

HEPATECTOMIA PARCIAL: ESTUDO DA RESPOSTA PROLIFERATIVA

PARCIAL HEPATECTOMY: THE STUDY OF THE PROLIFERATIVE RESPONSE

Ana Lourdes da Silva Machado

Rosilene Fernandes da Rocha

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos - UNESP

Rita de Cassia Stocco dos Santos

Laboratório de Genética - Instituto Butantam

Departamento de Biologia da Universidade de Taubaté

RESUMO

A proliferação de hepatócitos ocorre em várias situações tais como hepatite viral, reações hepatotóxicas e cirrose, mas pode ser induzida experimentalmente em animais por agentes químicos ou vírus, que causam morte celular. Nesta revisão, a resposta proliferativa foi estudada após hepatectomia parcial. Anticorpos monoclonais têm sido empregados contra antígenos associados à proliferação. Esses antígenos são proteínas associadas ao ciclo celular e os marcadores proliferativos mais utilizados. Neste estudo, incluem-se o Antígeno Nuclear de Proliferação Celular (PCNA) e o Bromodeoxiuridina (BrdU). Inúmeras substâncias endócrinas, parácrinas e autócrinas estão envolvidas na regeneração hepática, como os Fatores de Crescimento e Citocinas. Para quantificar o RNAm desses e de outros genes e o cDNA, as técnicas utilizadas pelos autores foram o Northern blotting e a Transcrição Reversa da Reação em Cadeia de Polimerase (RT-PCR), respectivamente. Recentemente, a transferência de genes estáveis através de retrovírus recombinantes, é um procedimento que pode ser realizado para compensar deficiências genéticas que afetam as funções do fígado.

PALVRAS-CHAVE: hepatectomia parcial; marcadores proliferativos; fatores de crescimento; citocinas

INTRODUÇÃO

O fígado é o maior tecido glandular do organismo, situado no quadrante superior direito da cavidade abdominal, abaixo do diafragma. É um órgão multifuncional e dentre suas principais funções destacam-se a síntese e a secreção protéica, a secreção biliar, a regulação dos níveis glicêmicos e a metabolização de drogas e carboidratos. Seu parênquima é constituído por hepatócitos, que perfazem cerca de 80% da população celular. São células altamente diferenciadas e estáveis, ou seja, apesar do baixo índice mitótico, entram em divisão celular mediante estímulo tanto de natureza física, quanto infecciosa, como tóxica. A lesão do parênquima hepático induzida por quaisquer estímulos desencadeia o processo de reparação, que começou ser elucidado com o advento da Biologia Molecular, cujas técnicas permitem maiores esclarecimentos dos eventos que promovem e controlam a divisão celular, tão importantes no prognóstico e patogênese das mais freqüentes doenças do órgão como hepatite, cirrose e hepatomas.

Baseada na importância de conhecer a proliferação celular na regeneração hepática frente à hepatectomia parcial, esta revisão divulga as mais recentes pesquisas a esse respeito, enfatizando os marcadores proliferativos mais utilizados e os principais fatores de crescimento e citocinas envolvidos no processo, bem como as principais técnicas utilizadas para detectá-los.

REVISÃO DA LITERATURA

Desde a antiguidade, já se conhecia o fenômeno da regeneração hepática através da Mitologia Grega. Como punição a Prometeu pelo roubo do segredo do fogo, posteriormente cedido aos humanos, Zeus, além de bani-lo, permitiu que diariamente um pássaro se alimentasse de seu fígado. Porém, durante a noite o órgão sofria o processo de regeneração, condenando-o ao sofrimento, pois todo o dia o pássaro dispunha de alimento. Esta história aguçou a curiosidade de muitos pesquisadores, motivando-os a estudar o fenômeno por muitos anos.

Experimentalmente, o modelo mais empregado até hoje no estudo da regeneração hepática baseia-se em Higgins e Anderson (1931), que após removerem 70% do fígado de ratos *Wistar*, observaram que o órgão voltava ao seu tamanho original no período de 14 a 21 dias. Após a hepatectomia parcial, os lóbulos residuais cresciam rapidamente até que o volume equivalesse ao de antes e, então, abruptamente, o crescimento cessava.

Hepatectomia parcial

Em ratos, o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), a incorporação da timidina 3H ao DNA e a atividade da timidina quinase segundo Theocharis et al., 1994, exibiram marcações que oscilaram durante o processo de regeneração. Já a expressão gênica do fator de crescimento epidérmico que se liga à heparina (HB-EGF) detectada 6 horas após a cirurgia, foi evidenciada por Northern hybridization. Porém, somente através da transcrição reversa da reação em cadeia de polimerase (RT-PCR), os autores verificaram que o tal fator fora produzido pelas células de Kupffer e células endoteliais com ausência total da expressão em hepatócitos (Kiso et al., 1995). Em outro experimento, as expressões dos genes das ciclinas D1 e D3 foram detectadas pela análise do Northern blot hybridization 12 e 36 horas após a cirurgia respectivamente (SUN et al., 1996). Através da RT-PCR, os níveis de ácido ribonucleico mensageiro (RNAm) das ciclinas, timidina quinase e fatores de crescimento aumentaram após 12 horas nos animais com 60% de hepatectomia. Em 80% de hepatectomia, os níveis de RNAm, ciclinas, timidina quinase e fatores de crescimento apresentaram um pico de aumento no segundo dia e nos animais que sofreram 30% de hepatectomia, o aumento foi lento e progressivo entre o segundo e sexto dia após a cirurgia. Os picos de aumento nos níveis de RNAm, do fator de crescimento do hepatócito (HGF) para 30%, 60% e 80% de hepatectomia foram respectivamente 24, 6 e 12 horas e para o fator de crescimento transformante alfa (TGF- α), os picos ficaram na mesma ordem, 144, 24 e 48 horas (MASSON et al., 1999a). Leucócitos oriundos do baço, timo e fígado foram analisados pela citometria de fluxo e pela detecção das expressões do RNAm das citocinas pela RT-PCR. No fígado, o RNAm para o interferon gama (INF-g) diminuiu após um dia da cirurgia, e as interleucinas dois e quatro (IL-2 e 4) não foram detectadas independente da hepatectomia. Todas as citocinas no baço aumentaram suas expressões na fase inicial do processo, contudo, no timo, somente a IL-4 aumentou, ficando diminuídas as expressões da IL-2 e INF-g (SATO et al., 1999). A hepatectomia realizada em fígado esteatótico mostrou que os RNAm para os genes de expressão imediata (IGE) analisados por Northern blot hybridization ficaram evidentes uma hora após procedimento cirúrgico. Porém, nos órgãos que não apresentavam a esteatose, a marcação desses genes já se fazia presente em 30 minutos, com restauração do órgão por volta de 1 semana. Já nos animais cujo fígado apresentava inclusões gordurosas, o peso do órgão restaurou-se no dobro do tempo (TSUCHIYA et al., 2000). Camundongos hepatectomizados que tiveram seus genes deletados para o fator de necrose tumoral (TNF) não apresentaram diferenças na regeneração avaliada tanto pela incorporação do bromodeoxiuridina (BrdU) quanto pelo índice mitótico nos hepatócitos. Porém a atividade da mieloperoxidase demonstrada tanto no fígado quanto nos pulmões foi significativamente maior no grupo de animais que não tiveram seus genes deletados (Fujita et al., 2001). Em ratos, a expressão do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) prevaleceu nos hepatócitos das regiões portal alcançando o máximo entre 48 e 72 horas, sendo verificada não só pela imunohistoquímica como pela hibridização in situ. A atividade proliferativa das células endoteliais, utilizando um marcador proliferativo, o Ki-67, mostrou maior atividade nos espaços-porta alcançando o máximo em 72 horas. Com a inibição do VEGF houve redução significativa na proliferação tanto dos hepatócitos quanto das células endoteliais entre 48 e 96 horas após cirurgia (TANIGUCHI et al., 2001).

Hepatectomia parcial versus sialoadenectomia versus esplenectomia

Duas semanas antes da hepatectomia parcial, camundongos que sofreram sialoadenectomia mostraram pico na síntese do Ácido Desoxirribonucléico (DNA) 84 horas após cirurgia, enquanto nos animais-controle, o pico foi atingido em 48 horas monitorado pelo iododeoxiuridina (I^{125}). Sete dias após a hepatectomia, não houve diferença no conteúdo do Ácido Ribonucléico (RNA) determinado por Dot-blot hibridization em ambos os grupos e o fígado já havia readquirido peso original em ambos os casos (NOGUCHI; OHDA; OKA, 1991). Na presença das glândulas salivares, a síntese do RNAm para o gene c-myc, já se fazia presente 15 minutos após a hepatectomia, ao passo que sem elas, somente 2 a 4 horas depois, com diminuição drástica da incorporação da timidina ao DNA. Doze dias após a hepatectomia, 89% do peso do órgão já havia se restaurado nos animais não sialoadenectomizados, contra 55% nos grupos em que havia ausência das glândulas (JONES JUNIOR et al., 1995). A esplenectomia sofrida por ratos uma semana antes da hepatectomia aumentou a síntese de DNA marcado pelo bromodeoxiuridina (BrDU) e analisado por imunohistoquímica. O peso do fígado nos animais sem baço aumentou após 24 horas, com crescimento da atividade do fator de crescimento do hepatócito (HGF), no entanto, não mostrou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos de animais estudados (TOMIKAWA et al., 1996). Foi comprovada redução na atividade da timidina quinase, no PCNA e no índice mitótico após hepatectomia em ratos que sofreram a sialoadenectomia, porém não foi inibida a expressão inicial dos genes c-jun, c-fos e c-my (LAMBOTTE et al., 1997). Em ratos que tiveram as células de Kupffer extirpadas e que sofreram esplenectomia uma semana antes da hepatectomia, a síntese de DNA nos hepatócitos foi significativamente diminuída, assim como o peso do restante do órgão. As expressões do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), do fator de crescimento do hepatócito (HGF) e do fator de crescimento transformante beta (TGF- β) encontraram-se diminuídas, com ausência nas expressões das interleucinas 6 (IL-6) e 10 (IL-10). Todos os RNAm foram avaliados pela RT-PCR. (MEIJER et al., 2000).

Hepatectomia parcial versus tratamento

Para comparar a atividade de transcrição do ácido ribonucléico ribossômico (RNAr), os hepatócitos de ratos foram estimulados pelo cortisol e pela hepatectomia. Nos dois procedimentos, a síntese de RNAr aumentou 2 e 4 vezes respectivamente, porém a quantidade de nucleolina e da proteína B23 só aumentou nos hepatócitos dos animais que sofreram a hepatectomia. Ambas as proteínas foram detectadas pelo método Imunoblotting e as regiões organizadoras nucleolares foram detectadas utilizando a prata (AgNOR) (DERENZINI et al., 1995). Os efeitos da ciclosporina e somatostatina na regeneração hepática de ratos foram analisados não só pelo número de regiões organizadoras nucleolares com a prata (AgNOR), mas também pelo índice mitótico, pelas células binucleadas e núcleos hiper cromáticos. Os resultados não foram alterados na presença da ciclosporina, porém com a somatostatina houve inibição da proliferação de hepatócitos. (KAPAN et al., 1996). O pré-tratamento pelo cádmio também reprimiu a capacidade regenerativa dos hepatócitos, avaliada pela incorporação da timidina ao DNA, pelo índice mitótico, expressão do PCNA e pela atividade da timidina quinase, restaurada após tratamento com substância estimuladora de hepatócito (HSS) (THEOCHARIS et al., 1996). Em camundongos não sensíveis ao lipopolissacarídeo (LPS), o peso do fígado regenerado foi menor em relação aos animais sensíveis; inclusive o número de hepatócitos marcados pelo antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) foi 20% menor. Pelo teste de ELISA, o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) sérico teve um pequeno aumento nos animais sensíveis, com dois picos (14 e 48 horas) da interleucina seis (IL-6) contra um (24 horas) nos animais resistentes. Com a supressão das células de Kupffer e do TNF- α em camundongos sensíveis, as concentrações tanto de TNF- α quanto de IL-6 ficaram reduzidas, assim como o índice de PCNA nos hepatócitos. (SHIRATORI et al., 1996). Já em ratos não sensíveis, a deleção das células de Kupffer, após hepatectomia, ocasionou acentuada expressão do RNAm para o fator de necrose tumoral (TNF) e para as interleucinas um e seis (IL-1 e 6) analisados por Northern blotting. As citocinas inibidas pelo TNF, como o fator de crescimento transformante beta (TGF- β), permaneceram inalteradas e a interleucina dez (IL-10) não se expressou (RAI et al., 1997). Analisando o uso da pilocarpina administrada meia hora antes da hepatectomia parcial, os animais demonstraram grande perda de peso do órgão no primeiro dia com recuperação do mesmo ao final do segundo dia. (KALIL; SPERB;

LICHTENFELS, 1998). O ácido fólico inibiu a atividade do timidilato sintase (TS) e da timidina quinase (TK) 24 horas após hepatectomia em ratos, analisadas por Northern blotting, que registrou atraso na elevação dos níveis de RNAm tanto de uma proteína quanto da outra, porém no período de 48 a 72 horas por Immunoblotting, a atividade do TS aumentou, enquanto da TK foi similar aos animais controle (KOMATSU; TSUKAMOTO, 1998). Em ratos cirróticos que sofreram hepatectomia, a análise quantitativa de RNAm usando RT-PCR em células não parenquimatosas (NPC) não mostrou diferenças na expressão gênica para o fator de crescimento de hepatócitos (HGF) durante o tempo observado. Já as expressões gênicas para a interleucina seis (IL-6) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) ficaram bem abaixo das observadas nos animais que não desenvolveram cirrose, no entanto, a interleucina um (IL-1) permaneceu elevada entre o segundo e terceiro dia (MASSON et al., 1999b). A nutrição parenteral suplementada por glutamina 2% por 24 horas após hepatectomia em cães, promoveu aumento significativo na regeneração hepática, pois o índice de regeneração, (mensurado por células que se encontravam na fase S do ciclo celular) a regeneração morfológica e o peso final do fígado restante, demonstraram correlação após quatro semanas. (ITO; HIGASHIGUCHI, 1999). Ratos parcialmente hepatectomizados em uso de histamina exógena tiveram na contagem de mitoses após 36 horas, praticamente o dobro no número de figuras mitóticas em relação àquelas encontradas nos animais-controle. Após sete dias, a contagem foi semelhante entre os grupos, com igualdade no peso entre as massas hepáticas (BIONDO-SIMÕES et al., 2000). A administração do fenoxibenzamina, oito horas após a hepatectomia parcial em ratos, promoveu aumento plasmático da caspase-3 (protease associada à apoptose), com pico registrado três horas antes que nos animais não tratados. (HAYAMI et al., 2000). O número de células estreladas marcadas para a-actina de músculo liso encontrou-se diminuído em animais nos quais foi administrado lisinopril e aumentado com o uso de bradiginina e losartan (RAMALHO et al., 2000). Animais com deficiência na interleucina seis (IL-6) que sofreram hepatectomia, mostraram na presença do nafenopin (proliferador de peroxissomo) resultados semelhantes àqueles encontrados em camundongos selvagens, inclusive no peso do órgão (WALLENIUS; WALLENIUS; JANSSON, 2000). O uso da citocina sintética "Hyper IL-6" em camundongos, após 50% de hepatectomia, acelerou a regeneração hepática detectada pelo aumento na marcação do bromodeoxiuridina (BrdU) e no peso dos órgãos analisados nos períodos de 36 e 72 horas (PETERS et al., 2000). O inibidor da bradiginina (quinase II) foi administrado antes e após a hepatectomia em ratos e a proliferação celular avaliada pelo PCNA, foi três vezes maior nas primeiras 12 horas nos animais tratados. Após 120 horas, as diferenças entre os grupos não foram estatisticamente significantes (RAMALHO et al., 2001). Camundongos submetidos a quatro doses consecutivas de anticorpo (JO2) contra a Fas/CD95, receberam, via intravenosa, retrovírus recombinantes, os quais codificavam b-galactosidase (b-gal) de *Escherichia coli*. Histologicamente, a proporção de núcleos positivos para bromodeoxiuridina (BrdU) e expressando a b-gal foi maior nos animais que receberam o anticorpo do que aqueles que sofreram apenas hepatectomia (GUIDOTTI et al., 2001).

DISCUSSÃO

A proliferação de hepatócitos ocorre em várias situações patológicas como hepatite viral, reações hepatotóxicas e cirrose e pode ser induzida experimentalmente em animais por agentes químicos ou virais causando morte celular ou por hepatectomia parcial. No início dos anos trinta, Higgins e Anderson (1931) descreveram um modelo experimental de regeneração hepática em ratos Wistar após ressecção parcial do órgão, induzindo uma resposta proliferativa. Esse procedimento foi utilizado por todos os autores consultados nesta revisão de literatura. Diferentes métodos têm sido usados para detectar proliferação celular em vários tecidos, fornecendo informações importantes a respeito do crescimento, transformação e reparação teciduais.

Injeções de moléculas radioativas seguidas por auto-radiografia foram utilizadas na incorporação do material genético. A técnica da timidina tritiada (3H TdR) foi realizada nos estudos de Theocharis et al. (1994), detectando aumento na síntese de DNA, porém, em 1996, a mesma equipe observou menor síntese de DNA, devido ao pré-tratamento pelo cádmio em ratos. Jones Junior et al. (1995), como os autores anteriores, também mostraram diminuição acentuada na síntese de DNA na ausência de glândulas salivares, assim como em animais que apresentaram deficiência na interleucina seis (IL-6) mostrado por Wallenius, Wallenius e Jansson et al. (2000).

A incorporação do bromodeoxiuridina (BrdU) ao DNA dos hepatócitos, seguida pela imunocitoquímica usando anticorpos anti-BrdU, foi destaque nos estudos de Tomikawa et al. (1996), cujos animais esplenectomizados apresentaram aumento na síntese de DNA. Corroborando esses resultados, Peters et al., (2000), utilizando uma citocina sintética produzida por eles mesmos em estudos anteriores, a "Hyper"IL-6, composta não só de IL-6, mas acrescida de seus receptores e, portanto, acentuando sua potência, favoreceu o processo regenerativo. Também foram vistos núcleos marcados em Guidotti et al. (2001), na presença de retrovírus recombinantes. Em contrapartida, Fujita et al., (2001) não presenciaram diferenças na síntese de DNA em camundongos que tiveram o gene para o fator de necrose tumoral (TNF) deletado, porém a atividade da mieloperoxidase foi maior nos animais selvagens, demonstrando que o gene deletado não interferiu na regeneração hepática, mas suprimiu a ativação neutrofílica podendo possivelmente prejudicar a resposta imune do animal.

O método imunohistoquímico pelo uso de anticorpos monoclonais específicos, como o PC-10, para o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) foi outro recurso utilizado por alguns autores em busca da visualização da proliferação celular. Em Theocharis et al. (1994), as marcações oscilaram durante o processo regenerativo e, em 1996, as marcações com PCNA encontraram-se reduzidas após pré-tratamento com cádmio. Também nos trabalhos de Shiratori et al. (1996), houve redução na expressão do PCNA observada em camundongos sensíveis ao lipopolissacarídeo (LPS) que tiveram as células de Kupffer e o fator de necrose tumoral (TNF) suprimidos. Contrastando com os demais, Ramalho et al. (2001), observaram que o uso da quinase II, um potente inibidor da bradicinina, favoreceu o aumento em duas a três vezes das marcações encontradas nos hepatócitos dos animais-controle. Diferentemente dos demais, Taniguchi et al. (2001) utilizaram como marcador proliferativo o Ki-67 para visualizarem o aumento das células endoteliais.

A timidina quinase é uma enzima responsável pela fosforilação da timidina e por sua incorporação subsequente ao DNA de células em proliferação. Nos trabalhos de Theocharis et al. (1996) houve redução de atividade enzimática na presença de cádmio; o mesmo constatado por Lambotte et al. (1997), na ausência das glândulas salivares maiores e por Komatsu e Tsukamoto (1998), pelo uso do ácido fólico. Variações nos níveis de RNAm da timidina quinase, quantificados pela transcrição reversa na reação em cadeia de polimerase (RT-PCR) foram alvo de estudos em Masson et al., (1999a). Essas variações foram detectadas em extensões variadas de hepatectomia, onde os autores mostraram que em 60% de hepatectomia, os níveis se expressaram 12 horas após a cirurgia; em 80%, o pico ocorreu em 48 horas, em 30%, o aumento foi lento e progressivo indo do segundo ao sexto dia, mostrando que a resposta regenerativa é dependente da extensão da ressecção do órgão. Talvez em dano menor, os sinais para o início da reparação ocorram mais lentamente em relação à maior destruição tecidual, visto que a atividade da timidina quinase se expressou mais tardiamente.

As ciclinas são proteínas que regulam a progressão do ciclo celular, dentre as quais encontram-se as do tipo D, importantes no controle da transcrição entre as fases G1 e S do ciclo celular. Nos achados de Sun et al. (1996), os genes expressados foram detectados por Northern blot hibridization. Em Masson et al., (1999), a existência de RNAm de ciclinas foi comprovada pela transcrição reversa em cadeia de polimerase (RT-PCR).

O índice mitótico é outro método que avalia a proliferação celular, onde fragmentos teciduais são submetidos à técnica histológica convencional sob coloração rotineira (Hematoxilina / Eosina - H.E.) e com auxílio do microscópio de luz, faz-se a contagem em campos diferentes de figuras de mitoses. Em hepatócitos, Kapan et al., (1996) observaram redução no índice mitótico pela administração de somatostatina, assim como Theocharis et al., (1996), na presença do cádmio e Lambotte et al., (1997), na ausência das glândulas salivares maiores. No entanto, Ito e Higashiguchi (1999) correlacionaram índice mitótico com morfologia e peso do órgão após quatro semanas na presença da glutamina 2% por 24 horas após procedimento cirúrgico em cães sendo que Biondo-Simões et al. (2000), após 36 horas com histamina exógena, observaram o dobro no número das figuras de mitoses em ratos.

A impregnação da prata em regiões organizadoras nucleolares (AgNOR) é uma histoquímica que pode ser empregada em tecidos que se encontram em proliferação, quantificando estas regiões. O nucléolo é uma estrutura rica em ácido ribonucléico e proteínas. Células com intensa atividade proliferativa contêm vários nucléolos, indicando uma possível analogia entre o número de NORs presentes no núcleo e a atividade proliferativa das células, embora Derenzini et al. (1995) tivessem observado aumento na quantidade de nucleolina e a proteína B23 somente nos hepatócitos dos animais que sofreram hepatectomia e não nos animais

cuja resposta proliferativa fora induzida pelo cortisol. Na presença da somatostatina, Kapan et al. (1996) demonstraram quantidade de NORs diminuída, o que não aconteceu com o uso da ciclosporina.

Para localizar genes, alguns autores como Kiso et al. (1995), Jones Junior et al. (1995), Sun et al. (1996), Rai et al. (1997), e Tsuchiya et al. (2000) utilizaram Northern blotting, cuja técnica consiste na transferência de RNA de um gel de agarose para um filtro de nitrocelulose que pode ser hibridizado ao DNA complementar (cDNA), comprovando ou não a presença de genes. Níveis de RNAm quantificados pela transcrição reversa da reação em cadeia de polimerase (RT-PCR), constaram nos resultados de Kiso et al. (1995), Masson et al. (1999a-b), Sato et al. (1999), Meijer et al. (2000). A hibridização *in situ*, cujo pareamento do RNA complementar à fita de DNA forma um híbrido, foi um dos artifícios técnicos realizados por Taniguchi et al. (2001). Os proto-oncogenes *c-myc*, *c-fos* e *c-jun* são genes precocemente identificados logo após a hepatectomia, contudo nos estudos de Noguchi et al. (1991) na sialoadenectomia, a síntese de RNAm do *c-myc* passou de 15 minutos para 3 horas após a cirurgia. Em Lambotte et al. (1997) não houve inibição inicial dos genes, porém não foi levado em consideração o tempo de expressão como no caso anterior. Com esteatose gordurosa, Taniguchi et al. (2001) verificaram atraso na expressão gênica, com o dobro do tempo na restauração do peso do órgão em relação ao fígado saudável.

Numerosas substâncias têm a propriedade de controlar a taxa de divisão celular e algumas das mais importantes são os fatores de crescimento. Estes são polipeptídeos com efeito autócrino, parácrino ou endócrino, produzidos por diferentes tipos celulares.

O fator de crescimento epidérmico (EGF) é potente mitogênico para hepatócitos, isolado inicialmente de glândulas salivares de ratos. Portanto, nos achados de Noguchi, Ohda e Oka (1991), Jones et al. (1995) e Lambotte et al. (1997), em animais que sofreram sialoadenectomia, a síntese de DNA foi diminuída. Contrastando com esses resultados, animais que sofreram esplenectomia apresentaram maior síntese de DNA com peso do órgão aumentado nos estudos de Tomikawa et al. (1996). Em Kiso et al. (1995), o fator de crescimento epidérmico ligado a heparina (HB-EGF) foi detectado seis horas após a hepatectomia e isolado exclusivamente de células não parenquimatosas como as células de Kupffer e as endoteliais, mostrando efeito parácrino sobre os hepatócitos

O fator de crescimento de hepatócitos (HGF), purificado de plaquetas de ratos encontrou-se aumentado no trabalho de Tomikawa et al. (1996), concordando com os achados de Masson et al. (1999) em extensões variadas de hepatectomia, contudo na cirrose induzida pelo tetracloreto de carbono (CCL₄), os autores não detectaram diferenças nas expressões do HGF pelas células não parenquimatosas (NPC), demonstrando que independente do estímulo há expressão do fator de crescimento.

O fator de crescimento transformante (TGF) isolado inicialmente de cultura de células de sarcoma é capaz de induzir células de cultura ao crescimento, independente de ancoragem. Em Masson et al. (1999) apesar de várias ressecções do fígado, o TGF- foi detectado com picos de aumento diferentes dependendo da porcentagem de hepatectomia que o órgão tinha sofrido. A expressão de TGF- na ausência das células de Kupffer permaneceu inalterada em Rai et al. (1997) e diminuída no experimento de esplenectomia por Meijer et al. (2000). O TGF- pode ter função primordial no controle da resposta proliferativa após hepatectomia parcial, induzindo, por exemplo, apoptose, que remodela a produção exagerada de hepatócitos, sinalizando o fim do processo.

O fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) favoreceu a proliferação das células endoteliais e de hepatócitos, pois quando os autores Taniguchi et al. (2001) inibiram-no, verificaram uma redução significativa na proliferação não só do parênquima, mas também das próprias células endoteliais.

As citocinas, substâncias liberadas por diversos tipos celulares, influenciam tanto a proliferação quanto a inibição celular e também apresentam efeito autócrino, parácrino e endócrino como os fatores de crescimento. Nos estudos de Sato et al. (1999), a expressão gênica de interferon gama (INF-) e interleucina dois (IL-2) encontraram-se diminuídas, porém a interleucina quatro (IL-4) foi aumentada. Em Shiratori et al. (1996), camundongos não sensíveis a lipopolissacarídeos (LPS), tiveram picos de interleucina seis (IL-6). Já em camundongos sensíveis que tiveram as células de Kupffer e o fator de necrose tumoral deletados houve redução. Super expressão de IL-1 e IL-6 foi observada nos estudos de Rai et al. (1997) com IL-10 inalterada, também na falta das células de Kupffer, assim como nos autores anteriormente citados. Ao contrário, nos estudos de Masson et al. (1999b), as expressões gênicas da IL-6 ficaram bem abaixo nos animais que apresentaram cirrose, porém a IL-1 permaneceu elevada entre o segundo e terceiro dias. Meijer et al. (2000) obtiveram ausência tanto da IL-6

quanto da IL-10 em ratos esplenectomizados, mesmo na falta das células de Kupffer. Nesses animais a expressão gênica do TNF teve diminuição, assim como em animais que apresentaram cirrose no trabalho de Masson et al. (1999b), contrastando com Shiratori et al. (1996) e Rai et al. (1997), que observaram expressões aumentadas.

É importante avaliar a função da apoptose durante a regeneração hepática, pois a atividade da caspase-3 expressou-se durante a resposta proliferativa, como mostrou Hayami et al. (2000) que na presença do fenoxibenzamina, um potente inibidor de síntese de DNA, a expressão da protease ocorreu mais cedo, desfavorecendo a regeneração. Talvez a apoptose aconteça para prevenir a resposta excessiva do fígado. Guidotti et al. (2001), administrando anticorpos contra uma via de apoptose (Fas/CD95) aos animais, observaram exacerbação da incorporação do retrovírus recombinante ao genoma das células parenquimatosas, demonstrando que através dessa metodologia existe possibilidade de incorporação de genes sem necessidade de grandes intervenções cirúrgicas.

CONCLUSÕES

De acordo com o levantamento bibliográfico existem métodos que podem ser utilizados na identificação de tecidos em proliferação como os marcadores proliferativos que se incorporam ao DNA e que são identificados pela auto-radiografia. Existem também os estudos imunohistoquímicos utilizando anticorpos, como o PC-10 que marca o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), o índice mitótico que quantifica figuras de mitoses e a impregnação pela prata evidenciando regiões organizadoras nucleolares - AgNOR.

Para quantificar RNAm e cDNA de genes envolvidos na resposta proliferativa frente a hepatectomia parcial, foram utilizadas técnicas Northern blotting e Transcrição Reversa da Reação em Cadeia de Polimerase (RT-PCR) respectivamente.

As células de Kupffer e as células endoteliais são importantes na proliferação do parênquima do órgão por liberarem substâncias como fatores de crescimento e citocinas de efeitos endócrino, parácrino e autócrino, que induzem os hepatócitos a saírem da quiescência e entrarem no ciclo celular.

As primeiras horas, após a hepatectomia parcial, são muito importantes na recuperação do peso do órgão, pois esse período é vulnerável a substâncias químicas que podem atrasar, acelerar ou mesmo inibir a resposta proliferativa.

É importante conservar órgãos como glândulas salivares maiores e baço, pois na ausência destes, as células hepáticas podem expressar genes capazes de alterar a resposta proliferativa. Outras circunstâncias como esteatose e cirrose também prejudicam a recuperação do órgão.

Os fatores de crescimento e as citocinas que se destacaram na resposta proliferativa após hepatectomia parcial, nesta revisão, foram: HGF, TGF- α , TGF- β , VEGF, TNF- α , INF- γ , IL-2, IL-4, IL-6 e IL-10.

O fígado é um órgão-alvo na terapia gênica por ser uma região de muitas alterações metabólicas. Ultimamente a transferência de genes estáveis aos hepatócitos pode compensar deficiências que afetam suas funções, utilizando vetores retrovirais capazes de se integrarem ao genoma promovendo efeito terapêutico a longo prazo, beneficiando os pacientes.

ABSTRACT

Hepatocyte proliferation occurs in various pathological situations such as viral hepatitis, hepatotoxic reactions and cirrhosis. It can also be induced experimentally in animals by chemical or viral agents causing cell death. In this review, the proliferative response was studied by partial hepatectomy. Monoclonal antibodies have been employed to proliferation-associated antigens. These antigens are cycle-associated proteins. In this study, Bromodoxyuridine (BrdU) and Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) are the most utilized of all proliferative markers. A number of endocrine, paracrine and autocrine factors have been implicated in liver regeneration, like Growth Factors and Cytokines. Northern blotting and Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) analysis were the most utilized for mRNA and cDNA quantification, respectively. Recently, the stable genes transference into hepatocytes has been proposed to compensate genetic deficiencies that affect liver function. This strategy can be achieved using recombinant retroviral vectors.

KEY - WORDS: Parcial Hepatectomy; Proliferation Markers; Growth Factors; Cytokines

AGRADECIMENTO

A todos os professores do curso de Especialização em Biologia Molecular da Universidade de Taubaté – UNITAU, que souberam com muita paciência e competência transmitir seus conhecimentos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BIONDO-SIMÕES, M. L. P. et al. Efeito da histamina na regeneração hepática - estudo experimental em ratos. *Acta Cir. Bras.*, v. 15, n. 1, jan./mar. 2000.

DERENZINI, M. et al. Quantitative changes of the two major AgNOR proteins, nucleolin and protein B23, related to stimulation of rDNA transcription. *Exp. Cell Res.*, v. 219, n. 1, p. 276-282, 1995.

FUJITA, J. et al. Effect of TNF gene depletion on liver regeneration after partial hepatectomy in mice. *Surgery*, v. 129, n. 1, p. 48-54, 2001.

GUIDOTTI, J. E. et al. Fas/CD95 pathway induces mouse liver regeneration and allows for highly efficient retrovirus-mediated gene transfer. *Hepatology*, v. 33, n. 1, p.10-15, 2001.

HAYAMI, S. et al. Change in caspase-3 like protease in the liver regeneration following partial hepatectomy. *Biochem. Pharmacol.*, v. 60, n. 12, p. 1883-1886, 2000.

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.*, v. 12, p. 186-202, 1931.

ITO, A.; HIGASHIGUCHI, T. Effects of glutamine administration on liver regeneration following hepatectomy. *Nutrition*, v. 15, n. 1, p. 23-28, 1999.

JONES JUNIOR., D. E., et al. Epidermal growth factor secreted from the salivary gland is necessary for liver regeneration. *Am. J. Physiol.*, v. 268, n. 5, p. 872-878, 1995.

KALIL, A.N.; SPERB, D.; LICHTENFELS, E. Efeito da pilocarpina na regeneração hepática após hepatectomia parcial em ratos. *Acta Cir. Bras.*, v. 13, n. 4, p. 222-226, 1998.

KAPAN, M. et al. Effects of Cyclosporin and Somatostatin on liver regeneration after partial hepatectomy in rats. *Eur. Surg. Res.*, v. 28, n. 4, p. 262-269, 1996.

KISO, S. et al. Role of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor as hepatotrophic factor in rat liver regeneration after partial hepatectomy. *Hepatology*, v. 22, n. 5, p. 1584-1590, 1995.

KOMATSU, M.; TSUKAMATO, I. Effect of folic acid on thymidylate synthase and liver after partial hepatectomy. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1379, p. 289-296, 1998.

LAMBOTTE, L. et al. Effect of Sialoadenectomy and Epidermal growth factor administration on liver regeneration after partial hepatectomy. *Hepatology*, v. 25, n. 3, p. 607-612, 1997.

MASSON, S. et al. Differential regenerative response and expression of growth factors following hepatectomy of variable extent in rats. *Liver*, v. 19, n. 4, p. 312-317, 1999.

MASSON, S. et al. Changes in growth factor and cytokine mRNA levels after hepatectomy in rat with CCL₄ - induced cirrhosis. *Am. Physiol.*, v. 277, n. 4, p. 838-846, 1999.

MEIJER, C. et al. Kupffer cell depletion by Cl_2 MDP-liposomes alters hepatic cytokine expression and delays liver regeneration after partial hepatectomy. *Liver*, v. 20, n. 1, p. 66-77, 2000.

NOGUCHI, S.; OHDA, Y.; OKA, T. Influence of epidermal growth factor on liver regeneration after partial hepatectomy in mice. *J. Endocrinol.*, v. 128, n. 3, p. 425-431, 1991.

PETERS, M. et al. Combined interleukin 6 and soluble interleukin 6 receptor accelerates murine liver regeneration. *Gastroenterology*, v. 119, n. 6, p. 1663-1671, 2000.

RAI, R. M. et al. Kupffer cell depletion abolishes induction of interleukin-10 and permits sustained overexpression of tumor necrosis factor alpha messenger RNA in the regenerating rat liver. *Hepatology*, v. 25, n. 4, p. 889-95, 1997.

RAMALHO, F. S. et al. Efeito de agentes anti-hipertensivos sobre as células estreladas durante a regeneração hepática em ratos. *Acta Cir. Bras.*, v. 15, supl. 2, 2000.

RAMALHO, F. S. et al. Angiotensin-converting enzyme inhibition by lisinopril enhances liver regeneration in rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v. 34, n. 1, p. 125-7, 2001.

SATO, Y., et al. Intra and Extrahepatic leucocytes and cytokine mRNA expression during liver regeneration after partial hepatectomy in rats. *Dig. Dis. Scien.*, v. 44, n. 4, p. 806-816, 1999.

SHIRATORI, Y. et al. Role of macrophages in regeneration of liver. *Dig. Dis. Scien.*, v. 41, n. 10, p. 1939-1946, 1996

SUN, W. et al. Differential expression of D-Type G1 cyclins during mouse development and liver regeneration "in vivo". *Mol. Rep. Devel.*, v. 43, n. 4, p. 414-420, 1996.

TANIGUCHI, E. et al. Expression and role of vascular endothelial growth factor in liver regeneration after partial hepatectomy in rats. *J. Histochem. Cytochem.*, v. 49, n. 1, p. 121-129, 2001.

THEOCHARIS, S. E. et al. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression in regenerating rat liver after partial hepatectomy. *Dig. Dis. Scien.*, v. 39, n. 2, p. 245-252, 1994.

THEOCHARIS, S. E. et al. Hepatic Stimulator substance administration enhances regenerative capacity of hepatocytes in Cadmium-pretreated partially hepatectomized rats. *Dig. Dis. Scien.*, v. 41, n. 7, p. 1445-1480, 1996.

TOMIKAWA, M. et al. The role of the spleen, platelets, and plasma hepatocyte growth factor activity on hepatic regeneration in rats. *J. Am. Coll. Surg.*, v. 182, n. 1, p. 12-16, 1996.

TSUCHIYA, T. et al. Hepatic regeneration and ischemia/reperfusion injury. *Transpl. Proc.*, v. 32, n. 7, p. 2324, 2000.

WALLENIUS, V.; WALLENIUS, K.; JANSSON, J. O. Normal pharmacologically-induced, but decreased regeneration liver growth in interleukin-6-deficient (IL-6^{-/-}) mice. *J. Hepatol.*, v. 33, n. 6, p. 967-974, 2000.