submetidos a tratamento quimioterápico com esquema FOLFOX6 ou FOLFIRI associado à cetuximabe. Por ter iniciado o recrutamento de pacientes em 2004, a seleção de pacientes baseava-se na expressão do EGFR. Uma análise retrospectiva com os pacientes com gene K-RAS não-mutado (selvagem) observou uma taxa de resposta parcial ou completa de 70% e um aumento na ressecabilidade das lesões de 32 para 60% (FOLPRECHT *et al.*, 2010).

Estudos com bevacizumabe também evidenciaram aumento de resposta objetiva, porém esta resposta parece ser mais efetiva quando o mesmo é combinado com esquemas contendo irinotecano (HURWITZ *et al.*, 2004; FUCHS *et al.*, 2007) ao invés de esquemas contendo oxaliplatina, este último, em um estudo onde foi associado a esquemas XELOX ou FOLFOX, não mostrou qualquer benefício em taxa de resposta.

Deve-se considerar ainda que é necessário um período entre 6 a 8 semanas sem terapia anti-angiogênica para evitar complicações peri-operatórias, como sangramento e atraso na cicatrização operatória. Este período, em alguns casos, pode exigir o aumento do número de ciclos de quimioterapia (sem bevacizumabe) para evitar progressão da doença (SALTZ *et al.*, 2008).

2.1.3 O 5-Fluorouracil

O 5-fluorouracil (5-FU) é uma droga anti-neoplásica ainda amplamente prescrita, que tem desempenhado um importante papel no tratamento do CCR, sendo também utilizada para pacientes com câncer de mama e outros tumores, como os de cabeça e pescoço (Van KUILENBURG *et al.*, 2013).

O 5-FU é um composto aromático heterocíclico orgânico, com uma estrutura semelhante às moléculas de pirimidina de DNA e RNA, sendo análogo da uracila com um átomo de flúor na posição C-5 no lugar do hidrogênio (Figura 1) (RUTMAN *et al.*, 1954).

Devido à sua estrutura, o 5-FU interfere com o metabolismo celular ao nível do DNA e RNA, levando à citotoxicidade e morte celular (GIACHETTI *et al.*, 2000).

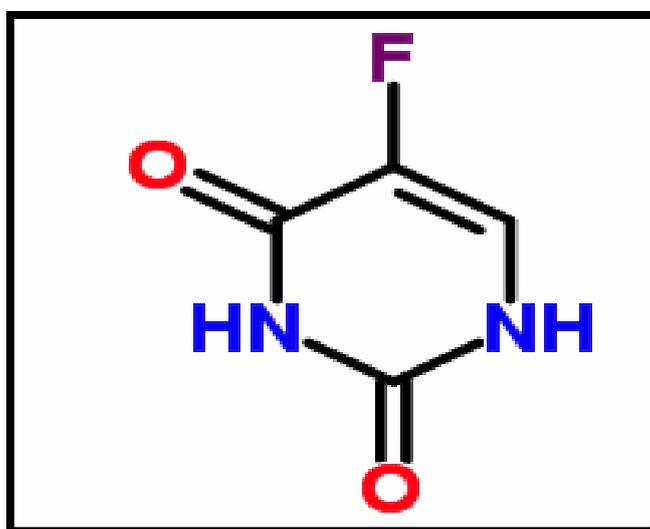


FIGURA 1 - ESTRUTURA MOLECULAR DO 5-FLUOROURACIL

Fonte: Chemspider.com

(Disponível em: <<http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.25936779.html>>)

Atualmente, o 5-FU é utilizado em combinação com outras drogas, sendo que essa combinação melhora a taxa de resposta antineoplásica. Introduzido na década de 50, o 5-FU foi sintetizado com base em uma intenção

especificamente direcionada para a bioquímica tumoral, a partir das observações experimentais de que células neoplásicas utilizavam uracila para síntese de ácido nucléico com mais avidéz do que células normais (HEIDELBERGER *et al.*, 1957; DIASIO, 1998; HARRIS *et al.*, 1989).

O objetivo foi sintetizar um análogo de base pirimídica com propriedades físico-químicas similares às da uracila, resultando em um potente antimetabólico que interferisse na síntese do ácido nucléico e conseqüentemente no crescimento tumoral (HEIDELBERGER *et al.*, 1957).

O mecanismo de ação do 5-FU é complexo e envolve várias vias metabólicas (Figura 2). No ambiente intracelular, o 5-FU é convertido em três principais metabólitos tóxicos ativos: monofosfato de fluorodeoxiuridina (FdUMP), trifosfato de fluorodeoxiuridina (FdUTP) e fluorouridina trifosfato (FUTP). Um dos mecanismos de ativação do 5-FU é a conversão para fluorouridina monofosfato (FUMP), quer diretamente, quer através de orotato fosforibosiltransferase (OPRT) com pirofosfato de fosforibosil (PRPP) como o cofator, quer indiretamente através fluorouridina (FUR) através da ação sequencial de uridina fosforilase (UP) e uridina quinase (UK). A FUMP é então fosforilada para fluorouridina difosfato (FUDP), que pode ser então fosforilada para o trifosfato fluorouridina-metabolito ativo (FUTP), ou convertida em difosfato de fluorodeoxiuridina (FdUDP) pela ribonucleótido redutase (RR) (PINEDO; PETERS; 1989).

Por sua vez, a FdUDP pode ser fosforilada ou desfosforilada para gerar os metabólitos ativos FdUTP e FdUMP, respectivamente. Uma via alternativa de ativação envolve a conversão catalisada timidina fosforilase (TP) de 5-FU

para fluorodeoxiuridina (FUDR), que é então fosforilada pela timidina-quinase (TK) para FdUMP. A conversão di-hidropirimidina desidrogenase (DPD)-mediada de 5-FU para dihidrofluorouracil (DHFU) é o passo limitante da taxa de catabolismo de 5-FU em células normais e neoplásicas, pois até 80% de 5-FU administrado sofre lise pela DPD no fígado (LONGLEY, 2003).

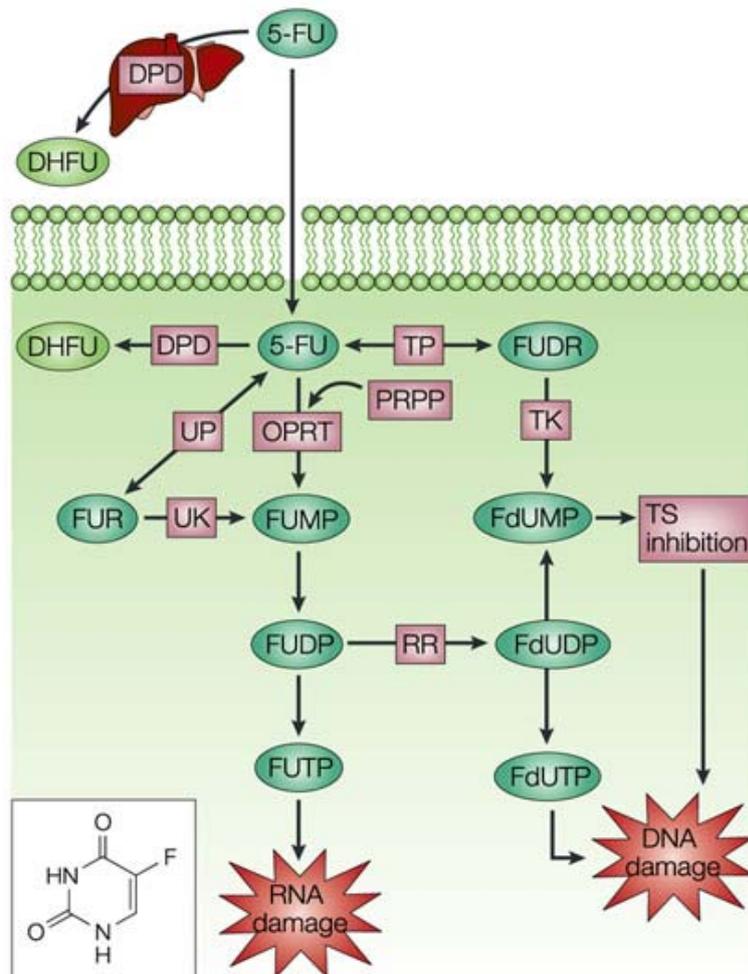


FIGURA 2 - VIAS METABÓLICAS DO 5-FLUOROURACIL
 FONTE: Longley (2003, p. 331)

Essas vias de anabolismo envolvem as mesmas enzimas e substratos da síntese “de novo” da uracila (DIASIO, 1998; HARRIS, 1989). Em resumo, ocorrem três mecanismos diferentes de citotoxicidade: 1) a FUTP substitui a UTP, incorpora-se e causa dano ao RNA; 2) a FdUDP, após a ação da DNA

polimerase, substitui a timidina-5'- trifosfato (dTTP) e incorpora-se ao DNA; e 3) a FdUMP inibe a atividade da timidilato-sintetase (TS) (PINEDO *et al.*, 1988).

Dentre as três vias de ação do 5-FU, ainda não se esclareceu bem qual é a principal, porém a que tem sido melhor estudada é a inibição da atividade da timidilato-sintetase (TS). Como exposto, cerca de 80% do 5-FU é catabolizado no fígado após sua administração em um metabólito ativo, o dihidro-fluoracil (DHFU), por uma enzima chamada di-hidropirimidina-dehidrogenase (DPD). A TS é uma proteína de aproximadamente 36 kDa e que catalisa a metilação redutiva de deoxiuridina-monofosfato (dUMP) para deoxitimidina-monofosfato (dTMP), fornecendo timidina para síntese de DNA (CARRERAS *et al.*, 1995).

2.1.4 Quimioterapia Neoadjuvante e Hepatotoxicidade

Em razão dos dados expostos, a QNA é considerada um dos pilares das atuais estratégias de tratamento multimodal do CCR, aumentando as taxas de ressecabilidade na doença metastática hepática. Em relação à ressecção hepática, os riscos relacionados à cirurgia têm diminuído nos últimos anos, enquanto taxas de mortalidade pós-operatória menor que 5% têm sido relatadas em muitas séries (NORDLINGER *et al.*, 1996; FONG *et al.*, 1999).

A morbidade pós-operatória, incluindo insuficiência hepática transitória, sangramento, abscesso sub-frênico, e fístula biliar ocorre em 20-40% dos pacientes (SCHEELE *et al.*, 1995; FONG *et al.*, 1999; MINAGAWA *et al.*, 2000). Não está completamente estabelecido se a QNA aumenta os riscos cirúrgicos em razão do dano ao parênquima hepático, mas existem evidências

satisfatórias sobre os danos hepáticos de alguns quimioterápicos empregados no tratamento do CCR. O inibidor de topoisomerase-1, irinotecano, causa um aumento da incidência de esteato-hepatite não alcoólica (FERNANDEZ *et al.*, 2005), e o uso da oxaliplatina, um derivado da platina, leva a graus variados de obstrução sinusoidal (KAROUI *et al.*, 2006). Essas alterações patológicas aumentam a vulnerabilidade do parênquima hepático, assim como o risco de sangramento intra-operatório durante a ressecção.

No entanto, estudos mais recentes, com grandes casuísticas, revelaram que, com uma boa seleção dos pacientes e com técnica cirúrgica adequada, a taxa de complicações pós-operatórias independe da utilização de quimioterapia pré-operatória. Wolf *et al.* (2013) avaliaram 506 pacientes submetidos à algum tipo de ressecção hepática por metástase de CCR, no Memorial Sloan-Kettering Cancer Center entre 2003 e 2007. Os únicos fatores que se correlacionaram com a taxa de complicações pós-operatórias foram o tamanho da ressecção hepática (mais de 3 segmentos) e a transfusão pré-operatória. Nesse estudo, a QNA com 5-FU isolado e associado a Irinotecoano ou oxaliplatina não interferiu na taxa de complicações pós-operatórias em comparação com o grupo que não recebeu quimioterapia.

Recentemente, os esquemas de QNA passaram a agregar os anticorpos monoclonais cetuximabe e bevacizumabe. Apesar da toxicidade esperada com a associação dessas novas drogas, os estudos que os analisaram não revelaram aumento da taxa de complicações com a utilização desses protocolos. (GRUENBERGER *et al.*, 2008; FOLPRECHT *et al.*, 2010; JI *et al.*, 2013).

2.2 A REGENERAÇÃO HEPÁTICA

A regeneração hepática é um mecanismo de proteção orgânica contra a perda de tecido hepático funcionante pelos mais variados fatores, seja injúria química, viral, perda traumática, por hepatectomia parcial (HP) ou outros (ASSY *et al.*, 1997; CHANDA *et al.*, 1996).

Apesar de ser largamente utilizado, o termo "regeneração" é considerado incorreto do ponto de vista biológico, 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, sem que ocorra recuperação da estrutura lobular hepática previamente existente (LABREQUE *et al.*, 1994).

O hepatócito é uma célula epitelial, altamente diferenciada, que possui uma taxa de replicação extremamente baixa. Normalmente, apenas um hepatócito entre 20.000 está se dividindo em algum momento durante a vida do ser humano ou animal, sendo que essa divisão pode ocorrer, no máximo, uma ou duas vezes para cada célula (DIEHL *et al.*, 1996; FLADMARK *et al.*, 1997).

Atualmente, sabe-se que a regeneração hepática é um evento que promove um crescimento tecidual altamente organizado. A perda do tecido hepático, induzida por tratamento agudo, cirúrgico ou químico, desencadeia um processo regenerativo tecidual que leva à recuperação da massa hepática perdida de forma regulada e precisa, até o fígado atingir seu peso original, com pequena variação de 5 a 10% (OKANO *et al.*, 1997).

Os hepatócitos são as primeiras células a proliferar, e por isso a maioria

dos estudos está focada nessas células, devido ao fato de constituírem cerca de 90% da massa hepática e 60% do número total de células. No entanto, as outras células (células endoteliais, de Kupffer, de Ito e ductais) também proliferam para substituir a perda do tecido hepático (MICHALOPOULOS *et al.*, 1997).

2.2.1 O Processo Regenerativo

Um dos pontos cruciais no estudo da regeneração hepática é a identificação do possível “gatilho” inicial da resposta regenerativa. Estudos recentes mostraram que quando tecido hepático ou hepatócitos isolados são transportados para tecidos extra-hepáticos, antes da realização da HP, ocorre síntese de DNA no hospedeiro. Do mesmo modo, quando ratos são ligados aos pares através de circulação parabiótica, para a realização de hepatectomia em um membro da dupla, observa-se a regeneração no fígado intacto do outro membro. Estes experimentos evidenciam que os sinais mitogênicos para hepatócitos são sistêmicos, possibilitando a monitoração desse processo (MICHALOPOULOS *et al.*, 1997).

Nos modelos experimentais em ratos, a resposta regenerativa inicia-se pela síntese de DNA, que ocorre 12 - 16 horas após a HP, sendo o pico máximo observado de 24 a 26 horas após a cirurgia. Em seguida, ocorre uma onda de mitoses, cujo pico é verificado aproximadamente 8 horas mais tarde (MICHALOPOULOS *et al.*, 1997).

Durante esses eventos regenerativos, ocorre liberação de fatores de

crescimento como Fator de Crescimento do Hepatócito (HGF), Fator Transformador do Crescimento-alfa (α -TGF), Fator de Crescimento Epidérmico (EGF) e Fator de Crescimento de Fibroblastos (FGF), os quais determinam estímulo mitogênico que atinge outras células hepáticas. Vinte e quatro horas após, inicia-se a síntese de DNA das células não parenquimatosas. O pico mitótico nas células de Kupffer, nas células endoteliais e nas ductais ocorre entre 48, 96 e 48 horas após a HP, respectivamente. Imediatamente após a HP, ocorre ativação de 70 ou mais genes, constituindo-se assim, o primeiro passo na cascata de eventos que direcionam à síntese de DNA (FAUSTO *et al.*, 2006).

Os eventos desencadeados após a HP possibilitam a identificação de dois períodos distintos no processo de regeneração: o período pré-replicativo (de 0 a 14 horas) e o período replicativo (14 a 36 horas). Apesar do limite entre esses períodos não ser totalmente preciso, verifica-se que durante as 12 horas iniciais os hepatócitos saem do estado de repouso ou quiescência - fase G_0 , entrando no ciclo celular - fase G_1 , progredindo para a síntese de DNA. Verifica-se o início dessa fase, 4 a 6 horas após a HP, com elevação precoce da expressão dos proto-oncogenes c-fos e c-myc, 30 a 60 minutos após a cirurgia. Na segunda fase ocorre a síntese de DNA propriamente dita ou fase S. Após a fase S, são necessárias aproximadamente 4 a 6 horas para que a célula entre em divisão, caracterizando a fase G_2 . Após 30 a 60 minutos do início do processo mitótico, obtêm-se dois novos hepatócitos. Durante a regeneração hepática, observa-se o sincronismo do pico de replicação de DNA, indicando que a maioria ou até mesmo todos hepatócitos encontravam-

se na fase de repouso, e não em diferentes pontos do ciclo celular, fortalecendo o conceito que os hepatócitos em condições normais raramente se dividem (RAMALHO *et al.*, 1993)

Os proto-oncogenes são grupos de genes normais, fisiologicamente associados à proliferação celular. São essenciais para o crescimento celular normal, mas na evidência de mutação ou expressão inadequada desses genes, ocorre ativação da formação de neoplasias (MICHALOPOULOS *et al.*, 1997). Os principais proto-oncogenes (c-fos, c-myc, c-ras, c-jun e p53) estão relacionados com ciclo celular, não apenas no processo de regeneração hepática, mas também na proliferação de outros tipos celulares. A expressão dos proto-oncogenes após a HP é extremamente específica, sequencial e regulada, compreendendo uma sucessão de eventos interdependentes e dotados de mediadores que podem alterar a expressão desses proto-oncogenes (RAMALHO *et al.*, 1993).

A eficiência da síntese de DNA após HP está diretamente relacionada com o déficit tecidual. Em ratos adultos com remoção inferior a 30% do parênquima hepático, não se verificou síntese de DNA. Do mesmo modo, em cirurgias com remoção superior a 80% da massa hepática, a regeneração induzida é menos eficiente que a observada na HP, de 68 a 70% (RAMALHO *et al.*, 1993; FAUSTO *et al.*, 2006).

O mais surpreendente no processo regenerativo, além da capacidade proliferativa do hepatócito, é o fato dessas células manterem simultaneamente todas as funções fundamentais para manutenção da homeostase. Análises comparativas da população de RNAm presentes em remanescentes hepáticos

e fígados normais, demonstraram resultados praticamente homólogos, indicando que as alterações na expressão gênica são estritamente de caráter quantitativo (MICHALOPOULOS *et al.*, 1997; FAUSTO *et al.*, 2006).

Vários autores sugerem que diversas substâncias incluindo uma série de hormônios e fatores de crescimento atuam como fatores positivos e negativos em constante equilíbrio, no processo de regeneração hepática, podendo estimular ou inibir a proliferação de hepatócitos (FLADMARK *et al.*, 1997).

Os fatores de crescimento são classificados em três categorias:

- **Agentes mitogênicos completos:** São substâncias capazes de induzir síntese de DNA e mitose em uma população de hepatócito em repouso fase G₀. Incluem o fator de crescimento epidérmico (EGF), o fator transformador do crescimento-alfa (α -TGF), o fator de crescimento de hepatócito (HGF), o fator de crescimento de fibroblastos ácidos (α -FGF) e a substância estimuladora hepática (HSS);
- **Agentes mitogênicos incompletos ou co-mitogênicos:** São substâncias que auxiliam a indução da síntese de DNA, potencializando o sinal estimulatório de substâncias mitogênicas como HGF, EGF e α -FGF e reduzindo o efeito negativo de agentes inibitórios, contribuindo dessa forma para desencadear o processo proliferativo, sem contudo, possuir efeito mitogênico (RAMALHO *et al.*, 1993).
Os principais agentes co-mitogênicos são: norepinefrina,

insulina, glucagon, vasopressina e prostaglandinas, citocinas e alguns nutrientes como a glutamina;

- **Agentes inibidores do crescimento:** São substâncias que controlam o término da proliferação celular. Foram identificadas em culturas de hepatócitos, baseando-se em suas capacidades em inibir a mitogênese induzida pelo EGF. Os principais são: fator transformador do crescimento-beta (β TGF) e a acivicina.

2.2.2 Modelo Experimental de Regeneração Hepática

A regeneração hepática após hepatectomia parcial (HP) em ratos é um dos modelos mais estudados de regeneração de órgãos e tecidos.

O fígado do rato é dividido em quatro principais lobos: lobo caudado (LC), lobo lateral direito (LLD), lobo mediano (LM) e lobo lateral esquerdo (LLE). O LC é dividido em três partes: processo caudado, lobo caudado anterior e lobo caudado posterior. O lobo direito é dividido em lobo direito superior e lobo direito inferior. O lobo mediano é dividido em duas partes: o lobo mediano direito e lobo mediano esquerdo (Figura 3).

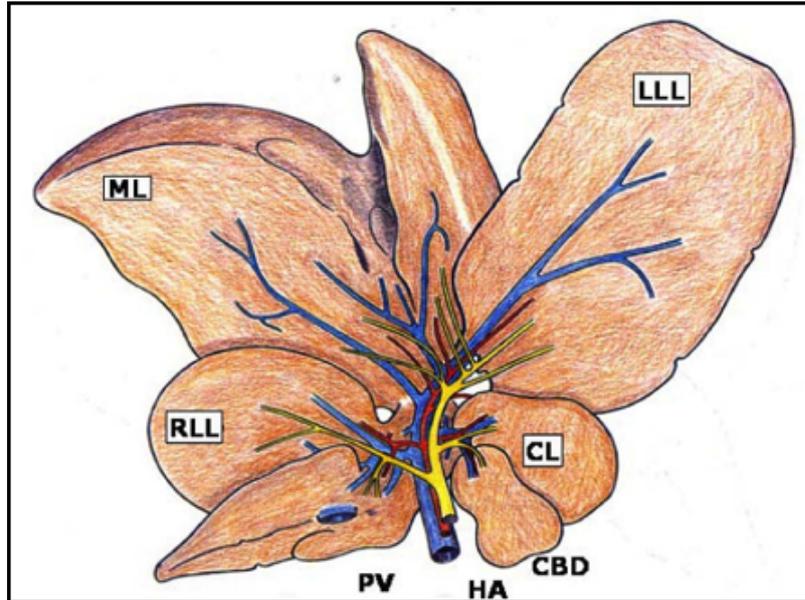


FIGURA 3 - ANATOMIA HEPÁTICA NO RATO

LLL: lobo lateral esquerdo. ML: lobo mediano. RLL: lobo lateral direito.
CL: lobo caudado. PV: veia porta. HA: artéria hepática. CBD: ducto biliar
FONTE: Aller *et. al.* (2012, p. 202)

O primeiro modelo experimental bem sucedido para o estudo da regeneração hepática foi introduzido por Higgins e Anderson (1931)

Esse modelo contemplava a remoção cirúrgica do lobo lateral esquerdo e lobo mediano do fígado de ratos, constituindo aproximadamente 67 a 70% da massa hepática total desses animais (Figura 4).

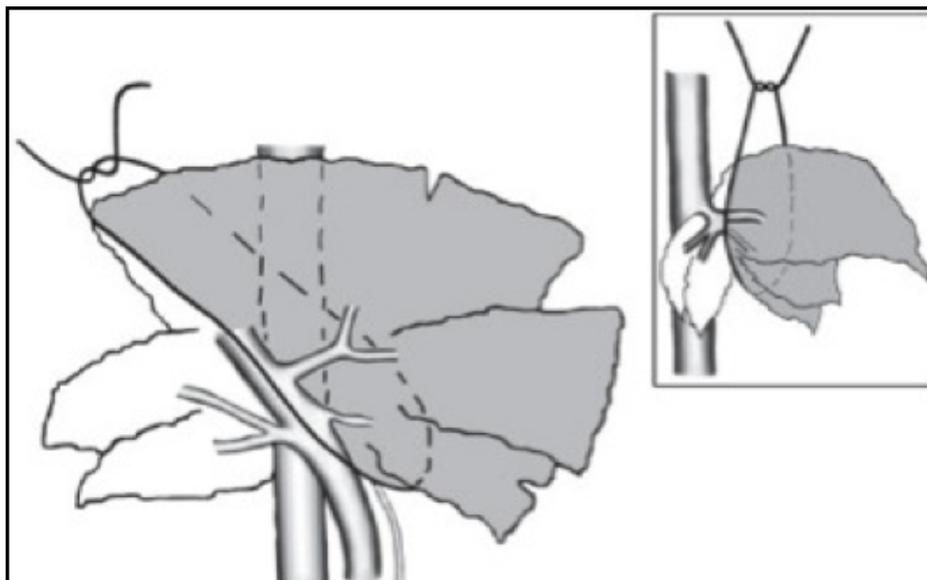


FIGURA 4 - DIAGRAMA ILUSTRATIVO DA HEPATECTOMIA PARCIAL EM RATOS
 FONTE: Tanuri *et.al.* (2007, p. 759)

Tal modelo de regeneração hepática, após ressecção hepática de dois terços em roedores, tornou-se um paradigma útil para o estudo e crescimento de órgãos regenerativos. A popularidade do modelo é baseada em dois aspectos importantes.

Primeiro, a remoção do tecido ressecado não está associada com necrose maciça. Os tecidos hepáticos ressecados são passíveis de remoção "limpa" devido à estrutura multilobular do fígado de rato. Assim, a regeneração dos lobos residuais desde o seu início é mediado por processos relevantes apenas para o tecido hepático e não à inflamação aguda ou necrose. Segundo, porque o estímulo para regeneração após HP tem início imediato, sem interferência de fenômenos inflamatórios. Esses dois atributos do modelo são a principal razão para a sua utilidade, a popularidade reforçada e aceitação ao longo dos anos por muitos investigadores (MICHALOPOULOS *et al.*, 2000).

Embora o modelo de HP possa ser relativamente "limpo", devemos enfatizar que em ambientes de doenças humanas, muitos processos

envolvendo a imunidade inata, a cura de tecidos através da remoção de material necrótico, etc., são de extrema importância e podem ter um papel significativo a desempenhar. O modelo de HP permite a compreensão distinta do processo regenerativo em si, mas para uma melhor compreensão do processo regenerativo no contexto de doença do fígado humano, alguns desses aspectos não regenerativos de resposta à injúria, eventualmente, precisam ser integrados ao modelo.

2.3 EFEITO DO 5-FU NA REGENERAÇÃO HEPÁTICA

O efeito da QNA no potencial de regeneração hepática ainda é desconhecido e parece ser um assunto importante a ser investigado, face ao aumento das prescrições de quimioterápicos em protocolos de pacientes com doença sincrônica (no intervalo entre a ressecção do tumor primário e a doença metastática) e metacrônica (com intenção neoadjuvante). Nos pacientes onde as metástases tornam-se ressecáveis após a quimioterapia é importante saber se a ressecção hepática pode ser realizada o mais breve possível, ou deve ser postergada, permitindo uma resposta tumoral maior e possibilitando uma recuperação melhor do parênquima hepático. Ainda, o conhecimento das alterações histológicas induzidas pela quimioterapia numa avaliação pós-ressecção necessita ser melhor estudada.

Poucos estudos experimentais foram realizados com o intuito de avaliar o efeito do 5-FU no potencial de regeneração hepática. Os primeiros estudos experimentais datam da década de 70. Nagasue *et al.* (1978) demonstraram

que o 5-FU (20 mg/Kg) administrado por via endovenosa imediatamente, 24 e 48 horas após a hepatectomia de dois terços em ratos, causa substancial supressão e retardo na divisão celular, sugerindo importante interferência dessa droga no potencial de regeneração hepática. Kohno e Inokuchi publicaram em 1984, seu trabalho revelando o efeito do 5-FU administrado no período pós-hepatectomia, como proposta adjuvante. Utilizando o modelo experimental de hepatectomia de 70% de Higgins, e estudando o efeito do 5-FU em ratos, os autores concluíram que o 5-FU administrado no pós-operatório e após o pico da síntese de DNA, não interfere com o potencial regenerativo.

Esses e outros estudos publicados até a última década avaliaram o efeito do 5-FU sempre no contexto pós-operatório. O número de trabalhos experimentais que avaliam o efeito do 5-FU administrado no pré-operatório no potencial de regeneração hepática é ainda mais escasso, possivelmente em razão do esquema pré-operatório (neoadjuvante) ser recente na prática clínica em humanos. Um dos primeiros e poucos trabalhos que estudam o efeito de um esquema de quimioterapia administrado pré-hepatectomia é o de Manekeller *et al.* (2009). Utilizando o modelo experimental de hepatectomia de dois terços em ratos, os autores puderam avaliar o efeito da administração 5-FU e oxaliplatina administrados pré-hepatectomia aos moldes de um dos esquemas amplamente utilizadas na prática oncológica atual. Num modelo de mensuração dos efeitos da quimioterapia em fase precoce e tardia, os autores concluíram, através de análises de PCNA e Ki-67, que a quimioterapia pré-operatória retarda a regeneração hepática após a ressecção. Além disso, os

autores concluíram que no modelo utilizado, a QNA parece conferir algum tipo de efeito pré-condicionante isquêmico no subgrupo de animais submetidos à cirurgia com manobra de isquemia (Pringle), aumentando a tolerância hepática às manobras isquêmicas. Um trabalho mais recente, de Rickenbacher *et al.* (2011), apresentou resultados distintos. Usando combinações das drogas 5-FU com irinotecano e 5-FU com oxaliplatina administradas em vários ciclos pela via intraperitoneal em ratos, os autores não observaram qualquer interferência dos esquemas neoadjuvantes no potencial regenerativo hepático por critérios imuno-histoquímicos de PCNA e Ki-67.

3 MATERIAL E MÉTODO

O presente estudo respeitou as normas éticas estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), foi submetido à análise e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR, em 22/07/2010 sob o registro AN. 021.004.09.12.

3.1 MATERIAL

3.1.1 Animais de Experimentação

Foram utilizados ratos *Wistar* (*Rattus norvegicus albinus*, *Rodentia mammalia*) de mesma linhagem, do sexo masculino, com peso variando entre 280 e 350 gramas, provenientes do Biotério do Instituto de Tecnologia do Paraná - TECPAR, com sede em Araucária – PR.

Os animais foram mantidos em número de quatro por gaiola, em ambiente climatizado (22 ± 1 grau Celsius) e com ciclo automatizado de luminosidade, com ciclos de 12 horas claro-escuro (dispositivo Cronomat® – Mallory do Brasil). Durante todo o experimento, receberam água e ração (Nuvilab CR1®) *ad libitum*.

3.1.2 Drogas e Soluções

O fármaco quimioterápico utilizado na pesquisa foi o 5-Fluorouracil (Faldfluor® - laboratório Libbs), na concentração de 50 mg/ml. No dia da

administração preparou-se diluição de 1 ml da solução em 4 ml de soro fisiológico a 0,9 % obtendo-se solução de concentração final de 10 mg/ml. Para os subgrupos-controle foi utilizado soro fisiológico (marca Equiplex).

Para a limpeza da cauda dos animais foi utilizado solução de álcool 70% (marca LBS) e para diafanização da cauda foi utilizado tolueno em sua forma pura, a 100% (Laboratório Farmanilquima).

3.1.3 Materiais de Anestesia

A sedação e anestesia foram realizadas por administração inalatória do anestésico Isoflurano (Isorine®– Laboratório Cristália). Para a indução foi utilizado um reservatório plástico de 1500 cm³ ligado a um vaporizador marca Takaoka e para a manutenção anestésica utilizou-se uma máscara plástica confeccionada a partir de uma seringa de 20 ml e conectada ao vaporizador (Figura 5).

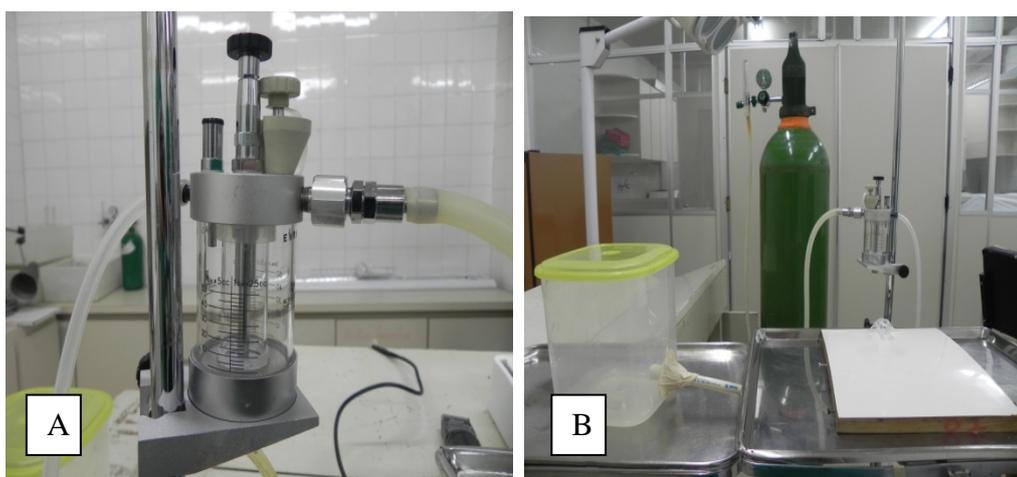


FIGURA 5 - VAPORIZADOR DO ANESTÉSICO INALATÓRIO (A) E SISTEMA DE ANESTESIA INALATÓRIA CONTÍNUA (B)
FONTE: O autor (2013)

3.1.4 Material Cirúrgico

Para a realização dos procedimentos cirúrgicos, utilizou-se tesoura de Metzemaum curva de 12 cm, tesoura reta de 12 cm, pinça anatômica de 10 cm, pinça Adson de 10 cm, pinças Kelly de 12 cm e porta agulhas de 12 cm, todos da marca Edlo. Os fios cirúrgicos utilizados foram: Mononylon nº 3.0 (marca Ethicon), algodão nº 2.0 (marca Ethicon) . Para a antissepsia foi utilizada solução de PVPI a 10% (marca Riodeine). Os espécimes coletados eram armazenados em frascos plásticos com solução de formalina a 10% (marca Rioquímica).

3.1.5 Outros Materiais

O sacrifício dos animais foi realizado em campânula de vidro específica para esse fim. Para a pesagem dos animais utilizou-se balança Marte® modelo AM 5500, calibrada pelos padrões do INMETRO (Figura 6). A punção venosa foi realizada com cateter tipo abocath 24 Gauge (marca BD). A infusão foi realizada com seringa de 1 ml (marca BD).



FIGURA 6 - BALANÇA DE PRECISÃO UTILIZADA PARA O EXPERIMENTO
FONTE: O autor (2013)

3.2 MÉTODO

3.2.1 Grupos de Estudo

Foram utilizados 40 animais divididos aleatoriamente em dois grupos:

Grupo Fluorouracil (GF): 20 animais submetidos à injeção única endovenosa do fármaco 5-FU, na dose de 20 mg/Kg de peso, 24 horas antes da hepatectomia à 70%. Após a ressecção hepática, os animais foram subdivididos em dois subgrupos iguais de 10 animais, de acordo com o dia do sacrifício: 24 horas após a hepatectomia (GF_{24hs}) ou 7 dias após hepatectomia (GF_{7d}).

Grupo Controle (GC): 20 animais submetidos à injeção única endovenosa de soro fisiológico a 0,9% em volumes equivalentes ao cálculo do grupo de estudo, 24 horas antes da hepatectomia a 70%. Após a ressecção hepática, os animais foram subdivididos em dois subgrupos iguais de 10 animais, de acordo com o dia do sacrifício: 24 horas após a hepatectomia (GC_{24hs}) ou 7 dias após hepatectomia (GC_{7d}).

3.2.2 Anestesia Inalatória

Os animais foram submetidos à anestesia inalatória com isoflurano (Isoforine® - Laboratório Cristália) administrado por um vaporizador Takaoka® (Figura 5) com fluxo de vaporização por oxigênio a 2 litros/minuto. Para a indução anestésica, os animais foram colocados no reservatório plástico conectado ao dispositivo vaporizador, com concentração de isoflurano a

3 %. Após a observação da perda de consciência e relaxamento muscular, o animal foi retirado do reservatório de indução e mantido em anestesia inalatória contínua, por máscara plástica adaptada à sua cabeça e conectada ao vaporizador, com concentração de isoflurano de 1,5% mantendo-se fluxo de oxigênio de 2 litros/minuto (Figura 7).



FIGURA 7 - ANIMAL EM ANESTESIA CONTÍNUA INALATÓRIA POR MÁSCARA PLÁSTICA ADAPTADA À CABEÇA, EM POSIÇÃO PARA OS PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS
FONTE: O autor (2013)

3.2.3 Técnica de Administração Endovenosa do Quimioterápico

Após jejum de 2 horas, o animal foi submetido à indução anestésica no reservatório plástico, pesado em balança de precisão, sendo calculado o volume necessário de solução a 10 mg/ml para atingir-se a dose de 20mg/Kg de peso e identificado na cauda. Sob anestesia inalatória contínua, o mesmo foi submetido à tricotomia da base da cauda com tricótomo elétrico. A seguir, foi realizada a limpeza da cauda com gaze embebida em álcool e realizada a diafanização, com aplicação de tolueno na área a ser puncionada, para melhor exposição da veia (Figuras 8A, 8B, 8C). Um garrote confeccionado com um

pedaço de equipo plástico e um fio de sutura de algodão nº 0 e tensionado por pinça de Kelly foi aplicado à base da cauda.

O passo seguinte consistiu na identificação da veia caudal de maior calibre, sendo a mesma puncionada com cateter tipo abocath 24 Gauge com introdução endovenosa do mesmo por cerca de dois cm, após a confirmação da posição endovenosa por visualização de refluxo sanguíneo no reservatório do abocath. A agulha foi retirada e uma seringa de 1 ml com o volume adequado de solução a ser injetada foi conectada no abocath. O garrote foi solto e a solução injetada lentamente, certificando-se de que a administração estava ocorrendo dentro da luz do vaso (Figuras 8D a 8I). Após a injeção, o abocath foi retirado sendo realizada a manobra de compressão do ponto de injeção por 10 segundos.

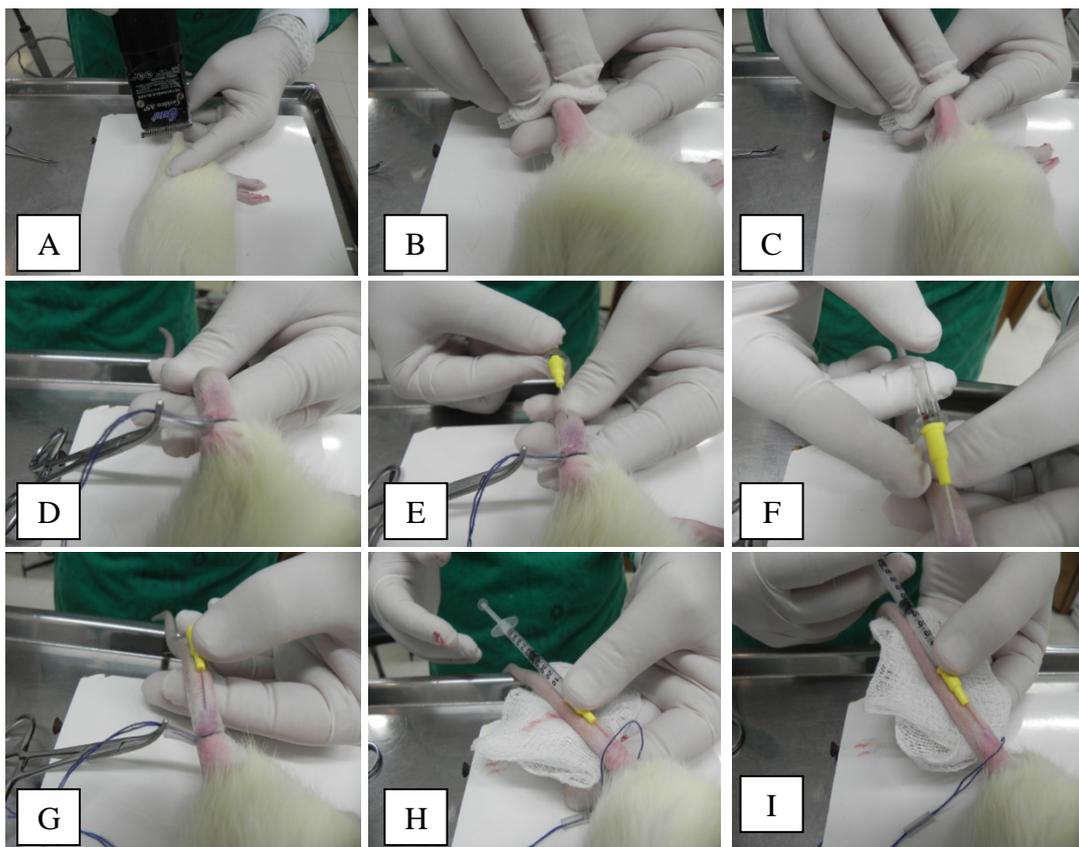


FIGURA 8 - TÉCNICA DE INJEÇÃO ENDOVENOSA EM VEIA DA CAUDA
 A: tricotomia. B: limpeza da cauda com álcool. C: diafanização da cauda com tolueno. D: garroteamento da base da cauda. E: punção com abocath 24G. F: constatação da punção venosa por critério de refluxo sanguíneo no reservatório do abocath. G: Introdução do abocath e retirada da agulha. H: conexão da seringa com a solução a ser injetada. I: infusão da solução.

Fonte: O autor (2013)

3.2.4 Hepatectomia Parcial

Todos os animais foram operados pelo mesmo cirurgião (o pesquisador), que contou com a ajuda de um auxiliar para os procedimentos de monitoramento anestésico, e a supervisão do orientador da pesquisa.

Após período de 6 horas de jejum, os animais foram submetidos à indução anestésica no reservatório plástico e pesados. Realizou-se então tricotomia da parede abdominal e fixação do animal à mesa cirúrgica. O

dispositivo de inalação foi adaptado à cabeça do animal e o procedimento anestésico foi monitorado. Realizou-se antissepsia da parede abdominal com PVPI (marca Riodeine). A seguir uma laparotomia mediana foi realizada com tesoura Metzembraum em uma extensão de 3cm. A exposição da cavidade peritoneal superior foi obtida com a utilização de afastadores confeccionados com clips metálicos (Figuras 9A a 9C).

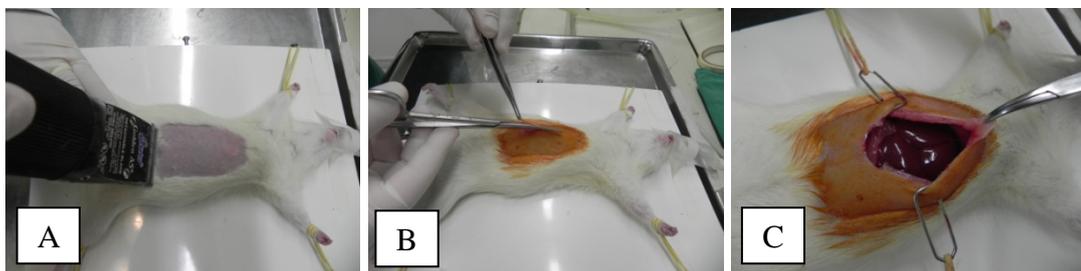


FIGURA 9 - LAPAROTOMIA NO RATO

A: tricotomia da parede abdominal. B: laparotomia mediana. C: instalação de afastadores metálicos.

FONTE: O autor (2013)

Para realização da hepatectomia, o processo xifóide foi pinçado e mantido sob tração. O cirurgião realizou então a secção dos ligamentos falciforme e triangular esquerdo. A hepatectomia foi realizada por uma ligadura pedicular hepática única com fio de algodão 2.0, sendo ressecados o lobo lateral esquerdo e o mediano. O espécime coletado foi pesado e desprezado. A seguir, a parede abdominal foi suturada com fio de nylon 3.0 e o animal foi então devolvido ao seu ambiente de contenção (Figuras 10A a 10I).

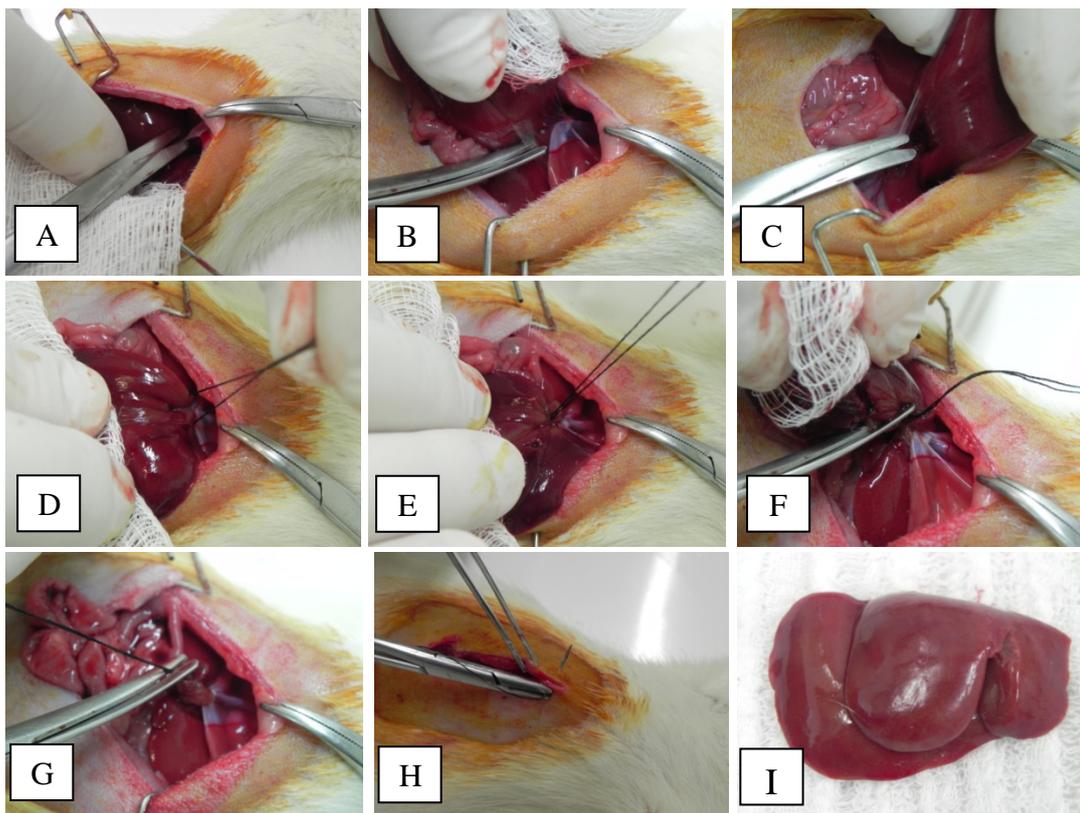


FIGURA 10 - A HEPATECTOMIA PARCIAL

A, B e C: disseção hepática e secção ligamentar. D: posicionamento do fio de ligadura. E: ligadura do pedículo hepático. F: secção do parênquima. G: tempo final da hepatectomia. H: sutura da parede abdominal. I: espécime ressecado.

FONTE: O autor(2013)

3.2.5 Sacrifício e Coleta do Fígado Remanescente (regenerado ou não)

Dependendo do subgrupo de estudo, o sacrifício e coleta do fígado remanescente foram realizados no primeiro ou no sétimo dia após a HP. Os animais foram sacrificados em câmpula de vidro por dose letal de éter inalatório. Após o óbito, o animal foi pesado e fixado na mesa cirúrgica. Uma relaparotomia foi realizada e o fígado remanescente foi inteiramente ressecado após secção das veias hepáticas, veia cava e hilo hepático. O fígado ressecado foi então pesado e submetido à coleta de amostra para estudo histopatológico e imuno-histoquímico. Padronizou-se a coleta de fragmento de

1 x 1 cm do segmento superior do lobo lateral direito. A conservação do espécime coletado foi feita em formalina 10% e amostras foram enviadas ao laboratório de patologia para fixação em parafina, em até dois dias após a coleta, para preparo dos blocos de parafina (Figura 11).

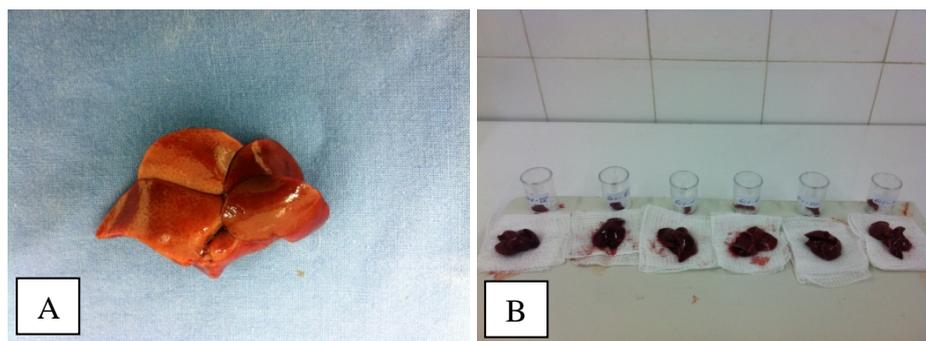


FIGURA 11 - COLETA DO FÍGADO REGENERADO
A: Espécime cirúrgico representado pelo fígado remanescente (GC 7d)
B: coleta das amostras do fígado
FONTE: O autor (2013)

3.2.6 Avaliação da Regeneração Hepática pela Fórmula de Kwon

Para avaliação da regeneração pelo critério de massa hepática, utilizou-se a fórmula matemática proposta por Kwon (1990).

A fórmula fornece o percentual de regeneração baseado nos pesos corporal e do fígado dos animais no momento da HP e do sacrifício (Figura 12).

R%= percentual de regeneração

$$\mathbf{R\% = (D/E). 100}$$

E = representa o peso estimado do fígado antes da hepatectomia, por 100 g de massa do animal. É calculado pela Fórmula: **$E = R.100 / 0,7. PH$**

R= peso do fígado ressecado no momento da hepatectomia

PH= peso do rato na hepatectomia

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

S = peso do fígado no momento do sacrifício

PS = peso do rato no momento do sacrifício

FIGURA 12 - FÓRMULA DE KWON

FONTE: Kwon et al. (1990 p. 296)

3.2.7 Avaliação da Regeneração Hepática pelo Índice Mitótico

Para avaliação da regeneração hepática utilizando-se o índice mitótico, as amostras do fígado foram enviadas ao laboratório de patologia. Após desidratação, diafanização e emblocamento dos tecidos em parafina, foram realizados microtomias de 4 micrômetros (μm) e confecção de lâminas com coloração por Hematoxilina-Eosina (HE).

As lâminas confeccionadas foram analisadas em microscópio óptico, com captura das imagens por câmera fotográfica, as quais foram transmitidas e digitalizadas. Analisaram-se 10 campos de grande aumento (400 x) de maneira aleatória, sendo as figuras de mitose registradas e fotografadas (Figura 13).

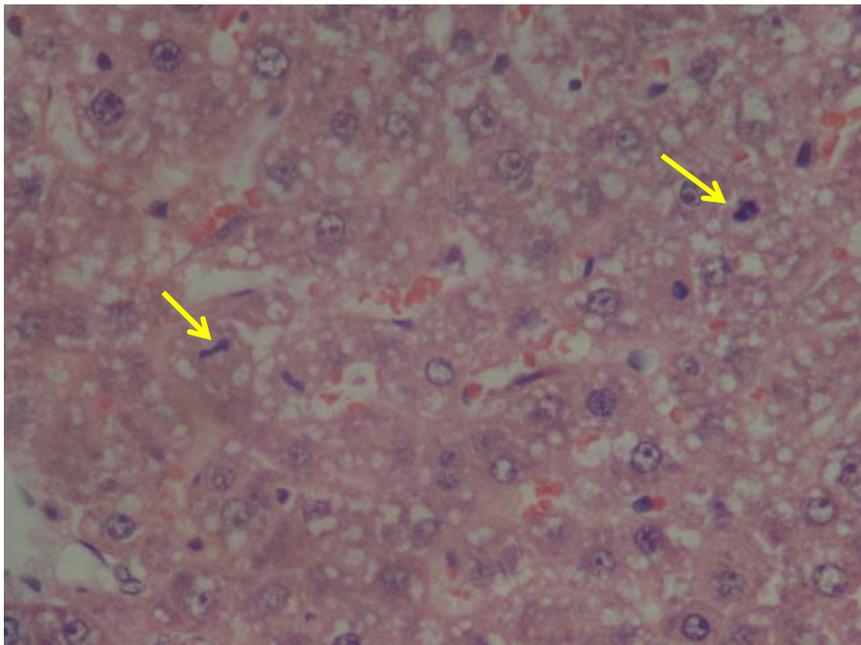


FIGURA 13 - FOTOMICROGRAFIA (HE X 400) REVELANDO FIGURAS DE MITOSES (SETAS)
FONTE: O autor (2013)

3.2.8 Avaliação da Regeneração Hepática por Imuno-Histoquímica

Para avaliação da regeneração por reação de imuno-histoquímica, foram utilizados os marcadores de proliferação celular PCNA e Ki-67. O antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) é uma proteína nuclear que atua como fator da enzima DNA polimerase delta, sendo, portanto, essencial para a síntese de DNA e conseqüentemente para a replicação celular. O antígeno Ki-67 (ou MKI67) é uma proteína associada à proliferação celular, relacionada com a transcrição do RNA ribossomal, identificada no núcleo das células em mitose, durante todas as fases do ciclo celular.

O estudo imuno-histoquímico foi realizado no laboratório Byori® – Curitiba-PR. Foram preparadas lâminas silanizadas (3-aminopropiltrietoxi-silane; Sigma Chemical®, Co; EUA), com cortes teciduais de 4 mm. As peças foram desparafinadas em estufa a 60°C, e hidratados em passagens de xilol,

álcool absoluto, álcool a 70% e água destilada. O método do complexo avidina-biotina peroxidase-antiperoxidase foi utilizado no estudo das amostras.

As peças foram submetidas à recuperação antigênica com imersão dos fragmentos em tampão citrato 0,001M, pH 6.0. Os fragmentos foram aquecidos em forno de microondas a 98° C por 5 minutos (para o estudo do PCNA) ou por 30 minutos (para o estudo do antígeno Ki-67), seguido de resfriamento à temperatura ambiente por 20 minutos e imersão em PBS. Anticorpos primários anti-PCNA (Monoclonal, código M0879, Dako, Carpinteria, USA) e anti-Ki-67 (Monoclonal, Código NCL-Ki-67-MM1, Clone MM1, Novocastra, USA) foram aplicados *overnight* à temperatura de 2° C a 8° C. Após banho em tampão fosfato, seguiu-se à aplicação de anticorpo biotilado por 30 minutos, à temperatura ambiente.

Após novo banho em tampão fosfato, seguiu-se à aplicação do complexo estreptavidina-peroxidase por 30 minutos, ainda à temperatura ambiente. Foi, então, realizado mais um banho em tampão fosfato e revelação da reação imune com diaminobenzidina, seguido de contra-coloração com Hematoxilina. Na sequência, os cortes foram desidratados e montados com bálsamo e lamínulas de vidros. Os cortes foram analisados e fotomicrografias realizadas, utilizando-se o sistema Nikon® Microphot (Tóquio, Japão). A positividade da coloração imuno-histoquímica foi identificada nas áreas de pigmentação acastanhada. Controles positivos e negativos foram utilizados. Procedeu-se a análise randômica individual das lâminas, sem a identificação dos grupos e subgrupos pertencentes. Foram avaliados aleatoriamente, 100 hepatócitos de cada lâmina sendo considerados positivos os hepatócitos com

coloração acastanhada moderada ou forte (Figuras 14 e 15).

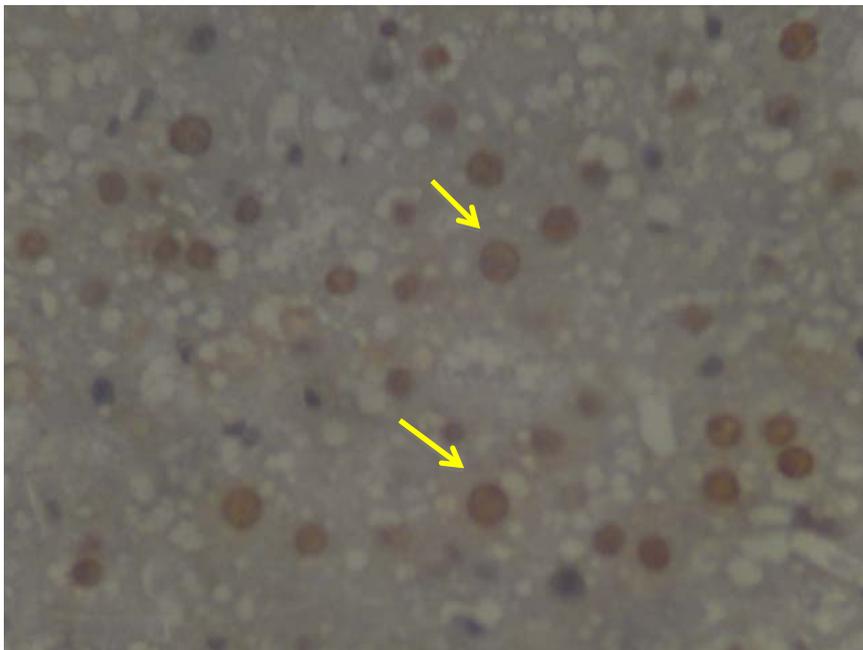


FIGURA 14 - FOTOMICROGRAFIA (X 400) REVELANDO POSITIVIDADE NUCLEAR PARA PCNA (SETAS)
FONTE: O autor (2013)

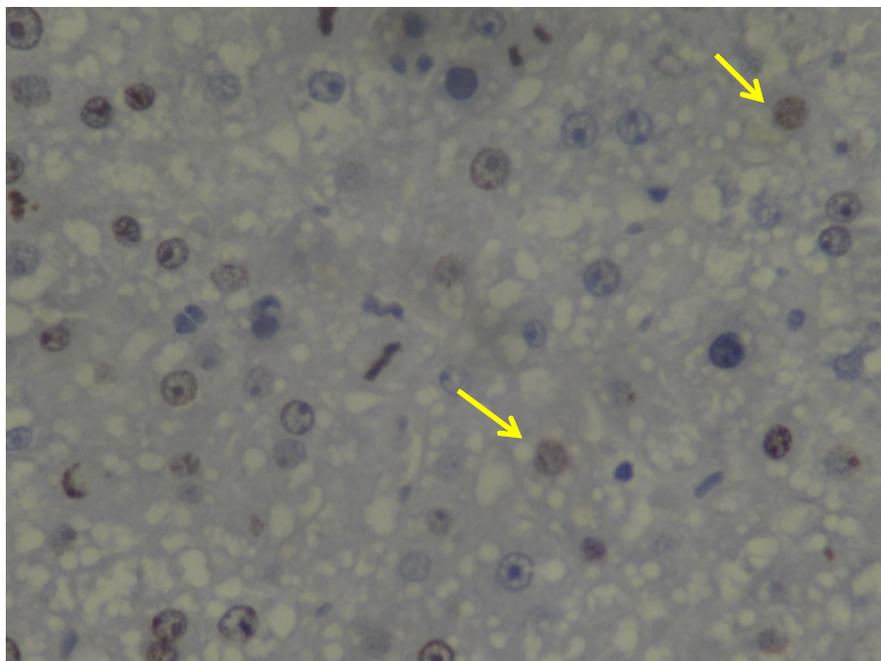


FIGURA 15 - FOTOMICROGRAFIA (X 400) REVELANDO POSITIVIDADE DE COLORAÇÃO PARA KI-67 (SETAS)
FONTE: O autor (2013)

3.2.9 Análise Estatística

Observou-se o pré-requisito da distribuição normal (Gaussiana) para a escolha do teste estatístico. Na análise não-paramétrica, foi utilizado o teste de *Mann-Whitney* para as comparações do índice mitótico nas análises intragrupos e intergrupos para GF e GC nos períodos de 24 horas e 7 dias, exceto para GF_{7d} e GC_{7d}, pois não foi possível a aplicação do teste, devido às características dos dados; teste Ki-67 na análise intragrupo GF_{24hs} *versus* GF_{7d} e na análise intergrupos GF_{7d} *versus* GC_{7d}; teste PCNA na análise intragrupo GC_{24hs} *versus* GC_{7d} e na análise intergrupos GC e GF nos períodos de 24 horas e 7 dias. Para os demais resultados, foi utilizada a análise paramétrica com o teste *t de Student*. Em todos os testes estatísticos o nível de significância adotado foi $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 PESO DOS ANIMAIS

Comparando-se o peso dos animais no dia da administração da solução endovenosa (peso inicial) com o peso dos animais no dia do sacrifício, houve perda ponderal significativa nos subgrupos GC_{24hs} e GF_{24hs}. Não houve variação ponderal significativa nos subgrupos GC_{7d} e GF_{7d} (Gráfico 1).

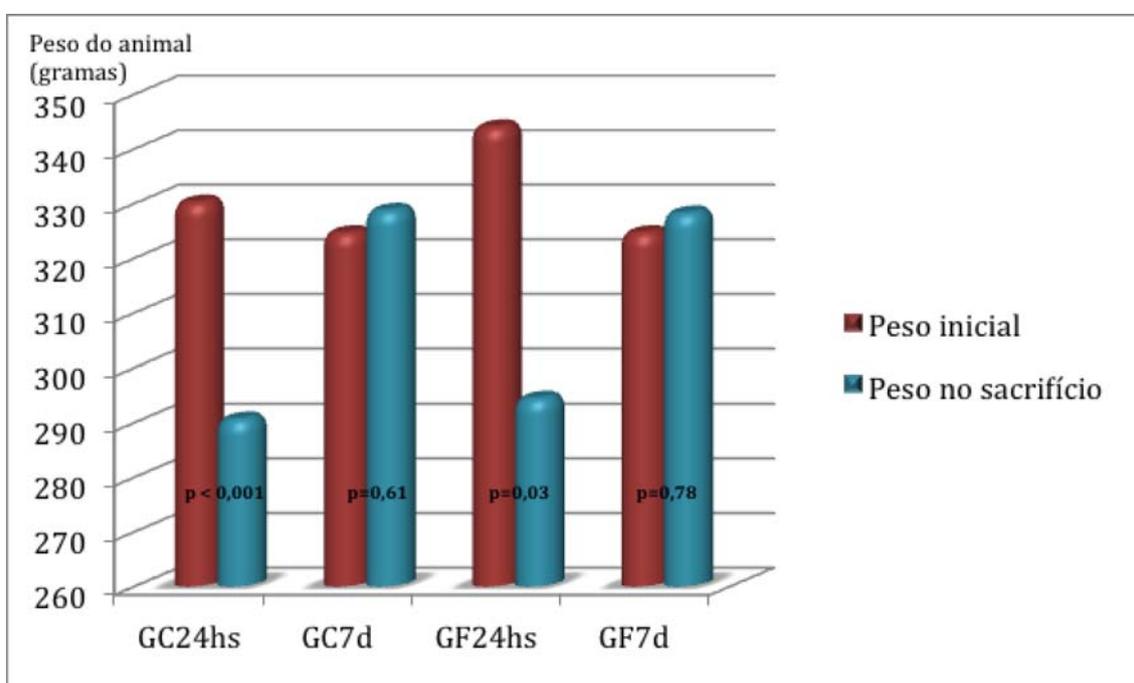


GRÁFICO 1 - MÉDIA DOS PESOS INICIAL E NO ÓBITO DE CADA SUBGRUPO
 Comparação estatística entre os subgrupos (p)
 FONTE: O autor (2013)

Na comparação dos pesos dos animais entre os grupos controle e 5-FU, no dia da administração da droga (peso inicial), no dia da hepatectomia e no dia do sacrifício, não houve variação estatisticamente significativa em nenhuma das comparações (Tabela 1).

TABELA 1 - COMPARAÇÃO DOS PESOS ENTRE OS GRUPOS CONTROLE E ESTUDO (5-FU) NO DIA DA ADMINISTRAÇÃO DA DROGA (INICIAL), NO DIA DA HEPATECTOMIA E NO DIA DO SACRIFÍCIO, NOS PERÍODOS DE 24 HORAS DIA E SETE DIAS: TESTE t

SUBGRUPOS	INICIAL (g)			HEPATECTOMIA (g)			SACRIFÍCIO (g)		
	Média	dp	p	Média	Dp	p	Média	dp	P
GC _{24hs}	330,2 ±	13,6	0,17	314,6 ±	9,6	0,68	290,6 ±	11,4	0,57
GF _{24hs}	320,6 ±	16,6		316,7 ±	15,3		294,4 ±	17,2	
GC _{7d}	324,6 ±	11,4	0,46	328,7 ±	13,3	0,72	328,2 ±	18,5	0,88
GF _{7d}	329 ±	14,7		331,1 ±	13,3		327,1 ±	15	

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

FONTE: O autor (2013)

4.2 PESO DO FÍGADO

Para a análise da interferência no peso do fígado, foram realizadas comparações intergrupos (GF versus GC) e intragrupos (24 horas versus 7 dias). Na comparação intergrupos, no momento da hepatectomia houve diferença estatística nos pesos dos fígados apenas na comparação dos subgrupos de 24 horas (GF_{24hs} versus GC_{24hs}), com pequena perda ponderal no subgrupo GC_{24hs}. Na avaliação intragrupos houve diferença estatística na comparação entre os subgrupos controle (GC_{24hs} versus GC_{7d}), com menor peso no grupo GC_{24hs}. Não houve diferença estatística na comparação entre os subgrupos GF_{24hs} versus GF_{7d}, e entre os subgrupos GF_{7d} versus GC_{7d} (Tabela 2).

TABELA 2 - ANÁLISE ESTATÍSTICA DAS MÉDIAS DO PESO DO FÍGADO (g) NA HEPATECTOMIA NA COMPARAÇÃO INTERGRUPOS E INTRAGRUPOS: TESTE t

SUBGRUPOS	PESO DO FÍGADO (g) NA HEPATECTOMIA				TESTE t
	min - max	média	±	Dp	P
GF _{24hs}	7,8 – 10,3	9,04	±	0,77	0,05
GF _{7d}	8,5 – 10,1	9,64	±	0,51	
GC _{24hs}	7,3 – 9,5	8,32	±	0,64	0,01
GC _{7d}	7,8 – 10,2	9,26	±	0,86	
GF _{24hs}	7,8 – 10,3	9,04	±	0,77	0,03
GC _{24hs}	7,3 – 9,5	8,32	±	0,64	
GF _{7d}	8,5 – 10,1	9,64	±	0,51	0,24
GC _{7d}	7,8 – 10,2	9,26	±	0,86	

Nota: min-max - valores mínimo e máximo; dp – desvio padrão; p – valor p

Fonte: O autor (2013)

No momento do sacrifício dos animais, comparando-se o peso do fígado regenerado/ressecado entre os grupos controle e 5-FU houve perda ponderal significativa dos subgrupos 5-FU para ambos os períodos de 24 horas e 7 dias. Na comparação intragrupos GC (24 horas *versus* 7 dias) e GF (24 horas *versus* 7 dias), os subgrupos de 24 horas apresentaram peso menor em comparação aos subgrupos de 7 dias. Essas diferenças também foram estatisticamente significativas (Tabela 3).

TABELA 3 - ANÁLISE ESTATÍSTICA DAS MÉDIAS DO PESO DO FÍGADO (G) NO DIA DO SACRIFÍCIO. COMPARAÇÃO INTERGRUPOS E INTRAGRUPOS: TESTE t

SUBGRUPOS	PESO DO FÍGADO (g) NO DIA DO SACRIFÍCIO				TESTE t
	min - max	Média	±	Dp	P
GF _{24hs}	6,3 – 8,2	7,29	±	0,62	< 0,001
GF _{7d}	11,2 – 14,0	12,62	±	0,98	
GC _{24hs}	7,5 – 9,5	8,65	±	0,65	< 0,001
GC _{7d}	12,5 – 15,3	13,92	±	0,91	
GF _{24hs}	6,3 – 8,2	7,29	±	0,62	< 0,001
GC _{24hs}	7,5 – 9,5	8,65	±	0,65	
GF _{7d}	11,2 – 14,0	12,62	±	0,98	0,006
GC _{7d}	12,5 – 15,3	13,92	±	0,91	

Nota: min-max - valores mínimo e máximo; dp – desvio padrão; p – valor p

FONTE: O autor (2013)

Na análise da relação peso do fígado regenerado / peso corporal do animal no dia do sacrifício, houve diferença estatística na comparação entre os subgrupos GF_{24hs} *versus* GC_{24hs}, com menor relação numérica no subgrupo GC_{24hs}. Não houve diferença estatística na comparação entre os subgrupos GF_{7d} *versus* GC_{7d} (Tabela 4).

TABELA 4 - ANÁLISE ESTATÍSTICA DAS MÉDIAS DA RELAÇÃO DO PESO DO FÍGADO REGENERADO(g) SOBRE O PESO CORPORAL (g). COMPARAÇÃO INTERGRUPOS: TESTE t

RELAÇÃO DO PESO DO FÍGADO REGENERADO (g) SOBRE O PESO CORPORAL (g)					
	min – max	Média	±	Dp	P
GF _{24hs}	0,0266 – 0,0315	0,0285	±	0,0016	0,009
GC _{24hs}	0,0241 – 0,0288	0,0265	±	0,0016	
GF _{7d}	0,0270 – 0,0308	0,0291	±	0,0014	0,16
GC _{7d}	0,0253 – 0,0304	0,0281	±	0,0017	

Nota: min–max - valores mínimo e máximo; dp – desvio padrão; p – valor p
 FONTE: O autor (2013)

4.3 AVALIAÇÃO DA REGENERAÇÃO HEPÁTICA PELA FÓRMULA DE KWON

Na avaliação da regeneração hepática pela Fórmula de Kwon, a análise estatística revelou menor percentual de regeneração nos subgrupos GF em comparação aos subgrupos GC, tanto no período de 24 horas quanto 7 dias. Na comparação intragrupos, houve crescimento significativo do remanescente hepático no período de 7 dias em comparação ao período de 24 horas, tanto no subgrupo 5-FU quanto no subgrupo controle. (Gráfico 2).

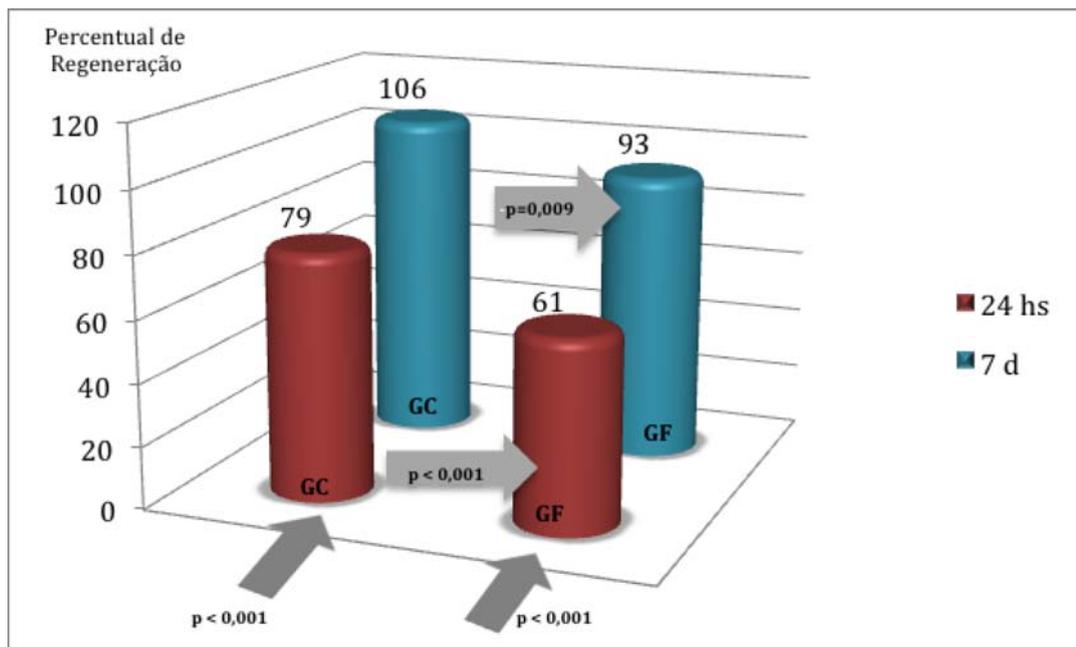


GRÁFICO 2 - AVALIAÇÃO DA PERCENTAGEM DA REGENERAÇÃO HEPÁTICA PELA FÓRMULA DE KWON

Comparação estatística entre os grupos controle (GC) e 5-FU (GF) nos períodos de 24 horas e 7 dias. Em vermelho os grupos de 24 horas e em verde os grupos de 7 dias.

Comparação estatística entre os grupos (p).

FONTE: O autor (2013)

4.4 AVALIAÇÃO DA REGENERAÇÃO HEPÁTICA PELO ÍNDICE MITÓTICO

Na análise estatística da regeneração hepática pelo Índice Mitótico, não houve diferença significativa na comparação intergrupos GF_{24hs} versus GC_{24hs} . A análise estatística entre os subgrupos GF_{7d} versus GC_{7d} não foi realizada, pois o número de mitoses foi igual a zero para ambos os subgrupos. Houve diferença estatisticamente significativa na comparação intragrupos GF_{24hs} versus GF_{7d} e GC_{24hs} versus GC_{7d} (Gráfico 3).

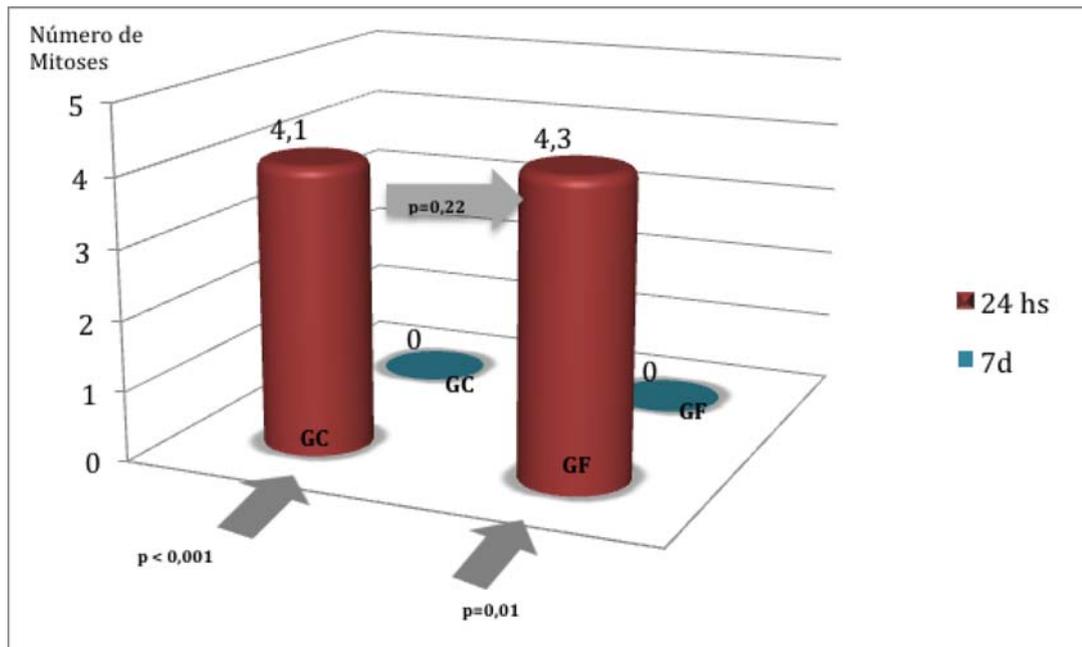


GRÁFICO 3 - AVALIAÇÃO DA REGENERAÇÃO HEPÁTICA PELO ÍNDICE MITÓTICO
 Comparação estatística entre os grupos controle (GC) e 5-fu (GF) nos períodos de 24 horas e 7 dias. Em vermelho os grupos de 24 horas e em verde os grupos de 7 dias.
 Comparação estatística entre os grupos (p).
 FONTE: O autor (2013)

4.5 AVALIAÇÃO DA REGENERAÇÃO HEPÁTICA PELO PCNA

Na avaliação da proliferação celular pelo PCNA houve diferença estatística na comparação intergrupos GF *versus* GC para ambos os períodos de 24 horas e 7 dias, com menor percentual de células coradas nos subgrupos GF. Houve também diferença estatística na comparação intragrupos GC_{24hs} *versus* GC_{7d}, com maior percentual de células coradas no subgrupo GC_{7d}. A comparação GF_{24hs} *versus* GF_{7d} não resultou em diferença significativa (Gráfico 4).

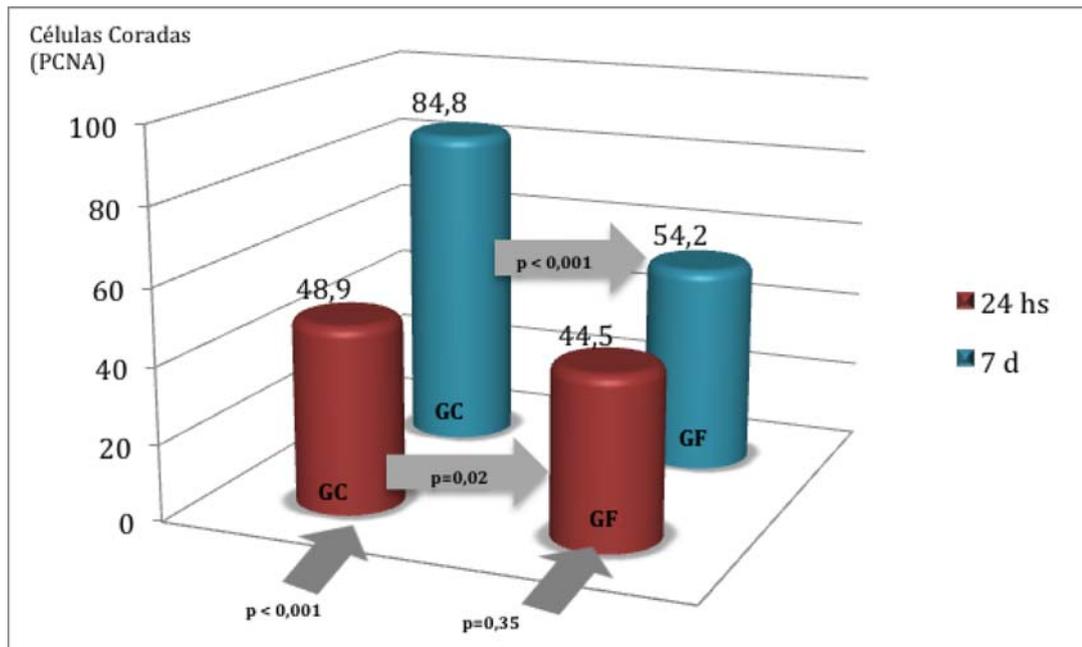


GRÁFICO 4 - AVALIAÇÃO DA REGENERAÇÃO HEPÁTICA PELO PCNA
 Comparação estatística entre os grupos controle (GC) e 5-fu (GF) nos períodos de 24 horas e 7 dias. Em vermelho os grupos de 24 horas e em verde os grupos de 7 dias.
 Comparação estatística entre os grupos (p).
 FONTE: O autor (2013)

4.6 AVALIAÇÃO DA REGENERAÇÃO HEPÁTICA PELO KI-67

Na avaliação da proliferação celular pelo antígeno Ki-67, a comparação intergrupos GF_{24hs} versus GC_{24hs} não resultou em diferença estatística. No entanto, houve diferença estatística na comparação GF_{7d} versus GC_{7d} , com maior percentual de células coradas no subgrupo GC_{7d} . Observou-se maior percentual de células coradas nos subgrupos 24 horas em relação aos subgrupos 7 dias, resultando em diferenças significativas nas comparações intragrupos (GC_{24hs} versus GC_{7d} e GF_{24hs} versus GF_{7d}) (Gráfico 5).

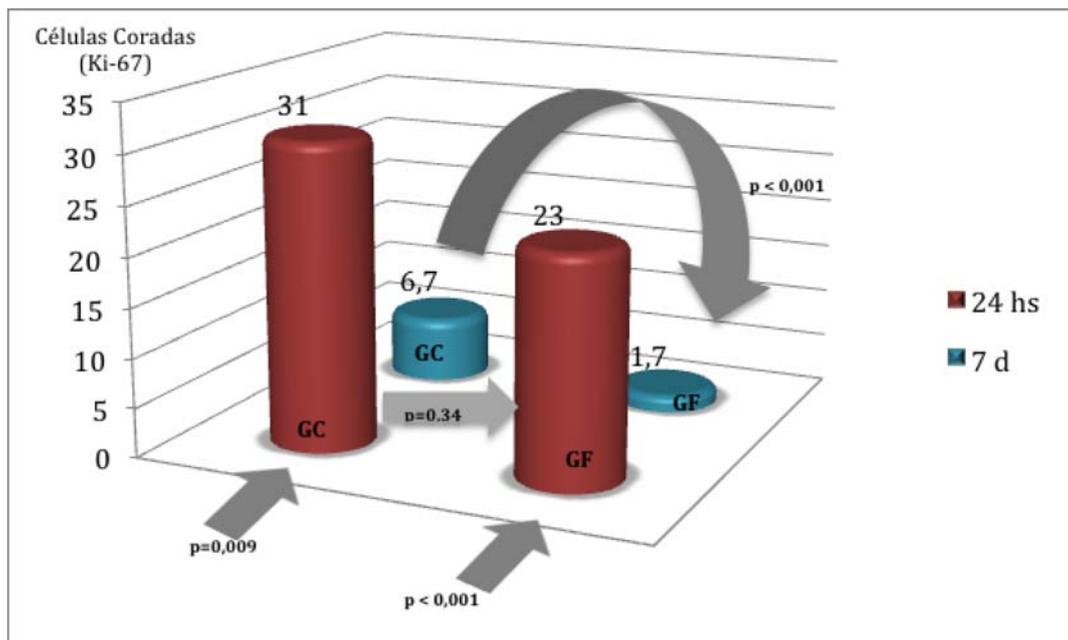


GRÁFICO 5 - AVALIAÇÃO DA REGENERAÇÃO HEPÁTICA PELO KI-67
 Comparação estatística entre os grupos controle (GC) e 5-fu (GF) nos períodos de 24 horas e 7 dias. Em vermelho os grupos de 24 horas e em verde os grupos de 7 dias.
 Comparação estatística entre os grupos (p).
 FONTE: O autor (2013)

5 DISCUSSÃO

A ressecção cirúrgica de metástases hepáticas em pacientes com câncer colorretal (CCR) é considerada a única terapia capaz de oferecer cura. Em pacientes submetidos à cirurgia, taxas de sobrevida de até 58% em cinco anos são relatadas (ABDALLA *et al.*, 2004; FERNANDES *et al.*, 2004). No entanto, no momento do diagnóstico, apenas 10-15% de todos os pacientes são candidatos à ressecção curativa, seja pela topografia e número de lesões ou por falta de condições clínicas do paciente. Quando a cirurgia não é realizada, as taxas de sobrevida são de apenas 5%, mesmo nos pacientes submetidos à quimioterapia paliativa (TOPHAM, 2002).

Nos últimos anos, estratégias de tratamentos quimioterápicos neoadjuvantes associando novas drogas quimioterápicas e terapias-alvo, têm levado ao aumento crescente do número de pacientes que podem ser submetidos à ressecção hepática.

Essas novas terapias possibilitam que um número maior de pacientes, antes considerados irressecáveis, possam ser submetidos ao tratamento que está diretamente relacionado com a possibilidade de cura, através da ressecção das lesões secundárias hepáticas com margens oncológicas livres.

O claro benefício dessas abordagens contrapõe-se aos efeitos tóxicos dos esquemas da quimioterapia no parênquima hepático. Embora vários estudos tenham avaliado o potencial tóxico da quimioterapia sobre o parênquima hepático (WOLF *et al.*, 2013; GRUENBERGER *et al.*, 2008; FOLPRECHT *et al.*, 2010; JI *et al.*, 2013), por ser uma estratégia relativamente

recente, poucos estudos avaliaram diretamente o efeito dos esquemas de QNA no potencial regenerativo hepático.

Esse fato abre amplas possibilidades investigativas e perspectivas de maior conhecimento sobre o efeito desses esquemas no potencial regenerativo hepático, assunto de importância crucial no planejamento de ressecções hepáticas, principalmente em grandes ressecções e em re-hepatectomias, onde a possibilidade de insuficiência hepática pós-operatória deve ser considerada.

A QNA no contexto da prática clínica de tratamento do CCR é administrada antes do tratamento cirúrgico. Neste modelo de estudo, realizamos a administração da quimioterapia no período pré-hepatectomia, com o objetivo de avaliar o efeito da droga utilizada no fenômeno de regeneração hepática após a hepatectomia. Através dessa metodologia pode-se mimetizar a utilização da quimioterapia como ocorre em sua indicação de neoadjuvância em humanos. A QNA é indicada a pacientes portadores de CCR metastático no fígado, com a principal intenção de aumentar as taxas de ressecções. Em um modelo experimental, a utilização de QNA implicaria na presença da neoplasia, ou seja, o modelo experimental teria que contemplar a indução de adenocarcinoma metastático no fígado de ratos, o que tornaria esse modelo de pesquisa complexo e trabalhoso.

O objetivo deste estudo foi avaliar especificamente o efeito da administração de um quimioterápico administrado num período pré-hepatectomia, sobre os mecanismos de regeneração do fígado de ratos. Para isso a presença da neoplasia torna-se dispensável, já que nesta proposta de

estudo, a interferência da droga quimioterápica se faz sobre o parênquima hepático saudável. Por esse motivo, foi utilizado, neste estudo, o termo quimioterapia pré-operatória em referência à QNA em humanos com CCR metastático.

O presente estudo utilizou um modelo experimental bem conhecido e amplamente utilizado de regeneração hepática em ratos. Esse modelo, proposto por Higgins e Anderson em 1931, tem as vantagens de ser facilmente reproduzível, apresentar baixo custo e não exigir estrutura complexa e sofisticação para sua realização. Com desse modelo, é possível estudar qualquer substância que possa promover prejuízo nos mecanismos de regeneração hepática.

A utilização de modelos vivos para o estudo dos fenômenos biológicos é de essencial importância para a compreensão da complexidade e da interação entre os vários elementos envolvidos nesses fenômenos. Os processos regenerativos do fígado, em especial, resultam de uma rede de fatores humorais, celulares e moleculares que geram sinais iniciadores da divisão celular. Sabe-se, por exemplo, que não há replicação de DNA em hepatócitos em cultura, a menos que fatores de crescimento sejam acrescentados ao meio. Mesmo assim, a capacidade de replicação de hepatócitos em cultura mantidos em condições convencionais é muito limitada, diferente do que ocorre *in vivo* (DAHM *et al.*, 2005; MARCOS *et al.*, 2000).

Os ratos utilizados no presente trabalho eram adultos e de peso semelhante. Sobre o fenômeno da regeneração hepática, estudos sugerem que hepatócitos de ratos adultos jovens e velhos parecem apresentar a mesma

capacidade regenerativa. Aparentemente, tais células não entram em senescência, e o número de replicações de hepatócitos transplantados em experimentos com transplantes seriados excede aquele esperado para células de mamíferos. No entanto, de modo geral, metabolismo, capacidade regenerativa e resposta ao trauma cirúrgico se alteram com a idade, de modo que não se pode dizer que o processo global de regeneração hepática em organismos em crescimento ou de indivíduos idosos seja semelhante ao do adulto jovem (FAUSTO *et al.*, 2006).

O desenvolvimento de modelos vivos em animais requer aprimoramento técnico e habilidade microcirúrgica, pois desses fatores dependem o sucesso do procedimento operatório e a sobrevida dos animais.

No presente estudo, após fase inicial de treinamento técnico, os animais passaram a ser operados com a mínima manipulação dos tecidos, em período de tempo médio de 5 minutos, o que causou trauma cirúrgico de pequeno porte. Como consequência, pode-se supor que a resposta inflamatória decorrente do trauma operatório apresentou influência mínima sobre o fenômeno de regeneração do fígado. Além disso, a pequena manipulação e a rapidez do procedimento minimizaram as complicações intra-operatórias e anestésicas, proporcionando alto índice de sobrevida.

Em relação à via de administração utilizada, apesar da maioria dos estudos de efeito de quimioterápicos em ratos utilizarem a via intraperitoneal, optou-se por utilizar a via endovenosa. A escolha dessa via diminui a chance de viés decorrente de alteração de absorção da droga por via intraperitoneal e simula melhor a aplicação do quimioterápico em humanos.

Para a administração endovenosa de soluções em ratos, foi desenvolvida uma técnica segura e efetiva, através da cateterização de veia da cauda. Após a fase de desenvolvimento e treinamento da técnica, a taxa de sucesso com a administração venosa foi de 100%. Tal metodologia poderá ser empregada em pesquisas posteriores, em razão da sua alta factibilidade e efetividade, quando uma via de administração mais fidedigna de avaliação de efeito de fármacos em ratos é necessária.

Para o estudo do efeito da quimioterapia pré-operatória na regeneração hepática em ratos, utilizamos uma única droga quimioterápica. Na prática oncológica do tratamento do CCR, os quimioterápicos são utilizados em associação, sendo os esquemas mais comuns, aqueles que agregam o 5-FU com irinotecano ou oxaliplatina. Especificamente na indicação de QNA para metástases hepáticas de CCR, terapias com anticorpos monoclonais, como o bevacizumabe e cetuximabe, além de outras em fase de avaliação protocolar foram associadas à quimioterapia convencional com o intuito de melhorar a resposta aos tratamentos. Apesar de ser um dos primeiros quimioterápicos desenvolvidos, o 5-FU é ainda utilizado em todos os esquemas de primeira linha no tratamento do CCR e em todos os esquemas de QNA para metástases de CCR. Por esse motivo, optou-se no presente estudo, por analisar isoladamente o efeito do 5-FU no potencial de interferência dos fenômenos regenerativos pós-hepatectomia. Para que se possa avaliar o efeito da QNA utilizada na prática oncológica dentro desse modelo, faz-se necessário em fase posterior, o teste das demais drogas utilizadas nos esquemas de QNA. Da

mesma forma, faz-se necessário o estudo do efeito desses quimioterápicos associados com os anticorpos monoclonais que atualmente são utilizados.

A dose de 5-FU utilizada, de 20 mg/kg, é amplamente citada em estudos de infusão venosa em ratos (NAGASUE *et al.*, 1978; KOHNO *et al.*, 1984; KUZU *et al.*, 1998; FITTKAU *et al.*, 2001) e representa uma bioequivalência da dose em humanos. Apesar da quimioterapia em humanos ser realizada através de várias aplicações em intervalos variados na dependência do esquema, a administração de várias doses em ratos é difícil de ser realizada e está associada à alta taxa de mortalidade (MANEKELLER, 2009).

Embora a utilização de uma única dose de quimioterápico possa ser considerada insuficiente para desencadear interferência no fenômeno da regeneração hepática após a hepatectomia, no presente estudo isto foi suficiente para alterar significativamente alguns parâmetros de avaliação de regeneração hepática.

Nesta proposta de modelo experimental, optou-se por avaliar a interferência do 5-FU na regeneração hepática após HP, em dois períodos distintos do fenômeno de regeneração hepática. Um subgrupo de animais foi submetido ao sacrifício 24 horas após a realização da hepatectomia e outro subgrupo foi submetido ao sacrifício em 7 dias após a realização da hepatectomia. Essa estratégia é fundamental na avaliação da regeneração hepática em ratos, pois os fenômenos regenerativos hepáticos em ratos iniciam-se minutos após a hepatectomia e a maioria dos mecanismos regenerativos fundamentais é estabelecida dentro de 24 horas.

Analisando-se a variável peso dos animais, os subgrupos de 24 horas (GC e GF) apresentaram perda ponderal significativa no intervalo entre o dia da administração das soluções e o dia do óbito. Já os subgrupos de 7 dias (GC e GF) não apresentaram perda ponderal na mesma comparação. Tais resultados são justificados pelo fato do período de 7 dias após a hepatectomia ser suficiente para a recuperação do estresse cirúrgico e ganho ponderal desses animais. Nas comparações entre os grupos controle e 5-FU, não se registrou, neste estudo, influência da droga testada sobre a variação ponderal dos animais aferida no momento inicial, no momento da hepatectomia e no dia do sacrifício.

Na análise da variável peso do fígado, no momento da hepatectomia, houve diferença estatística na comparação dos pesos dos fígados entre os subgrupos GF_{24hs} *versus* GC_{24hs}. Não houve diferença estatística na comparação entre os subgrupos GF_{7d} *versus* GC_{7d}. Essa diferença no peso do fígado na comparação entre o subgrupo GF_{24hs} *versus* GC_{24hs} pode sugerir interferência da droga testada no potencial de regeneração, apesar do caráter rudimentar desse parâmetro isolado.

Na comparação da mesma variável, peso do fígado, no momento do óbito dos animais, a análise estatística revelou que o peso do fígado regenerado/ressecado entre os subgrupos GF e GC apresentou diferença estatística para ambos os períodos de 24 horas e 7 dias, com peso menor nos subgrupos 5-FU, em relação aos subgrupos controle, sugerindo também interferência da droga testada no potencial regenerativo, já que o peso do fígado é considerado um parâmetro da capacidade regenerativa hepática.

Quando estudou-se a relação peso do fígado regenerado/peso corporal do animal no dia do sacrifício, houve diferença estatística na comparação entre os subgrupos GF_{24hs} *versus* GC_{24hs}, mas não houve diferença estatística na comparação entre os subgrupos GF_{7d} *versus* GC_{7d}. A utilização dessa relação permitiu concluir que, analisando-se a variável peso do fígado, houve possível retardo no potencial regenerativo hepático, na comparação dos subgrupos de 24 horas.

A fórmula descrita por Kwon (1990) avalia a porcentagem de regeneração hepática. Para o cálculo desse percentual são utilizados os pesos do fígado e do animal em vários momentos do experimento. Neste estudo, a Fórmula de Kwon foi utilizada como um parâmetro de estudo da regeneração a ser analisada conjuntamente com os outros parâmetros. Na avaliação da regeneração hepática pela Fórmula de Kwon, a análise estatística revelou retardo no potencial regenerativo hepático nos grupos GF em comparação aos grupos GC. Em 24 horas após a hepatectomia, a média percentual de regeneração do subgrupo controle foi de 78,9 % em comparação a 60,9% no subgrupo 5-FU; e após 7 dias, o percentual de regeneração do subgrupo controle foi de 106,1 % em comparação a 93% no subgrupo 5-FU. Essa rápida e incrível capacidade regenerativa em ratos já foi bastante estudada. Como relatado por Labrecque (1994), Ramalho (1993) e Fausto (2000), os fenômenos de regeneração hepática iniciam-se rapidamente após a hepatectomia. Ainda, ciclos adicionais de síntese de DNA podem ser detectados dias após a HP (MICHALOPOLUS, 1997), fato que justifica o

aumento percentual da regeneração hepática nos subgrupos de 7 dias e a diferença estatística na comparação entre os subgrupos de 24 horas e 7 dias.

Na avaliação da regeneração pela variável do Índice Mitótico, a análise estatística não revelou diferença significativa na comparação entre os subgrupos controle e 5-FU de 24 horas. Nos subgrupos controle e 5-FU de 7 dias, o número de mitoses foi igual a zero. Portanto, o índice mitótico, nesta pesquisa, não foi útil para mostrar diferenças entre os grupos controle e 5-FU.

De acordo com Fausto (2006), o pico da atividade mitótica ocorre entre 32-34 horas após a hepatectomia, o que pode justificar a ausência de figuras de mitoses na avaliação dos subgrupos de 7 dias. Ainda, a atividade mitótica intensa nas primeiras horas após a hepatectomia pode justificar o fato da ausência da diferença estatística entre o subgrupo GF_{24hs} e GC_{24hs} sugerindo que neste trabalho, o esquema de quimioterapia utilizado não interferiu no potencial mitótico no período de 24 horas.

Para avaliar a regeneração hepática também foram utilizados os marcadores de proliferação celular PNCA e Ki-67. O PCNA é uma proteína envolvida na replicação e reparo do DNA de células em divisão e o antígeno Ki-67 é uma proteína nuclear expressada nas células em proliferação. Esses antígenos são amplamente utilizados como marcadores imuno-histoquímicos de regeneração hepática após hepatectomia em ratos (CHIJIWA *et al.*, 1994, ASSY *et al.*, 1998, SAKAGUCHI *et al.*, 2000, MANEKELLER *et al.*, 2009 RICHENBACKER *et al.*, 2011).

Na análise do PCNA, observou-se diferença estatística entre os grupos controle *versus* 5-FU de 24 horas, e entre os subgrupos controle *versus* 5-FU de 7 dias, com menor percentual de células coradas nos grupos 5-FU, sugerindo interferência da droga 5-FU no potencial regenerativo hepático nos dois períodos. Não era esperado que o PCNA apresentasse taxas elevadas nos períodos de 7 dias em comparação aos períodos de 24 horas. Possíveis justificativas para esse efeito podem estar relacionadas ao fato de os ratos utilizados no estudo serem adultos jovens, portanto com alta capacidade de regeneração. Além disso, foram utilizados apenas dois momentos de leitura da interferência da droga testada no fenômeno da regeneração, fato que pode ter limitado a avaliação desse parâmetro.

A análise das figuras coradas pelo Ki-67, permitiu a constatação de um maior número de células coradas nos subgrupos de 24 horas quando comparados aos subgrupos de 7 dias, revelando o maior potencial regenerativo, ou seja, um maior número de células fora da fase G_0 nas primeiras 24 horas após a hepatectomia. Não houve diferença estatística na comparação dos subgrupos controle *versus* 5-FU de 24 horas, mas houve diferença na comparação entre os subgrupos controle *versus* 5-FU de 7 dias, sugerindo interferência do 5-FU na fase tardia da regeneração hepática, quando analisa-se somente a variável Ki-67.

Com relação ao estudo de Manekeller (2009), que consiste em um dos poucos estudos de efeito de quimioterapia pré-hepatectomia, em um modelo experimental semelhante à este, houve diferença no percentual de células marcadas pelo PCNA e Ki-67 na comparação entre o grupo controle e estudo.

Devido a escassez de trabalhos com modelos experimentais de regeneração hepática, que avaliam o efeito da quimioterapia pré-operatória no potencial regenerativo, não foi possível comparar alguns dos resultados desta pesquisa. Observamos ausência de células em mitose nos subgrupos de 7 dias, no entanto, na avaliação do percentual de células marcadas pelo PCNA e Ki-67 houve diferença entre os subgrupos controle e 5-FU para o período de 24 horas. Ainda, a razão do parâmetro PCNA, na análise intragrupos GC_{24hs} versus GC_{7d} ter revelado maior percentual de células coradas no período de 7 dias pode estar relacionado à idade dos ratos, pois sabe-se que em ratos adultos jovens os fenômenos de regeneração hepática são intensos.

Portanto, levando-se em conta as diferenças estatísticas encontradas na análise das variáveis: peso do fígado, fórmula de Kwon, e análise imunohistoquímica, observamos interferência da droga 5-FU administrada em período pré-operatório, na dose intravenosa utilizada, no potencial regenerativo hepático pós-hepatectomia extensa em ratos.

O baixo número de trabalhos que testam o efeito do 5-FU no contexto pré-operatório em modelos experimentais deve-se ao fato da QNA no contexto da doença metastática hepática ser relativamente recente em humanos. No entanto, existem trabalhos que comprovaram o efeito supressor da regeneração hepática quando o 5-FU é administrado no período pós-hepatectomia (NAGASUE *et al.*, 1978; CARRICO *et al.*, 1979; KOHNO *et al.*, 1984).

Esses estudos remontam à uma época da Oncologia durante a qual, a quimioterapia era sempre administrada no contexto da adjuvância, ou seja, no

período pós-operatório. Portanto, pode-se supor que o retardo na regeneração hepática nesses modelos deveu-se aos efeitos citotóxicos e imunossupressores do 5-FU. Esses efeitos não podem ser transportados para o conceito da quimioterapia na neoadjuvância. Quando estuda-se a QNA no potencial de interferência da regeneração hepática, leva-se em consideração a alteração histológica promovida no parênquima hepático pela utilização da quimioterapia prévia ao ato cirúrgico, e a possível interferência desses danos histológicos no potencial regenerativo após a ressecção hepática.

Apesar deste estudo, bem como o de Manekeller *et al* (2008), terem revelado interferência de quimioterápicos aplicados no pré-operatório no potencial de regeneração hepática, Rickenbacher *et al.* (2011), apresentaram resultados distintos. Em seu trabalho, utilizando combinações das drogas 5-FU com irinotecano e 5-FU com oxaliplatina administradas em vários ciclos pela via intraperitoneal em ratos, os autores não observaram qualquer interferência dos esquemas neoadjuvantes no potencial regenerativo hepático por critérios imuno-histoquímicos de PCNA e Ki-67. A comparação desses resultados com o presente trabalho torna-se difícil, já que tanto a via de administração, endovenosa neste estudo, e intraperitoneal no estudo de Rickenbacher *et al.* (2011), assim como os esquemas de quimioterapia, foram diferentes entre os dois estudos.

Quando analisa-se o contexto QNA realizada na prática clínica, deve-se levar em consideração o fato de que o 5-FU é sempre administrado em conjunto com outras drogas e em vários ciclos. Tais tratamentos provocam danos bem conhecidos no parênquima hepático e mencionados nesse

trabalho. No entanto não está elucidado se esses danos diminuem a capacidade de regeneração do fígado após uma ressecção hepática extensa.

É difícil reproduzir a nível experimental os atuais tratamentos, uma vez que a administração endovenosa de quimioterapia por vários ciclos em ratos torna-se complexa em razão das dificuldades técnicas.

Portanto, deve-se levar em conta as limitações deste modelo experimental, no sentido de reproduzir em ratos, a condição histológica do parênquima hepático humano após vários ciclos de quimioterapia.

Estudos adicionais são necessários para a validação de um modelo experimental em animais, que possa contemplar a quimioterapia administrada por via endovenosa por vários ciclos, já que a toxicidade da quimioterapia sobre o parênquima hepático pode estar relacionada ao dano histológico tardio, após vários ciclos de quimioterapia e dependente dos diferentes esquemas utilizados.

Desta maneira, a utilização bem sucedida neste estudo, do quimioterápico 5-FU por via endovenosa isoladamente, abre possibilidades experimentais de seguimento na investigação dos efeitos da quimioterapia pré-operatória sobre a regeneração hepática com a utilização dos demais quimioterápicos e associações, contribuindo assim, para a complementação de informações acerca dos efeitos desses tratamentos na regeneração hepática.

6 CONCLUSÕES

1. A administração pré-operatória de 5-FU em dose única endovenosa determina redução significativa nos percentuais de regeneração hepática, analisadas pela Fórmula de Kwon, tanto 24 horas quanto 7 dias após ressecção hepática extensa no modelo animal empregado.
2. O parâmetro Índice Mitótico, quando analisado em 24 horas e 7 dias, não foi capaz de detectar influência da administração pré-operatória de 5-FU em dose única endovenosa sobre a regeneração hepática induzida pela ressecção hepática extensa, no modelo animal empregado.
3. A administração pré-operatória de 5-FU em dose única endovenosa reduz significativamente a regeneração hepática, analisada pelos marcadores de proliferação celular PCNA e Ki-67, tanto em 24 horas (PCNA) quanto em 7 dias (PCNA e Ki-67) após ressecção hepática extensa, no modelo animal empregado.
4. A administração pré-operatória de 5-FU em dose única endovenosa interfere negativamente na regeneração hepática analisada em dois momentos distintos (24 horas e 7 dias) após ressecção hepática extensa no modelo animal empregado.

REFERÊNCIAS

Abdalla, E.K., Vauthey, J.N., Ellis, L.M., Ellis, V, Pollock, R, Broglio, K.R., Hess, K, Curley, S.A. **Recurrence and Outcomes Following Hepatic Resection, Radiofrequency Ablation, and Combined Resection/Ablation for Colorectal Liver Metastases**. Annals of Surgery, Volume 239, Number 6, June 2004, p.818–825. Disponível em: <<http://www.ctsi.ucla.edu/education/files/view/training/docs/Abdalla04AnSurg.pdf>>; acesso em 30/03/2013.

Adam, R., De Gramont, A., Figueras, J., Guthrie, A., Kokudo, N., Kunstlinger, F., Loyer, E., Poston, G., Rougier, P., Rubbia-Brandt, L., Sobrero, A., Tabernero, J., Teh, C., Van Cutsem, E., Vauthey, J.N. **The oncosurgery approach to managing liver metastases from colorectal cancer: a multidisciplinary international consensus**. Oncologist. 2012; 17(10):1225-39. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22962059>>; acesso em 30/03/2013.

Adam, R., Avisar, E., Ariche, A., Giachetti, S., Azoulay, D., Castaing, D., Kunstlinger, F., Levi, F., Bismuth, F. **Five-year survival following hepatic resection after neoadjuvant therapy for nonresectable colorectal**. Ann Surg Oncol. 2001;8:347-353. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11352309>>; acesso em 30/03/2013.

Alberts, S.R., Horvath, W.L., Sternfeld, W.C., Goldberg, R.M., Mahoney, M.R., Dakhil, S.R., Levitt, R., Rowland, K., Nair, S., Sargent, D.J., Donohue, J.H. **Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin for patients with unresectable liver-only metastases from colorectal cancer: a North Central Cancer Treatment Group phase II study**. J Clin Oncol. 2005 Dec 20;23(36):9243-9. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16230673>>; acesso em 30/03/2013.

Aller, M.A., Arias, N., Prieto, I., Agudo, S., Gilsanz, C., Lorente, L., Arias, J.L., Arias, J. **A half century (1961-2011) of applying microsurgery to experimental liver research**. World J Hepatol. 2012 July 27; 4(7): 199–208. Published online 2012 July 27. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3409354>>; acesso em 20/03/2013.

Assy, N., Minuk, G.Y. **Liver Regeneration: Methods for Monitoring and their Applications.** J Hepatol 1997; 26 (4) : 945-52. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9126813>>; acesso em 03/04/2013.

Assy, N., Gong, Y., Zhang, M., Pettigrew, N.M., Pashniak, D., Minuk, G.Y. **Use of proliferating cell nuclear antigen as a marker of liver regeneration after partial hepatectomy in rats.** J Lab Clin Med. 1998 Mar;131(3):251-6.

Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9523849>>; acesso em 18/04/2012.

Barone, C., Nuzzo, G., Cassano, A., Basso, M., Schinzari, G., Giuliente, F., D'Argento, E., Trigila, N., Astone, A., Pozzo, C. **Final analysis of colorectal cancer patients treated with irinotecan and 5-fluorouracil plus folinic acid neoadjuvant chemotherapy for unresectable liver metastases.** Br J Cancer. 2007 Oct 22;97(8):1035-9. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17895897>>; acesso em 03/Abr/2013.

Benoist, S., Brouquet, A., Penna, C., Julié, C., El Hajjam, M., Chagnon, S., Mitry, E., Rougier, P., Nordlinger, B. **Complete response of colorectal liver metastases after chemotherapy: does it mean cure?** J Clin Oncol. 2006 Aug 20;24(24):3939-45. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16921046>>; acesso em 03/04/2013.

Bismuth, H., Adam, R., Lévi, F., Farabos, C., Waechter, F., Castaing, D., Majno, P., Engerran, L. **Resection of nonresectable liver metastases from colorectal cancer after neoadjuvant chemotherapy.** Ann Surg. 1996; October; 224:509-520; Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1235414/>>; acesso em 09/04/2013.

Carrico, C.K., Glazer, R.I. **Effect of 5-fluorouracil on the synthesis and translation of polyadenylic acid-containing RNA from regenerating rat liver.** Cancer Res. 1979 Sep;39(9):3694-701. Disponível em:

<<http://cancerres.aacrjournals.org/content/39/9/3694.long>>; acesso em 18/03/2012.

Chambers, A.F., Groom, A.C., MacDonald, I.C. **Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites.** Nat Rev Cancer, 2002 Aug 2: 563-572, 2002.

Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12154349>>; acesso em 09/04/2013.

Chanda, S., Mehendale, H.M. **Nutritional modulation of the final outcome of hepatotoxic injury by energy substrates: an hypothesis for the mechanism.** Med. Hypotheses 1996 Mar; 46 (3): 261-8. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8676764>>; acesso em 09/04/2013.

Chanda, S., Mehendale, H.M. **Role of nutrition in the survival after hepatotoxic injury.** Toxicology 1996 Jul; 111 (1-3): 163-78. Disponível: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8711733>>; acesso em 09/04/2013.

Chijiwa, K., Nakano, K., Kameoka, N., Nagai, E., Tanaka, M. Proliferating cell nuclear antigen, plasma fibronectin, and liver regeneration rate after seventy percent hepatectomy in normal and cirrhotic rats. *Surgery*. 1994 Sep;116(3):544-9. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7915857>>; acesso 06/04/2012.

Carreras, C.W., Santi, D.V. **The catalytic mechanism and structure of thymidylate synthase.** Annu Rev Biochem. 1995;64:721-62. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7574499>>; acesso em 18/03/2013.

5-Fluorouracil formamide. Fórmula. Disponível em: <<http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.25936779.html>>; acesso em 09/04/2013.

Cunningham, D., Humblet, Y., Siena, S., Khayat, D., Bleiberg, H., Santoro, A., Bets, D., Mueser, M., Harstrick, A., Verslype, C., Chau, I., Van Cutsem, E. Cetuximab Monotherapy and Cetuximab plus Irinotecan in Irinotecan-Refractory Metastatic Colorectal Cancer. *N Engl J Med* 2004 Jul; 351:337-345. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa033025>>; acesso em 06/04/2013.

Dahm, F., Georgiev, P., Clavien, P.A. **Small-for-size syndrome after partial liver transplantation: definition, mechanisms of disease and clinical implications.** *Am J Transplant*, 2005; 5(11):2605-2610. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16212618>>; acesso em 06/04/2013.

De Gramont, A., Figer, A., Seymour, M., Homerin, M., Hmissi, A., Cassidy, J., Boni, C., Cortes-Funes, H., Cervantes, A., Freyer, G., Papamichael, D., Le Bail, N., Louvet, C., Hendler, D., de Braud, F., Wilson, C., Morvan, F., Bonetti, A. **Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer.** J Clin Oncol. 2000; Aug. 18:2938–47. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10944126>>; acesso em 06/04/2013.

Diasio, R.B. **Sorivudine and 5-fluorouracil; a clinically significant drug-drug interaction due to inhibition of dihydropyrimidine dehydrogenase.** Br J Clin Pharmacol. 1998 Jul;46(1):1-4. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9690942>>; acesso em 18/03/2012.

Diehl, A.M., Rai, R. **Review: Regulation of liver regeneration by pro-inflammatory cytokines.** Journal of Gastroenterology and Hepatology, 11: 466–470. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8743919>>; acesso 18/03/2012.

Elias, H. **Liver Morphology.** Biological Reviews, 30: 263–310. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1469-185X.1955.tb01210.x/abstract>>; acesso em 18/03/2012.

Estimativas 2012 – Incidência de Câncer no Brasil. Fonte: www.inca.gov.br

Falcone, A., Ricci, S., Brunetti, I., Pfanner, E., Allegrini, G., Barbara, C., Crinò, L., Benedetti, G., Evangelista, W., Fanchini, L., Cortesi, E., Picone, V., Vitello, S., Chiara, S., Granetto, C., Porcile, G., Fioretto, L., Orlandini, C., Andreuccetti, M., Masi, G., Gruppo Oncologico Nord Ovest. **Phase III trial of infusional fluorouracil, leucovorin, oxaliplatin, and irinotecan (FOLFOXIRI) compared with infusional fluorouracil, leucovorin, and irinotecan (FOLFIRI) as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: the Gruppo Oncologico Nord Ovest.** J Clin Oncol 2007 May 1;25(13):1670-6. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17470860>>; acesso em 02/04/2013.

Fausto N. **Liver Regeneration.** J Hepatol. 2000; 32(1 Suppl):19-31. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10728791>; acesso em 05/05/2012

Fausto N, Campbell JS, Riehle KJ. **Liver Regeneration.** J Hepatol. 2006 Feb; 43(2 Suppl 1):S45-53. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16447274>>; acesso em 02/04/2013.

Fernandez, F.G., Drebin, J.A., Linehan, D.C., Dehdashti, F., Siegel, B.A., Strasberg, S.M. **Five-year survival after resection of hepatic metastases from colorectal cancer in patients screened by positron emission tomography with F-18 fluorodeoxyglucose (FDG-PET).** Ann Surg 2004 Sept;240(3):438–447. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15319715>>; acesso em 09/04/2013.

Fernandez, F.G., Ritter, J., Goodwin, J.W., Linehan, D.C., Hawkins, W.G., Strasberg, S.M. **Effect of steatohepatitis associated with irinotecan or oxaliplatin pretreatment on resectability of hepatic colorectal metastases.** J Am Coll Surg. 2005 Jun;200(6):845-53. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15922194>>; acesso em 18/09/2012.

Fidler, I.J. **Critical factors in the biology of human cancer metastasis: twenty-eighth G.H.A. Clowes memorial award lecture.** Cancer Res 1990 Oct 1;50(19):6130-8. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1698118>>; acesso em 09/04/2013.

Fidler, I.J. **The pathogenesis of cancer metastasis: the “seed and soil” hypothesis revisited.** Nat Rev Cancer 2003 Jun; 3(6) 453-458. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12778135>>; acesso em 09/04/2013.

Fittkau, M., Gerlach, R., Schmoll, H.J. **Protective effect of oral phosphatidylcholine on radiation-induced release of intestinal peptidases in rats.** J Cancer Res Clin Oncol. 2001 Jul;127(7):444-8. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11469682>>; acesso em 09/04/2013.

Fladmark, K.E., Gjertsen, B.T., Molven, A., Mellgren, G., Vintermyr, O.K., Doskeland, S.O. **Gap junctions and growth control in liver regeneration and in isolated rat hepatocytes.** Hepatology 1997; 25 (4):847-855. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9096587>>; acesso em 13/04/2013.

Folprecht, G., Gruenberger, T., Bechstein, W.O., Raab, H.R., Lordick, F., Hartmann, J.T., Lang, H., Frilling, A., Stoehlmacher, J., Weitz, J., Konopke, R., Stroszczyński, C., Liersch, T., Ockert, D., Herrmann, T., Goekkurt, E., Parisi, F., Köhne, C.H. **Tumour response and secondary resectability of colorectal liver metastases following neoadjuvant chemotherapy with cetuximab: the CELIM randomised phase 2 trial.** Lancet Oncol. 2010 Jan;11(1):38-47. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19942479>>; acesso em 13/04/2013.

Fong, Y., Fortner, J., Sun, R.L., Brennan, M.F., Blumgart, L.H. **Clinical score for predicting recurrence after hepatic resection for metastatic colorectal cancer: analysis of 1001 consecutive cases.** Ann Surg. 1999 Sept;230(3):309–318. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10493478>>; acesso em 13/04/2013.

Fuchs, C.S., Marshall, J., Mitchell, E., Wierzbicki, R., Ganju, V., Jeffery, M., Schulz, J., Richards, D., Soufi-Mahjoubi, R., Wang, B., Barrueco, J. **Randomized, controlled trial of irinotecan plus infusional, bolus, or oral fluoropyrimidines in first-line treatment of metastatic colorectal cancer: results from the BICC-C Study.** J Clin Oncol 2007;25:4779-86. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17947725>>; acesso em 13/04/2013.

Giacchetti, S., Itzhaki, M., Gruia, G., Adam, R., Zidani, R., Kunstlinger, F., Brienza, S., Alafaci, E., Bertheault-Cvitkovic, F., Jasmin, C., Reynes, M., Bismuth, H., Misset, J.L., Lévi, F. **Long-term survival of patients with unresectable colorectal cancer liver metastases following infusional chemotherapy with 5-fluorouracil, leucovorin, oxaliplatin and surgery.** Ann Oncol. 1999;10:663-669. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10442188>>; acesso em 13/04/2013.

Giacchetti, S., Perpoint, B., Zidani, R., Le Bail, N., Faggiuolo, R., Focan, C., Chollet, P., Llory, J.F., Letourneau, Y., Coudert, B., Bertheault-Cvitkovic, F., Larregain-Fournier, D., Le Rol, A., Walter, S., Adam, R., Misset, J.L., Lévi, F. **Phase III multicenter randomized trial of oxaliplatin added to chronomodulated fluorouracil-leucovorin as first-line treatment of metastatic colorectal cancer.** J. Clin. Oncol. 2000, 18, 136-147. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10623704>>; acesso em 13/04/2013.

Gruenberger, B., Tamandl, D., Schueller, J., Scheithauer, W., Zielinski, C., Herbst, F., Gruenberger, T. **Bevacizumab, capecitabine, and oxaliplatin as neoadjuvant therapy for patients with potentially curable metastatic colorectal cancer.** J Clin Oncol. 2008 Apr 10;26(11):1830-5. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18398148>>; acesso 20/03/2013.

Harris, B.E., Song, R., Soong, S.J., Diasio, R.N. **Circadian variation of 5-fluorouracil catabolism in insolated perfused rat liver.** Cancer Res. 1989; 49:6610-6614.

Hanahan, D., Weinberg, R.A. **Hallmarks of cancer: the next generation.** Cell 144: 646-674, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21376230>>; acesso em 27/04/2013.

Heidelberger C, Leibman KC, Harbers E, Bhargava PM. **The comparative utilization of uracil-2-C14 by liver, intestinal mucosa, and Flexner-Jobling carcinoma in the rat.** Cancer Res. 1957 Jun;17(5):399-404. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13437303>>; acesso 18/03/2012.

Higgins, G.M., Anderson, R.M. Experimental pathology of the liver – Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. **Arch Pathol. 1931;12:186-202.**

Horak, C.E., Steeg, P.S. **Metastasis gets site specific.** Cancer Cell 8: 93-95, 2005. Cancer Cell. 2005 Aug;8(2):93-5. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16098461>>; acesso em 27/04/2013.

Hurwitz, H., Fehrenbacher, L., Novotny, W., Cartwright, T., Hainsworth, J., Heim, W., Berlin, J., Baron, A., Griffing, S., Holmgren, E., Ferrara, N., Fyfe, G., Rogers, B., Ross, R., Kabbinavar, F. **Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer.** N Engl J Med 2004;350:2335–42. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15175435>>; acesso em 27/04/2013.

Ji, J.H., Park, S.H., Lee, J., Kim, T.W., Hong, Y.S., Kim, K.P., Kim, S.Y., Baek, J.Y., Kang, H.J., Shin, S.J., Shim, B.Y., Park, Y.S. **Prospective phase II study of neoadjuvant FOLFOX6 plus cetuximab in patients with colorectal cancer and unresectable liver-only metastasis.** Cancer Chemother Pharmacol. 2013 Jul;72(1):223-30. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23689915>>; acesso 12/08/2013.

Jin, M.B., Yamaguchi, T., Shimahara, Y., Ichimiya, M., Kinoshita, K., Oka, T., Ozawa, K., Yamaoka, Y. **Significance of Nucleosides and Nucleotide Mixture Infusion on Hepatic Energy Metabolism of 70 % Hepatectomized Rabbits in Postoperative Phase.** JPEN J Parenter Enteral Nutr. 1996 May-Jun;20(3):211-4. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8776695>>; acesso em 27/04/2013.

Karoui, M, Penna, C., Amin-Hashem, M., Mitry, E., Benoist, S., Franc, B., Rougier, P., Nordlinger, B. **Influence of preoperative chemotherapy on the risk of major hepatectomy for colorectal liver metastases.** Ann Surg 243:1–7. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16371728>>; acesso em 27/04/2013.

Kohno, H., Inokuchi, K. **Effects of postoperative adjuvant chemotherapy on liver regeneration in partially hepatectomized rats.** Jpn J Surg. 1984 Nov;14(6):515-23. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6530847>>; acesso em 27/04/2013.

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. 1990 Mar;211(3):295-300. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2328953>>; acesso em 25/04/2012.

Kuzu, M.A., Kuzu, I., Köksoy, C., Akyol, F.H., Uzal, D., Kale, I.T., Orhan, D., Terzi, C. **Histological evaluation of colonic anastomotic healing in the rat following preoperative 5-fluorouracil, fractionated irradiation, and combined treatment.** Int J Colorectal Dis. 1998;13(5-6):235-40. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9870168>>; acesso em 27/04/2013.

LaBrecque, D. **Liver regeneration: a picture emerges from the puzzle.** Am J Gastroenterol 1994; 89(8): 586-96. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8048418>>; acesso em 27/04/2013.

Leonard, G.D., Brenner, B., Kemeny, N.E. **Neoadjuvant chemotherapy before liver resection for patients with unresectable liver metastases from colorectal carcinoma.** J Clin Oncol. Mar, 2005:2038-2048. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15774795>>; acesso em 13/04/2013.

Lim, C., Farges, O. **Portal vein occlusion before major hepatectomy in patients with colorectal liver metastases: rationale, indications, technical aspects, complications and outcome.** J Visc Surg. 2012 Apr;149(2):e86-96. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22504072>>; acesso em 12/12/2012.

Longley, D.B., Harkin, D.P., Johnston, P.G. **5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies**. Nat Rev Cancer. 2003 May;3(5):330-8. Disponível em: <<http://www.nature.com/nrc/journal/v3/n5/abs/nrc1074.html>>; acesso 20/03/2013.

Lux, K.Y. **Organotropism of breast cancer metastasis**. J Mammary Gland Biol Neoplasia. 2007 Sep 12: 153-162. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17566854>>; acesso em 27/04/2013.

Makowiec, F., Möhrle, S., Neeff, H., Drognitz, O., Illerhaus, G., Opitz, O.G., Hopt, U.T., zur Hausen, A. **Chemotherapy, liver injury, and postoperative complications in colorectal liver metastases**. J Gastrointest Surg. 2011 Jan;15(1):153-64. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21061183>>; acesso em 20/03/2013.

Manekeller, S., Seinsche, A., Sioutis, M., Hirner, A. **Extended liver resection after preoperative chemotherapy: influence on regeneration and endoplasmic reticulum stress response**. Langenbecks Arch Surg. 2009 Jul;394(4):681-8. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18688639>>; acesso em 27/04/2013.

Marcos, A., Fisher, R.A., Ham, J.M., Shiffman, M.L., Sanyal, A.J., Luketic, V.A., Sterling, R.K., Fulcher, A.S., Posner, M.P. **Liver regeneration and function in donor and recipient after right lobe adult living donor liver transplantation**. Transplantation. 2000; 69(7):1375-1379. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10798757>>; acesso em 27/04/2013.

MiChalopoulos, G.K., DeFrances, M.C. **Liver Regeneration**. Science 1997; 276: 60-6. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9082986>>; acesso em 27/04/2013.

Minagawa, M., Makuuchi, M., Torzilli, G., Takayama, T., Kawasaki, S., Kosuge, T., Yamamoto, J., Imamura, H. **Extension of the frontiers of surgical indications in the treatment of liver metastases from colorectal cancer: long-term results**. Ann Surg. 2000 Apr;231(4):487-99. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1421023/>>; acesso 27/09/2012.

Morris-Stiff, G., Tan, Y.M., Vauthey, J.N. **Hepatic complications following preoperative chemotherapy with oxaliplatin or irinotecan for hepatic colorectal metastases**. European Journal of Surgical Oncology - June 2008 (Vol. 34, Issue 6, Pages 609-614). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17764887>>; acesso 20/03/2013.

Nagasue, N., Kobayashi, M., Iwaki, A., Yukaya, H., Kanashima, R., Inokughi, K. **Effect of 5-fluorouracil on liver regeneration and metabolism after partial hepatectomy in the rat**. Cancer. 1978 Feb; 41(2):435-43. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/630531>>; acesso em 27/04/2013.

Nguyen, D.X., Bos, P.D., Massagué, J. **Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization**. Nat Rev Cancer 9: 274-284, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19308067>>; acesso em 27/04/2013.

Nordlinger, B., Vaillant, J.C., Guiguet, M., Balladur, P., Paris, F., Bachellier, P., Jaeck, D. **Survival benefit of repeat liver resections for recurrent colorectal metastases: 143 cases**. Association Francaise de Chirurgie. J Clin Oncol. 1994 Jul;12(7):1491-6. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8021741>>; acesso em 20/05/2012.

Nordlinger, B., Sorbye, H., Glimelius, B., Poston, G.J., Schlag, P.M., Rougier, P., Bechstein, W.O., Primrose, J.N., Walpole, E.T., Finch-Jones, M., Jaeck, D., Mirza, D., Parks, R.W., Collette, L., Praet, M., Bethe, U., Van Cutsem, E., Scheithauer, W., Gruenberger, T. **Perioperative chemotherapy with FOLFOX4 and surgery versus surgery alone for resectable liver metastases from colorectal cancer (EORTC Intergroup trial 40983): a randomised controlled trial**. Lancet. 2008 Mar 22;371(9617):1007-16. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18358928>>; acesso em 27/04/2013.

Okano, K., Tsubouchi, T., Yamashita, Y., Wakabayashi, H., Maeba, T., Maeta, H., Tanaka, S. **Hepatic protein synthesis in the regenerating rat liver after hepatopancreatectomy**. Surg Today 1997; 27: 511-17. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9306544>>; acesso em 27/04/2013.

Pinedo, H.M., Peters, G.F. **Fluorouracil: biochemistry and pharmacology**. J Clin Oncol. 1988 Oct;6(10):1653-64. Review. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3049954>>; acesso 25/03/2012.

Pozzo, C., Basso, M., Cassano, A., Quirino, M., Schinzari, G., Trigila, N., Vellone, M., Giuliani, F., Nuzzo, G., Barone, C. **Neoadjuvant treatment of unresectable liver disease with irinotecan and 5-fluorouracil plus folinic acid in colorectal cancer patients.** Ann Oncol. 2004 Jun;15(6):933-9. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15151951>>; acesso em 27/04/2013.

Pulitano, C., Bodingbauer, M., Aldrighetti, L., de Jong, M.C., Castillo, F., Schulick, R.D., Parks, R.W., Choti, M.A., Wigmore, S.J., Gruenberger, T., Pawlik, T.M. **Liver resection for colorectal metastases in presence of extrahepatic disease: results from an international multi-institutional analysis.** Ann Surg Oncol. 2011 May;18(5):1380-8. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21136180>>; acesso em 27/04/2013.

Ramalho, F.S., Ramalho, L.N.Z., Zucoloto, S., Silva Jr, O.C. **Regeneração Hepática - Algumas Definições num Universo de Incertezas.** Acta Cir Brasil 1993; 8 (4) : 177-189. Disponível em: <http://www.sobradpec.org.br/acta_93-96/1993/volume_8/number_4/pdf/9.pdf>; acesso em 27/04/2013.

Rickenbacher, A., De Oliveira, M.L., Tian, Y., Jang, J.H., Riener, M.O., Graf, R., Moritz, W., Clavien, P.A. **Arguments against toxic effects of chemotherapy on liver injury and regeneration in an experimental model of partial hepatectomy.** Liver Int. 2011 Mar;31(3):313-21. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21281431>>; acesso em 27/04/2013.

Rutman, R.J., Cantarow, A., Paschkis, K.E. **Studies in 2-acetylaminofluorene carcinogenesis. III. The utilization of uracil-2-C14 by preneoplastic rat liver and rat hepatoma.** Cancer Res. 1954, 14, 119-123. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13126946>>; acesso em 27/04/2013.

Sakaguchi, K., Takeuchi, E., Suzuki, M., Oda, K., Nagino, M., Nimura, Y., Yoshida, S. **DNA polymerases and Ki-67 nuclear antigen are induced in correlation with the resected mass of rat liver up to 90%.** Langenbecks Arch Surg. 2000 Mar;385(2):135-42. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10796052>>; acesso em 18/04/2012.

Saltz, L.B., Clarke, S., Díaz-Rubio, E., Scheithauer, W., Figer, A., Wong, R., Koski, S., Lichinitser, M., Yang, T.S., Rivera, F., Couture, F., Sirzén, F., Cassidy, J. **Bevacizumab in combination with oxaliplatin-based chemotherapy as first-line therapy in metastatic colorectal cancer: a randomized phase III study.** J Clin Oncol 2008; 26:2013-9. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18421054>>; acesso em 27/04/2013.

Scheele, J., Stang, R., Altendorf-Hofmann, A. **Resection of colorectal liver metastases.** World J Surg. 1995;19:59 –71. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007/BF00316981#page-2>>; acesso em 27/04/2013.

Siegel, R., Naishadham, D., Jemal, A., **Cancer Statistics, 2013.** CA CANCER J CLIN 2013;63:11-30. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.3322/caac.21166/pdf>>; acesso em 10/10/2013.

Tannuri, A.C.A., Tannuri, U., Coelho, M.C., Santos, N.A., Mello, E.S. **Experimental models of hepatectomy and liver regeneration using newborn and weaning rats.** Clinics (Sao Paulo). 2007 Dec;62(6):757-62. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18209919>>; acesso em 27/04/2013.

Topham, C., Adam, R. **Oncosurgery: a new reality in metastatic colorectal carcinoma.** Semin Oncol (2002) 29:3–10. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12422303>>; acesso em 27/04/2013.

Tournigand, C., André, T., Achille, E., Lledo, G., Flesh, M., Mery-Mignard, D., Quinaux, E., Couteau, C., Buyse, M., Ganem, G., Landi, B., Colin, P., Louvet, C., de Gramont, A. **FOLFIRI Followed by FOLFOX6 or the reverse sequence in advanced colorectal cancer: a randomized GERCOR study.** J Clin Oncol 2004 Jan, 22 (2)229-237. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14657227>>; acesso em 09/04/2013.

van Kuilenburg AB, Maring JG. **Evaluation of 5-fluorouracil pharmacokinetic models and therapeutic drug monitoring in cancer patients.** Pharmacogenomics. 2013 May;14(7):799-811. doi: 10.2217/pgs.13.54. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23651027>; acesso 16/08/2013.

van Vledder, M.G., Jong, M.C., Pawlik, T.M., Schulick, R.D., Diaz, L.A., Choti, M.A. **Disappearing colorectal liver metastases after chemotherapy: should we be concerned?** J Gastrointest Surg. 2010 Nov; 14(11):1691-700. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20839072>>; acesso em 27/04/2013.

Wein, A., Riedel, C., Köckerling, F., Martus, P., Baum, U., Brueckl, W.M., Reck, T., Ott, R., Hänslér, J., Bernatik, T., Becker, D., Schneider, T., Hohenberger, W., Hahn, E.G. **Impact of surgery on survival in palliative patients with metastatic colorectal cancer after first line treatment with weekly 24-hour infusion of high-dose 5-fluorouracil and folinic acid.** *Ann Oncol.* 2001;12:1721-1727. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11843250>>; acesso em 27/04/2013.

Wolf, P.S., Park, J.O., Bao, F., Allen, P.J., DeMatteo, R.P., Fong, Y., Jarnagin, W.R., Kingham, T.P., Gönen, M., Kemeny, N., Shia, J., D'Angelica, M.I. **Preoperative chemotherapy and the risk of hepatotoxicity and morbidity after liver resection for metastatic colorectal cancer: a single institution experience.** *J Am Coll Surg.* 2013. Jan;216(1):41-9. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17764887>>; acesso 20/10/2013.

Zorzi, D., Laurent, A., Pawlik, T.M., Lauwers, G.Y., Vauthey, J.N., Abdalla, E.K. **Chemotherapy-associated hepatotoxicity and surgery for colorectal liver metastases.** *Br J Surg.* 2007 Mar;94(3):274-86. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17315288>>; acesso 20/03/2013.

APÊNDICES

APÊNDICE I

DADOS DOS PESOS DOS ANIMAIS NOS GRUPOS CONTROLE (GC_{24hs} e GC_{7d})

Animal	Peso em gramas		
	Inicial	Hepatectomia	Sacrifício
GC_{24hs} 1	320	302	279
GC_{24hs} 2	335	316	302
GC_{24hs} 3	354	325	302
GC_{24hs} 4	341	319	289
GC_{24hs} 5	308	310	285
GC_{24hs} 6	324	300	273
GC_{24hs} 7	331	316	292
GC_{24hs} 8	320	309	284
GC_{24hs} 9	325	315	290
GC_{24hs} 10	344	331	310
GC_{7d}			
GC_{7d} 1	328	329	348
GC_{7d} 2	332	336	328
GC_{7d} 3	304	306	291
GC_{7d} 4	315	321	348
GC_{7d} 5	331	344	318
GC_{7d} 6	330	341	347
GC_{7d} 7	333	332	330
GC_{7d} 8	309	308	310
GC_{7d} 9	339	340	338
GC_{7d} 10	325	330	324

APÊNDICE II

**DADOS DOS PESOS DOS ANIMAIS NOS GRUPOS 5-FLUOROURACIL
(GF_{24hs} e GF_{7d})**

	Peso em gramas		
	Inicial	Hepatectomia	Sacrifício
Animal			
GF_{24hs} 1	344	340	323
GF_{24hs} 2	302	300	272
GF_{24hs} 3	313	313	285
GF_{24hs} 4	332	327	310
GF_{24hs} 5	310	302	280
GF_{24hs} 6	314	310	289
GF_{24hs} 7	293	293	273
GF_{24hs} 8	328	327	301
GF_{24hs} 9	332	328	302
GF_{24hs} 10	338	327	309
GF_{7d} 1	317	325	318
GF_{7d} 2	343	351	349
GF_{7d} 3	340	342	342
GF_{7d} 4	326	327	328
GF_{7d} 5	324	322	318
GF_{7d} 6	330	332	328
GF_{7d} 7	343	348	341
GF_{7d} 8	318	315	312
GF_{7d} 9	348	347	334
GF_{7d} 10	301	302	301

APÊNDICE III

DADOS DOS PESOS DOS ESPÉCIMES NO GRUPO CONTROLE (GC_{24hs} E GC_{7d})

	Peso em gramas	
	Explante 70%	Sacrifício
Animal		
GC_{24hs} 1	8,3	7,9
GC_{24hs} 2	9,1	9,5
GC_{24hs} 3	8,3	8,1
GC_{24hs} 4	8,5	8,9
GC_{24hs} 5	8,3	8,4
GC_{24hs} 6	7,3	7,5
GC_{24hs} 7	8,2	8,9
GC_{24hs} 8	8,1	8,9
GC_{24hs} 9	7,6	9,2
GC_{24hs} 10	9,5	9,2
GC_{7d} 1	8,8	8,8
GC_{7d} 2	10,2	10,2
GC_{7d} 3	8,1	8,1
GC_{7d} 4	9,4	9,4
GC_{7d} 5	10	10
GC_{7d} 6	10,1	10,1
GC_{7d} 7	8,9	8,9
GC_{7d} 8	7,8	7,8
GC_{7d} 9	10,1	10,1
GC_{7d} 10	9,2	9,2

Explante 70% = hepatectomia 70%

APÊNDICE IV

DADOS DOS PESOS(G) DOS ESPÉCIMES NO GRUPO 5-FLUOROURACIL (GF_{24hs} E GC_{7d})

	Peso em gramas	
	Explante 70%	Sacrifício
Animal		
GF_{24hs} 1	9,1	9,1
GF_{24hs} 2	8,1	8,1
GF_{24hs} 3	9,2	9,2
GF_{24hs} 4	9,9	9,9
GF_{24hs} 5	8,6	8,6
GF_{24hs} 6	8,7	8,7
GF_{24hs} 7	7,8	7,8
GF_{24hs} 8	9,4	9,4
GF_{24hs} 9	9,3	9,3
GF_{24hs} 10	10,3	10,3
GF_{7d} 1	10	10
GF_{7d} 2	10,1	10,1
GF_{7d} 3	9,6	9,6
GF_{7d} 4	9,9	9,9
GF_{7d} 5	9,9	9,9
GF_{7d} 6	9,7	9,7
GF_{7d} 7	9,5	9,5
GF_{7d} 8	8,5	8,5
GF_{7d} 9	10,1	10,1
GF_{7d} 10	9,12	9,12

Explante 70%=Hepatectomia 70%

APÊNDICE V

DADOS DOS DIFERENTES MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DE REGENERAÇÃO HEPÁTICA NOS GRUPOS CONTROLE (GC_{24hs} E GC_{7d})

Animal	Fórmula de Kwon	Índice Mitótico	Ki-67	PCNA
GC _{24hs} 1	72	2	7	60
GC _{24hs} 2	76	7	0	50
GC _{24hs} 3	73	3	1	55
GC _{24hs} 4	80	1	15	60
GC _{24hs} 5	77	3	30	60
GC _{24hs} 6	79	2	60	60
GC _{24hs} 7	82	4	60	50
GC _{24hs} 8	83	2	30	60
GC _{24hs} 9	92	5	57	47
GC _{24hs} 10	72	12	55	40
GC _{7d} 1	97	0	5	80
GC _{7d} 2	94	0	5	90
GC _{7d} 3	117	0	7	80
GC _{7d} 4	100	0	6	90
GC _{7d} 5	108	0	2	90
GC _{7d} 6	99	0	3	95
GC _{7d} 7	98	0	8	83
GC _{7d} 8	128	0	--	80
GC _{7d} 9	106	0	10	80
GC _{7d} 10	110	0	15	80

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

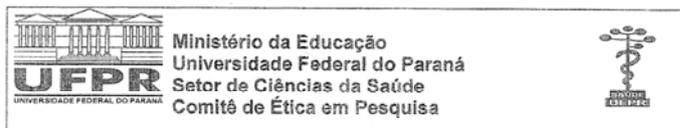
APÊNDICE VI

**DADOS DOS DIFERENTES MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DE
REGENERAÇÃO HEPÁTICA NOS GRUPOS 5-FLUOROURACIL
(GF_{24hs} E GF_{7d})**

Animal	Fórmula de Kwon	Índice Mitótico	Ki-67	PCNA
GF _{24hs} 1	63	0	20	40
GF _{24hs} 2	67	0	17	50
GF _{24hs} 3	68	0	13	47
GF _{24hs} 4	57	0	10	40
GF _{24hs} 5	58	18	20	30
GF _{24hs} 6	57	4	27	51
GF _{24hs} 7	60	10	12	57
GF _{24hs} 8	56	2	30	30
GF _{24hs} 9	62	2	30	40
GF _{24hs} 10	54	7	50	60
GF _{7d} 1	80	0	1	60
GF _{7d} 2	81	0	1	30
GF _{7d} 3	84	0	5	60
GF _{7d} 4	92	0	5	40
GF _{7d} 5	93	0	0	42
GF _{7d} 6	98	0	1	60
GF _{7d} 7	105	0	0	45
GF _{7d} 8	108	0	0	55
GF _{7d} 9	96	0	3	50
GF _{7d} 10	90	0	1	47

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

ANEXOS

ANEXO 1 - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO SETOR
DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DA UFPR

Curitiba, 25 de janeiro de 2010.

Ilmo (a) Sr. (a)
Marciano Anghinoni
Nesta

Prezado(a) Pesquisador(a),

Comunicamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "Efeito da quimioterapia neoadjuvante na regeneração hepática após hepatectomia extensa: estudo experimental em ratos" está de acordo com as normas éticas orientadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR, em reunião realizada no dia 9 de dezembro de 2009 e apresentou pendência(s). Pendência(s) apresentada(s), documento(s) analisado(s) e projeto aprovado em 22 de janeiro de 2010.

Registro CEP/SD: AN.021.004.09.12

Solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos.

Data para entrega do relatório final ou parcial: 22/07/2010.

Atenciosamente

Prof.ª Dr.ª Lillian Maria Labronici
Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde

**ANEXO 2 - COMPOSIÇÃO DA RAÇÃO BALANCEADA FORNECIDA
AOS RATOS (NUVILAB CR1[®])**

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

Fonte: Nuvital Nutrientes, Colombo, PR, Brasil