

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO: CIÊNCIAS EM
GASTROENTEROLOGIA E HEPATOLOGIA

**TERAPIA CELULAR NA INSUFICIÊNCIA HEPÁTICA
AGUDA: ESTUDO EXPERIMENTAL COM CÉLULAS
MICROENCAPSULADAS**

CARLOS OSCAR KIELING

TESE DE DOUTORADO

Porto Alegre, Brasil
2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO: CIÊNCIAS EM
GASTROENTEROLOGIA E HEPATOLOGIA

**TERAPIA CELULAR NA INSUFICIÊNCIA HEPÁTICA
AGUDA: ESTUDO EXPERIMENTAL COM CÉLULAS
MICROENCAPSULADAS**

CARLOS OSCAR KIELING

**Orientadora: Prof^a. Dra. Themis Reverbel da Silveira
Coorientadora: Prof^a. Dra. Ursula da Silveira Matte**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação: Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul para obtenção de título de Doutor.

Porto Alegre, Brasil
2012

CIP - Catalogação na Publicação

Kieling, Carlos Oscar

Terapia celular na insuficiência hepática aguda:
estudo experimental com células microencapsuladas /
Carlos Oscar Kieling. -- 2012.

176 f.

Orientadora: Themis Reverbel da Silveira.

Coorientadora: Ursula da Silveira Matte.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-
Graduação em Ciências em Gastroenterologia, Porto
Alegre, BR-RS, 2012.

1. Insuficiência hepática aguda. 2. Terapia
celular. 3. Hepatectomia. 4. Ratos. I. Silveira,
Themis Reverbel da, orient. II. Matte, Ursula da
Silveira, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

“Insulta agora daqui os deuses, ó Prometeu. Rouba-lhes as honras divinas, para dá-las a seres que não viverão mais que um dia! Poderão, por acaso, os mortais, minorar teu suplício? Em vão te deram os deuses o nome de Prometeu... Tu, sim! – precisas de um Prometeu que te liberte!”

Prometeu acorrentado.

Ésquilo

“Ah, tem uma repetição, que sempre outras vezes em minha vida acontece. Eu atravesso as coisas – e no meio da travessia não vejo! – só estava era entretido na idéia dos lugares de saída e de chegada. Assaz o senhor sabe: a gente quer passar um rio a nado, e passa; mas vai dar na outra banda é num ponto muito mais em baixo, bem diverso do em que primeiro se pensou. Viver nem não é muito perigoso?”

Riobaldo em Grande Sertão: Veredas

João Guimarães Rosa

AGRADECIMENTOS

À minha família, pelo apoio e compreensão.

À minha orientadora e eterna professora, Profa. Dra. Themis Reverbel da Silveira, pelo seu entusiasmo incansável.

À minha coorientadora e amiga, Profa. Dra. Ursula da Silveira Matte, pelo brilhantismo, uma fonte inesgotável de idéias e sugestões.

Aos amigos Rafael Lucyk Maurer, Carolina Uribe Cruz, Ariane Nádia Backes, Mónica Luján López, Gustavo Ochs e Alessandro Bersch Osvaldt, essenciais para a concretização desse projeto.

Às equipes do Centro de Terapia Gênica, do Laboratório de Hepatologia e Gastroenterologia Experimental e do Laboratório de Patologia Experimental pela disponibilidade e auxílio.

À equipe da Unidade de Experimentação Animal, Marta Justina Giotti Cioato, Fabiola Schons Meyer e Eduardo Mottola Amaro da Silveira, pela preciosa colaboração durante os procedimentos experimentais.

À Profa. Dra. Luise Meurer e ao Prof. Dr. Carlos Thadeu Schmidt Cerski pelo auxílio na análise histopatológica.

Às Profa. Dra. Helena Ayako Sueno Goldani e Profa. Dra. Sandra Maria Gonçalves Vieira e aos colegas da Unidade de Gastroenterologia Pediátrica, Cristina Helena Targa Ferreira, Jorge Luiz dos Santos e Daltro Luiz Alves Nunes pelo apoio incondicional.

A todas as pessoas que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização desse projeto de pesquisa e dessa tese e que, involuntariamente, deixaram de ser nominadas.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	vii
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE QUADROS	xii
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xv
1. INTRODUÇÃO	2
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1. REGENERAÇÃO HEPÁTICA	5
2.1.1. Mecanismos envolvidos na regeneração hepática	7
2.1.2. Mecanismos de finalização da regeneração hepática	12
2.2. INSUFICIÊNCIA HEPÁTICA AGUDA.....	13
2.3. RESPOSTA INFLAMATÓRIA SISTÊMICA NA INSUFICIÊNCIA HEPÁTICA AGUDA	15
2.4. TERAPIA CELULAR NO TRATAMENTO DA INSUFICIÊNCIA HEPÁTICA AGUDA.....	17
2.4.1. Transplante de hepatócitos	18
2.4.2. Transplante de células da medula óssea	18
2.5. MODELOS EXPERIMENTAIS DE INSUFICIÊNCIA HEPÁTICA AGUDA	24
..	
2.6. ISOLAMENTO CELULAR EM MICROCÁPSULAS DE ALGINATO DE SÓDIO	27
3. JUSTIFICATIVA	30
4. OBJETIVOS	32
4.1. OBJETIVO GERAL	32
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
5. MATERIAL E MÉTODOS	34
5.1. ASPECTOS GERAIS	34
5.2. HIPÓTESES	34
5.3. DELINEAMENTO	35
5.3.1. Fator em estudo	35
5.3.2. Desfechos	35

5.3.3. Grupos de estudo	35
5.3.4. Desenhos de estudo	36
5.4. AMOSTRA E AMOSTRAGEM	36
5.4.1. Critérios de inclusão	36
5.4.2. Critérios de exclusão	36
5.4.3. Tamanho amostral	37
5.5. VARIÁVEIS	37
5.6. PROCEDIMENTOS	40
5.6.1. Animais	40
5.6.2. Células	42
5.6.3. Encapsulação das células em microcápsulas de alginato de sódio	43
5.6.4. Análise laboratorial	44
5.6.5. Avaliação histológica	44
5.7. LOGÍSTICA	44
5.8. TRATAMENTO ESTATÍSTICO	44
5.9. ASPECTOS ÉTICOS	45
6. RESULTADOS	48
6.1. FASE 1 - PADRONIZAÇÃO DE UM MODELO DE INSUFICIÊNCIA HEPÁTICA AGUDA POR HEPATECTOMIA PARCIAL EM RATOS	48
6.2. FASE 2 - AVALIAÇÃO DO EFEITO DE DIFERENTES TIPOS CELULARES NA SOBREVIDA DE RATOS SUBMETIDOS À HEPATECTOMIA DE 90%	53
6.3. FASE 3 - AVALIAÇÃO DO EFEITO PRECOCE DA TERAPIA CELULAR EM RATOS SUBMETIDOS À HEPATECTOMIA DE 90%	57
7. DISCUSSÃO	69
7.1. FASE 1 – MODELO DE INSUFICIÊNCIA HEPÁTICA AGUDA POR HEPATECTOMIA PARCIAL EM RATOS	69
7.2. FASE 2 – AVALIAÇÃO DO EFEITO DE DIFERENTES TIPOS CELULARES NA SOBREVIDA DE RATOS SUBMETIDOS À HEPATECTOMIA DE 90%.....	73
7.3. FASE 3 - AVALIAÇÃO DO EFEITO PRECOCE DA TERAPIA CELULAR EM RATOS SUBMETIDOS À HEPATECTOMIA DE 90%	79
7.3.1. Alterações histológicas após hepatectomia	80
7.3.2. Avaliação da regeneração hepática	83

7.3.3. Efeitos da terapia celular	85
8. CONCLUSÕES	99
9. CONSIDERAÇÕES FINAIS	102
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	105
ANEXOS	130
Anexo 1.....	131
Anexo 2	133
Anexo 3.....	135
Anexo 4.....	137
Anexo 5.....	150

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

=	Igual a
>	Maior que
<	Menor que
%	Porcentagem
+	Mais
±	Mais ou menos
ALT	Alanino aminotransferase
ANOVA	Análise de variância
APA	Alginato-poli-L-lisina-alginato
AST	Aspartato aminotransferase
BrdU	Bromodeoxiuridina
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
CARS	<i>Compensatory Anti-inflammatory Response Syndrome</i>
CCl ₄	Tetracloroeto de carbono
CTG	Centro de Terapia Gênica
°C	Grau Celsius
d	Dia
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio padrão
EDTA	<i>Ethylenediamine Tetraacetic Acid</i>
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
ex.	Exemplo
FasL	<i>Fas ligand</i>
FM	Fração mononuclear
GPPG	Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação
G-CSF	<i>Granulocyte-Colony Stimulating Factor</i>
HB-EGF	<i>Heparin-Binding EGF-Like Growth Factor</i>
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
HE	Hematoxilina e eosina
HGF	<i>Hepatocyte Growth Factor</i>
HP	Hepatectomia parcial

HTC	Hepatócito
IGF-1	<i>Insulin-like Growth Factor 1</i>
IHA	Insuficiência hepática aguda
INF-gama	Interferon-gama
IL	Interleucina
ISOL	<i>in situ oligo ligation</i>
JAK	<i>Janus kinase</i>
kg	Quilograma
LD	Lobo direito
LEHG	Laboratório Experimental de Hepatologia e Gastroenterologia
LPS	Lipopolissacarídeos
mmol/L	Milimol por litro
mg	Miligrama
mg/kg	Miligrama por quilograma
mg/dL	Miligrama por decilitro
mL	Mililitro
mmHg	Milímetros de mercúrio
MMO	Mononucleares da medula óssea
MOT	Medula óssea total
ng/dL	Nanograma por decilitro
ng/mL	Nanograma por mililitro
NF-kappa B	<i>Nuclear Factor-kappa B</i>
NK	<i>Natural killer</i>
P	Nível de significância
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCNA	<i>Proliferating Cell Nuclear Antigen</i>
PDGF	<i>Platelet-Derived Growth Factor</i>
PDGF-BB	<i>Platelet-Derived Growth Factor-BB</i>
pg/mL	Picograma por mililitro
PIGF	<i>Placental Growth Factor</i>
Q	Quartil
Q1	Primeiro quartil
Q3	Terceiro quartil
RNA	Ácido ribonucleico

RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro
SCF	<i>Stem Cell Factor</i>
SDF-1	<i>Stromal cell Derived Factor-1</i>
SFB	Soro fetal bovino
SIRS	<i>Systemic Inflammatory Response Syndrome</i>
SOCS3	<i>Suppressor of Cytokine Signaling 3</i>
SPSS	<i>Statistical Package for Social Sciences</i>
STAT3	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription 3</i>
TGF- α	<i>Transforming Growth Factor-alpha</i>
TGF- β	<i>Transforming Growth Factor-beta</i>
THMO	Tronco hematopoiética da medula óssea
TMMO	Tronco mesenquimal da medula óssea
TNF- α	<i>Tumor Necrosis Factor-alpha</i>
TNF- β	<i>Tumor Necrosis Factor-beta</i>
TLR3	<i>Toll-Like Receptor 3</i>
TUNEL	<i>TdTmediated dUTP-biotin nick end labeling</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
UAMP	Unidade de Análise Molecular e de Proteínas
UEA	Unidade de Experimentação Animal
UPE	Unidade de Patologia Experimental

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Modelos de hepatectomia parcial em ratos.	26
Figura 2 – Microencapsulação com alginato de sódio: A) Unidade de Encapsulação Nisco; B) Microcápsula sem células; C) Microcápsula com células HepG2; D) Administração das microcápsulas na cavidade peritoneal; E) Microcápsulas aderidas ao fígado; F) Fotomicrografia de microcápsula contendo células HepG2 e aderida ao tecido hepático (HE 100x).....	46
Figura 3 - Sobrevida após hepatectomia de 85% conforme a suplementação de glicose.....	50
Figura 4 - Glicose (mg/dL) e lactato (mmol/L) sanguíneos em ratos submetidos à hepatectomia de 85% conforme a suplementação de glicose.....	50
Figura 5 - Sobrevida em 10 dias após hepatectomia de 90% conforme o regime anestésico.....	52
Figura 6 - Sobrevida em 10 dias após hepatectomia de 90% conforme o tipo de célula encapsulada.....	54
Figura 7 - Média da glicose sanguínea (mg/dL) em ratos submetidos à hepatectomia de 90% conforme o regime terapêutico.....	56
Figura 8 - Média do lactato sanguíneo (mmol/L) em ratos submetidos à hepatectomia de 90% conforme o regime terapêutico.....	56
Figura 9 - Peso dos lobos remanescentes (g) de ratos submetidos à hepatectomia de 90% conforme o momento do sacrifício e o regime terapêutico.	60
Figura 10 - Razão peso dos lobos remanescentes em relação ao peso corporal do dia do sacrifício (%) de ratos submetidos à hepatectomia de 90% conforme o momento do sacrifício e o regime terapêutico.....	61
Figura 11 – Tecido hepático corado por hematoxilina e eosina (HE) (400x) de ratos submetidos à hepatectomia de 90% conforme o momento do sacrifício e o regime terapêutico.	63
Figura 12 - Hepatócitos em mitoses de ratos submetidos à hepatectomia de 90% conforme o momento do sacrifício e o regime terapêutico.	63
Figura 13 - IL-6 sérica (pg/mL) de ratos submetidos à hepatectomia de 90% conforme o momento do sacrifício e o regime terapêutico.....	65
Figura 14 - TGF-beta sérico (ng/mL) de ratos submetidos à hepatectomia de 90% conforme o momento do sacrifício e o regime terapêutico.	65
Figura 15 - PDGF-BB sérico (ng/mL) de ratos submetidos à hepatectomia de 90% conforme o momento do sacrifício e o regime terapêutico.	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Artigos originais sobre transplante de células da medula óssea em modelos animais de insuficiência hepática aguda.....	23
Tabela 2 – Lista de variáveis não laboratoriais avaliadas.....	38
Tabela 3 – Lista de variáveis laboratoriais avaliadas.....	39
Tabela 4 – Características dos ratos submetidos à hepatectomia de 85% conforme a suplementação de glicose.	49
Tabela 5 – Peso dos lobos remanescentes (g) e razão peso dos lobos remanescentes em relação ao peso corporal do dia do sacrifício (%) de ratos submetidos à hepatectomia de 85% conforme a suplementação de glicose.....	49
Tabela 6 – Tipo, número de células administradas em cada animal e número de animais por grupo.....	53
Tabela 7 – Glicose sanguínea (mg/dL) em ratos submetidos à hepatectomia de 90% conforme o regime terapêutico.	55
Tabela 8 – Peso dos lobos remanescentes (g) e razão peso dos lobos remanescentes em relação ao peso corporal do dia do sacrifício (%) de ratos submetidos à hepatectomia de 90% conforme o regime terapêutico.....	57
Tabela 9 – Peso dos lobos remanescentes (g) de ratos submetidos à hepatectomia de 90% conforme o momento do sacrifício e o regime terapêutico.	58
Tabela 10 – Razão peso dos lobos remanescentes em relação ao peso corporal do dia do sacrifício (%) de ratos submetidos à hepatectomia de 90% conforme o momento do sacrifício e o regime terapêutico.....	59
Tabela 11 – Hepatócitos em mitoses de ratos submetidos à hepatectomia de 90% conforme o momento do sacrifício e o regime terapêutico.	61
Tabela 12 – IL-6 sérica (pg/mL) de ratos submetidos à hepatectomia de 90% conforme o momento do sacrifício e o regime terapêutico.....	64
Tabela 13 – TGF-beta sérico (ng/mL) de ratos submetidos à hepatectomia de 90% conforme o momento do sacrifício e o regime terapêutico.	64
Tabela 14 – PDGF-BB sérico (ng/mL) de ratos submetidos à hepatectomia de 90% conforme o momento do sacrifício e o regime terapêutico.	66

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Vias de sinalização relacionadas à regeneração hepática.	9
Quadro 2 - Tipos celulares empregados nos estudos de terapia de doenças hepáticas.	17
Quadro 3 - Efeitos das células-tronco da medula óssea no tecido hepático.	21
Quadro 4 - Requisitos para modelo animal ideal de insuficiência hepática aguda.	25

RESUMO

A insuficiência hepática aguda resulta da perda súbita das funções vitais do fígado em consequência da perda maciça do tecido hepático. Em muitos casos, o transplante de fígado de urgência é o tratamento definitivo, apesar da capacidade regenerativa do fígado. Os mecanismos da regeneração envolvem intrincadas vias de regulação, com ativação de fatores de crescimento e citocinas. A terapia celular com hepatócitos e células tronco da medula óssea tem sido proposta como alternativa terapêutica, mas seu emprego permanece no campo experimental.

O presente estudo teve por objetivo investigar os efeitos da terapia com células imobilizadas em microcápsulas de alginato de sódio na sobrevivência e na regeneração hepática em ratos Wistar machos adultos submetidos à insuficiência hepática aguda. Na primeira fase foi realizada a padronização de modelo de insuficiência hepática aguda por hepatectomia de 85% ou 90% com janela terapêutica adequada ao estudo da terapia celular. A segunda fase teve por objetivo avaliar os efeitos da terapia com células HepG2 e células da medula óssea total (MOT) e fração mononuclear (FM), contidas em microcápsulas de alginato de sódio colocadas no peritônio, sobre os níveis de glicose e lactato sanguíneos e sobre a sobrevida em 10 dias. Na fase 3, foram avaliados os efeitos da terapia celular com MOT e FM sobre a proliferação hepatocitária e os níveis séricos de citocinas e de fatores de crescimento nas primeiras 72 horas após hepatectomia de 90%.

Na fase 1, mesmo utilizando ketamina e xilazina como anestésico e independentemente da suplementação de glicose, hepatectomia de 85% resultou em sobrevida de 50% em 72 horas, não adequada a um modelo de insuficiência hepática aguda. Hepatectomia de 90% sob anestesia com ketamina e xilazina determinou aumento da mortalidade, com a maioria dos óbitos ocorrendo nas primeiras 6 horas do pós-operatório. A troca do regime anestésico para isoflurano reduziu o tempo de recuperação anestésica e aumentou a sobrevida imediata permitindo uma janela terapêutica adequada. A sobrevida foi de 26,7% às 72 horas e de 6,7% aos 10 dias.

Na fase 2 foram administradas microcápsulas contendo células em ratos submetidos a hepatectomia de 90%. O transplante de células da medula óssea aumentou a sobrevida em 10 dias de forma significativa em relação ao grupo sem células (MOT 1×10^6 células: 63,6%, $P=0,002$; FM 1×10^6 : 57,1%, $P=0,001$ e FM 3×10^7 : 54,5%, $P=0,003$). A sobrevida (30,8%) dos animais tratados com HepG2 não foi diferente do grupo sem células.

Na terceira fase, às 72 horas após a hepatectomia, o grupo sem células apresentou peso dos lobos remanescentes e razão de massa hepática significativamente superiores aos

dos animais que receberam MOT ($P=0,001$ e $P=0,020$) e FM ($P=0,002$ e $P=0,008$). Não houve diferença estatística significativa no número de hepatócitos em mitose e nos níveis de IL-6 entre os grupos em todos os momentos avaliados. Somente às 12 horas houve diferença significativa dos níveis de TGF-beta entre os grupos, sendo maiores no grupo sem células ($P=0,036$). Os valores do PDGF-BB às 48 horas do grupo sem células foram significativamente inferiores aos dos ratos tratados com FM ($P=0,017$).

Esses resultados nos permitem concluir que hepatectomia de 90% de ratos Wistar anestesiados com isoflurano possibilita janela terapêutica adequada ao estudo da terapia celular. A terapia com células da medula óssea, imobilizadas em microcápsulas de alginato de sódio resulta em aumento da sobrevivência de ratos submetidos à hepatectomia de 90%. Essa terapêutica reduziu o ganho de massa dos lobos remanescentes, mas não modificou a regeneração hepatocitária e os níveis de IL-6, de TGF-beta e de PDGF-BB durante as primeiras 72 horas após o procedimento.

ABSTRACT

Acute liver failure is caused by the sudden loss of liver vital functions due to massive loss of hepatic tissue. In most cases, emergency liver transplant is the curative treatment, despite liver's regenerative capacity. Mechanisms of liver regeneration involve intricate regulatory pathways, with the recruitment of growth factors and cytokines. Cell therapy, either with hepatocytes or with bone marrow cells, has been proposed as a therapeutic option but remains in the experimental area.

The present study aimed to investigate the effects of the therapy with cells immobilized in alginate microcapsules on the survival and hepatic regeneration of adult male Wistar rats with acute liver failure. On the first phase the acute liver failure model by 85% or 90% hepatectomy was standardized to achieve an adequate therapeutic window to study the mechanisms and effects of cell therapy. The second phase aimed to evaluate the effects of therapy using Hep G2 cells and bone marrow cells, either whole bone marrow (WBM) or mononuclear fraction (MF), in alginate microcapsules implanted in the peritoneum, on glucose and lactate levels, and 10-day survival. On phase 3, the effects of cell therapy with WBM and MF on hepatocyte proliferation and serum levels of cytokines and growth factors were evaluated in the first 72 hours after 90% hepatectomy.

On phase 1, using ketamine and xylazine as anesthetic, despite glucose supplementation, 85% hepatectomy resulted in 50% survival at 72 hours, which is not adequate for a model of acute liver failure. Ninety-percent hepatectomy under ketamine and xylazine anesthesia resulted in increased mortality, although in the first 6 hours post-operative. The change in anesthetic regimen for isoflurane reduced recovery time and increased early survival, allowing for an adequate therapeutic window. Survival was 26.7% at 72 hours and 6.7% at 10 days.

On phase 2 microcapsules containing cells were implanted in rats after 90% hepatectomy. Bone marrow cell transplantation significantly increased 10-day survival over empty capsules group (WBM 1×10^6 cells: 63.6%, $P=0.002$; MF 1×10^6 : 57.1%, $P=0.001$ and MF 3×10^7 : 54.5%, $P=0.003$). Survival of animals treated with HepG2 (30.8%) was not different from empty capsules group.

On the third phase, 72 hours after hepatectomy, empty capsules group showed significantly increase in the weight of remnant liver lobe and hepatic mass ratio compared to WBM ($P=0.001$ and $P=0.020$) and MF ($P=0.002$ and $P=0.008$). There was not statistic difference in the number of mitotic hepatocytes and in the serum levels of IL-6 between groups in any of the time points analyzed. Serum levels of TGF-beta were higher in the

empty capsules group at 12 hours only ($P=0.036$). Serum levels of PDGF-BB in this group were significantly lower ($P=0.017$) than those from the MF group at 48 hours post-hepatectomy.

These findings suggest that 90% partial hepatectomy in Wistar rats anesthetized with isoflurane provides an adequate therapeutic window to study the effects and mechanisms of cell therapy. Cell therapy with bone marrow cells microencapsulated in alginate beads leads to increased survival in rats with 90% partial hepatectomy. This therapy reduced the weight of remnant lobes but did not change hepatocyte regeneration and serum levels of IL-6, TGF-beta and PDGF-BB in the first 72 hours after surgery.

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O fígado, órgão essencial à vida e responsável pela homeostase metabólica, possui capacidade de regeneração a partir da replicação de suas células. Esse processo desencadeado pela lesão hepática envolve a participação de todos os tipos celulares do fígado com o rompimento do estado celular quiescente. Os mecanismos da regeneração envolvem múltiplas e intrincadas vias de regulação, com ativação de cascatas de sinalização de fatores de crescimento e citocinas que regulam a expressão gênica.

A insuficiência hepática aguda ocorre quando a extensão da necrose celular supera a capacidade regenerativa do fígado. A perda súbita das inúmeras funções do fígado compromete todo o organismo e pode determinar o óbito. A intensidade da lesão hepática determina o grau de repercussão local e sistêmica.

Em resposta à lesão hepatocelular de qualquer origem ocorre ativação simultânea de mediadores pró- e anti-inflamatórios que atuarão na sinalização da regeneração hepática e na resposta imune sistêmica. Possivelmente, a dissonância imunológica, com perda do equilíbrio entre as atividades pró- e anti-inflamatória, seja um fator determinante da evolução do paciente em insuficiência hepática aguda.

O transplante de fígado de urgência pode modificar a história natural da doença e permitir a sobrevivência do paciente em insuficiência hepática aguda. Contudo, a falta de órgão em tempo hábil pode limitar o acesso ao transplante. Os medicamentos imunossupressores utilizados continuamente após o transplante não são isentos e possuem efeitos colaterais imediatos e em longo prazo. Os custos do transplante, da medicação imunossupressora, do acompanhamento clínico e laboratorial, e do tratamento das complicações são elevados.

Tratamentos alternativos ao transplante de fígado têm sido buscados e a terapia celular se apresenta uma proposta promissora. O transplante de hepatócitos foi realizado experimentalmente em animais e seres humanos em insuficiência hepática aguda, mas a sua aplicabilidade é limitada pela dificuldade na obtenção de um número suficiente de células. As células-tronco da medula óssea, devido a sua capacidade de diferenciação em hepatócitos e colangiócitos, têm sido estudadas como opção terapêutica nas doenças hepáticas crônicas e agudas. Os mecanismos dos efeitos benéficos dessas células sobre a regeneração hepática não estão completamente esclarecidos. A modulação da resposta imunológica e o efeito anti-inflamatório local e sistêmico poderiam, através da estimulação da regeneração hepatocitária, promover a recuperação do fígado lesado. Estudos que elucidem os processos

patofisiológicos da regeneração hepática e da repercussão sistêmica da insuficiência hepática aguda podem ampliar o conhecimento e aprimorar a assistência ao paciente, com consequente redução da mortalidade.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O fígado é um órgão essencial à manutenção da vida e da homeostase metabólica corporal. Responsável pelo metabolismo, síntese, armazenamento e redistribuição de nutrientes, carboidratos, gorduras e vitaminas, o fígado produz grandes quantidades de proteínas séricas, incluindo as proteínas de fase aguda, albumina, enzimas e cofatores. É o principal órgão de desintoxicação removendo resíduos e xenobióticos por conversão metabólica e através da excreção biliar (Taub, 2004).

A presença de substâncias tóxicas ou a ocorrência de infecção no tecido hepático podem provocar lesão celular e a perda das funções do fígado. A imediata resposta regenerativa às injúrias hepáticas é um eficiente mecanismo de manutenção funcional do fígado, da viabilidade do organismo e de preservação da vida (Michalopoulos, 2007). O fígado tem a capacidade única de regular o seu crescimento e a sua massa após injúria aguda. Este processo de crescimento é denominado de regeneração hepática, embora o crescimento do fígado ocorra por hiperplasia celular compensatória ao invés de regeneração verdadeira (Fausto & Campbell, 2003; Bataller & Brenner, 2005).

O fígado é constituído por diferentes tipos celulares. Os hepatócitos correspondem a 80% dessas células. Os outros 20% da massa hepática são constituídos por células não-parenquimatosas, que incluem as células endoteliais, as células de Kupffer, os linfócitos e as células estreladas. As células endoteliais compõem a rede de sinusoides do fígado e fornecem uma grande superfície de absorção dos nutrientes que circulam pela veia porta. As células de Kupffer, também situadas nos sinusoides, são essenciais para a fagocitose de organismos infecciosos e na produção de citocinas. Os linfócitos compõem o sistema imune inato e auxiliam no controle de infecções. As células estreladas possuem várias funções entre elas a de produzir a matriz extracelular e de armazenar vitamina A (Taub, 2004).

O hepatócito é a unidade celular funcional do fígado e realiza múltiplas funções sintéticas e metabólicas. Os hepatócitos são células epiteliais polipóides, altamente diferenciadas, que formam estruturas tipo cordão. O lóbulo hepático é constituído de uma veia central rodeada por 6 tríades portais formadas pelos ductos biliares, pela artéria hepática e pela veia porta (Alison *et al.*, 2009; Duncan *et al.*, 2009; Kisseleva *et al.*, 2010).

2.1. REGENERAÇÃO HEPÁTICA

A regeneração hepática, por séculos considerada um mito, tornou-se uma realidade científica no século XX. O mito da regeneração hepática tem origem grega e foi registrado

por Ésquilo na tragédia Prometeu Acorrentado. Preso às correntes forjadas por Hefesto ao monte Cáucaso Prometeu cumpriria castigo imposto por Zeus por entregar o segredo do fogo aos homens. Durante o dia seu fígado era devorado por uma águia, mas à noite o fígado voltava a crescer. A fonte da idéia original da capacidade regenerativa do fígado de Prometeu não é conhecida, podendo ter sido fruto de observação direta ou, simplesmente de um “vôo da imaginação poética” (Fausto, 2001).

Um dos marcos da transformação do mito de Prometeu em pesquisa experimental foi a descrição por Higgins e Anderson em 1931 de um método reprodutível de realização de hepatectomia parcial em ratos. Desde então, a capacidade regenerativa do fígado tem sido intensamente investigada. Mais recentemente, a regeneração do fígado humano pôde ser demonstrada com a introdução e o desenvolvimento das técnicas de transplante de fígado reduzido e de lobos hepáticos de doadores vivos. As semelhanças entre os processos de regeneração em animais de experimentação e em seres humanos sugerem que os mecanismos que regulam a regeneração são similares entre as espécies e que os conhecimentos adquiridos com os estudos experimentais podem ser aplicados aos seres humanos (Fausto, 2001).

De acordo com Fausto e Campbell (2003), apesar de seu uso comum, a expressão regeneração hepática está incorreta (Fausto & Campbell, 2003). Em termos biológicos, regeneração significa a reconstituição de uma estrutura que tenha sido retirada, como o completo crescimento do membro de uma salamandra, incluindo pele, músculos e dígitos. Na regeneração hepática o organismo lesado busca recompor a massa hepatocitária e a estrutura funcional lobular necessária à manutenção da homeostase corporal (Fausto *et al.*, 2006).

A capacidade de regeneração a partir de células diferenciadas (hepatócitos) é única do fígado e sua capacidade de replicação é surpreendente, pois após lesão hepática maciça poucos hepatócitos são necessários para o restabelecimento da massa hepática. Em resposta à lesão, os hepatócitos proliferam e podem se dividir até 100 vezes (Michalopoulos & DeFrances, 1997; Overturf *et al.*, 1997; Taub, 2004).

Após hepatectomia parcial há uma resposta hiperplásica com a replicação de praticamente todas as células maduras nos lobos remanescentes (Taub, 2004). A massa hepática destes lobos se expande para compensar a perda do tecido. O processo regenerativo é compensatório porque o tamanho do fígado resultante é determinado pelas exigências metabólicas do organismo. Em roedores e em seres humanos há uma proporção entre o peso corporal e a massa do fígado. A proporção ideal corresponde ao ponto de equilíbrio entre o

excesso e o déficit de tecido funcional hepático adequado para o atendimento das necessidades do organismo. Entretanto, os fatores regulatórios que determinam o tamanho ideal do fígado de cada indivíduo não são bem compreendidos (Michalopoulos & DeFrances, 1997; Taub, 2004; Fausto & Riehle, 2005; Michalopoulos, 2007).

A quantidade de tecido hepático remanescente compatível com a vida parece ser menor em roedores que em seres humanos. Roedores podem sobreviver mesmo após hepatectomia de 90 a 95% (Madrahimov *et al.*, 2006; Martins *et al.*, 2008). Em seres humanos, a perda de até 70 a 80% do fígado pode ser tolerada, mas ressecções maiores podem determinar quadros de disfunção e de insuficiência hepática (Leelaudomlipi *et al.*, 2002; Ninomiya *et al.*, 2003).

Em roedores, em cerca de 5 a 10 dias após hepatectomia parcial a massa hepática é restabelecida, contudo sem a reconstituição anatômica original (Michalopoulos & DeFrances, 1997; Taub, 2004). Em seres humanos, a finalização do processo regenerativo é mais lenta e possivelmente leva de 1 a 2 meses (Fausto & Campbell, 2003; Michalopoulos, 2007). Após o transplante de lobo hepático de doador vivo há rápido aumento da massa hepática nos primeiros sete dias, ocorrendo completa restauração em 3 meses (Fausto & Riehle, 2005).

2.1.1. Mecanismos envolvidos na regeneração hepática

Durante os últimos anos houve grandes avanços na compreensão dos mecanismos de regeneração hepática, sendo em grande parte o resultado do emprego de camundongos transgênicos e *knock-out*. A maioria dos dados sobre os mecanismos de controle da regeneração hepática foram obtidos a partir da utilização do modelo de hepatectomia parcial (Taub, 2004; Aller *et al.*, 2009). Nesse procedimento, cerca de 2/3 do fígado são retirados, sem lesão aos lobos remanescentes e com mínima mortalidade pós-operatória (Emond *et al.*, 1989).

A regeneração hepática após hepatectomia parcial é um fenômeno muito complexo e bem orquestrado, envolvendo a participação de todos os tipos de células maduras do fígado. Ocorre modificação no padrão quiescente normal de interação celular e a ativação de cascatas de sinalização determinando efeitos parácrinos de citocinas e fatores de crescimento. Com o objetivo de restabelecer a busca da homeostase metabólica, o processo da regeneração se inicia imediatamente após a hepatectomia no tecido hepático remanescente. Uma sequência ordenada de eventos pode ser observada a partir dos primeiros

5 minutos e que durará de 5 a 7 dias até a recuperação da massa hepática (Michalopoulos, 2007).

A divisão celular é raramente vista em hepatócitos de fígado sadio adulto e que estão usualmente na fase G0 do ciclo de celular (Michalopoulos & DeFrances, 1997; Taub, 2004). No entanto, após hepatectomia parcial, os hepatócitos são as primeiras células a entrar em ciclo de divisão celular. O pico de replicação hepatocitária ocorre em 24 horas após a hepatectomia parcial em ratos, e em 36 a 42 horas em camundongos. Até 95% dos hepatócitos remanescentes se dividem após hepatectomia parcial e são necessárias uma a duas divisões celulares (de 1,4 a 1,6 ciclos) para a restauração completa da massa hepática (Taub, 2004; Michalopoulos, 2007; Alison *et al.*, 2009). Ao final do processo de síntese de DNA, pode ocorrer uma onda de apoptose dos hepatócitos, sugerindo a existência de um mecanismo para a correção de uma resposta regenerativa excessiva (Sakamoto *et al.*, 1999; Michalopoulos, 2007).

No processo regenerativo hepático também ocorre a ativação das células não parenquimatosas. Possivelmente elas tenham um papel essencial nesse processo, produzindo citocinas e fatores de crescimento que regulam a regeneração. Para a restauração da estrutura lobular, as células não parenquimatosas também proliferam, contudo a indução da síntese de DNA ocorre mais tardiamente, em torno de 48 horas para as células do epitélio biliar e de Kupffer. A proliferação das células endoteliais, começa em 2 a 3 dias e termina em torno dos 4 a 5 dias após a hepatectomia (Taub, 2004; Fausto & Riehle, 2005; Michalopoulos, 2007; Alison *et al.*, 2009).

O estudo dos mecanismos da regeneração hepática evoluiu da busca de uma única molécula capaz de desencadear o processo completo, para a análise de vias individuais, e finalmente, para a investigação de múltiplas vias e de suas inter-relações (Fausto & Riehle, 2005). O emprego de animais *knock-out* para determinados genes tem sido úteis no esclarecimento do papel específico dos múltiplos genes e proteínas envolvidos no processo de regeneração hepática (Taub, 2004; Fausto & Riehle, 2005).

Há um grande número de genes envolvido na regeneração do fígado, mas ao menos 3 vias essenciais ao processo já foram individualizadas: citocinas, fatores de crescimento e metabólica (Quadro 1). A via das citocinas é a grande responsável pela entrada dos hepatócitos quiescentes em ciclo celular (de G0 a G1), em um processo denominado *priming*. A via dos fatores de crescimento é responsável pela progressão do ciclo celular, de G1 para a fase S. A terceira via envolveria a pouco estudada ligação dos sinais metabólicos à síntese ribossômica e a replicação do DNA (Taub, 2004; Fausto & Riehle, 2005). Essas vias

não atuam de forma isolada, havendo interação, e imbricação entre elas. O padrão coordenado de expressão gênica que ocorre durante a regeneração hepática sugere que deve haver interação dos sinais que regulam a expressão gênica, como as citocinas, os fatores de crescimento e os sinais metabólicos (Fausto & Riehle, 2005). A importância do fígado na sobrevivência do organismo possivelmente seja determinante da existência de redundância das etapas entre as vias, pois dessa forma há redução da possibilidade de falha no processo regenerativo. A deficiência de um único gene pode provocar atraso ou redução da regeneração, mas raramente determina um completo bloqueio do processo (Taub, 2004; Fausto & Riehle, 2005; Alison *et al.*, 2009).

Quadro 1 - Vias de sinalização relacionadas à regeneração hepática.

Citocinas: <ul style="list-style-type: none">- <i>Tumor Necrosis Factor-alpha</i> (TNF-alfa)- Interleucina-6 (IL-6)
Fatores de crescimento: <ul style="list-style-type: none">- <i>Hepatocyte Growth Factor</i> (HGF)- <i>Epidermal Growth Factor</i> (EGF)- <i>Transforming Growth Factor-alpha</i> (TGF-alfa)- Insulina- Glucagon
Metabólica: <ul style="list-style-type: none">- Ciclina D1- Nutrientes

Via das citocinas

O sistema imune inato desempenha um papel importante na iniciação da regeneração hepática após hepatectomia parcial (Fausto *et al.*, 2006). Os mecanismos iniciais da regeneração hepática envolvem ativação de células de Kupffer e das células estreladas, que produzem citocinas pró-inflamatórias. As principais citocinas envolvidas são o TNF-alfa (*Tumor Necrosis Factor-alpha*) e a interleucina-6 (IL-6) Essa sinalização possibilita ao

hepatócito em estado de quiescência (G0) passar, através de G1, para a fase S do ciclo celular, sintetizar DNA e proliferar (Taub, 2004; Fausto & Riehle, 2005; Sudo *et al.*, 2008). A liberação de IL-6 constitui um passo crucial no processo regenerativo e sua ação ocorre pela ativação de genes da resposta de fase aguda, pela redução da apoptose dos hepatócitos e pela indução da regeneração hepática (Wuestefeld *et al.*, 2003; Taub, 2004).

Via dos fatores de crescimento

No processo regenerativo hepático, além da via dependente de citocinas, diversos fatores de crescimento estão envolvidos na promoção da replicação celular e incluem o HGF (*Hepatocyte Growth Factor*), o EGF (*Epidermal Growth Factor*), o TGF-alfa (*Transforming Growth Factor-alpha*), a insulina e o glucagon (Taub, 2004). Esses fatores fornecem os estímulos necessários para a sobrevivência, crescimento e proliferação dos hepatócitos após diferentes tipos de lesões. Provavelmente HGF, TGF-alfa e HB-EGF (*Heparin-Binding EGF-Like Growth Factor*) têm efeitos específicos na replicação dos hepatócitos e na sobrevivência, e são necessários para uma regeneração ideal (Fausto & Riehle, 2005). A progressão do ciclo celular hepatocitário de G1 para S requer atividade do TGF-alfa e do HGF (Fausto & Campbell, 2003).

O HGF produzido pelas células estromais estimula a proliferação das células epiteliais, a mobilidade, a morfogênese e a angiogênese em diversos órgãos através de fosforilação da tirosina em seu receptor, c-Met. Está estocado na forma inativa na matriz extracelular de vários tecidos e pode ser liberado pela ação de proteases. O HGF está envolvido em múltiplos processos de diversos tipos de células (Fausto & Riehle, 2005) e é necessário no reparo de lesões do fígado, rins, pulmões, entre outros, e possui efeito protetor sobre os órgãos através de sinalização antiapoptótica e anti-inflamatória. Pacientes em insuficiência hepática aguda ou transplantados que receberam fígado pequeno para o seu tamanho apresentam altas concentrações séricas de HGF (Ninomiya *et al.*, 2003; Ninomiya *et al.*, 2010).

No fígado, o HGF é produzido pelas células não parenquimatosas, particularmente pelas células estreladas, e atua sobre os hepatócitos por mecanismo parácrino ou endócrino regulando vários processos metabólicos (Pediaditakis *et al.*, 2001; Taub, 2004). No fígado lesionado, o HGF atua diretamente na proliferação celular e parece ocorrer tanto liberação de HGF pré-formado, como a aceleração da transcrição gênica (Taub, 2004; Fausto & Riehle, 2005). Após a lesão hepática, o precursor do HGF (pró-HGF) é ativado rapidamente por proteases como a uPA (*urokinase-type plasminogen activator*) e o plasminogênio

(Pediaditakis *et al.*, 2001; Shimizu *et al.*, 2001; Currier *et al.*, 2003; Shanmukhappa *et al.*, 2009).

O TGF-alfa é um ligante membro da família dos fatores de crescimento epidérmico. É o único fator de crescimento produzido pelos hepatócitos e atua como um agente autócrino ligando-se a receptores existentes nos próprios hepatócitos (Mead & Fausto, 1989; Fausto & Riehle, 2005). A forma precursora do TGF-alfa está ancorada à membrana celular e é liberada pelo efeito das metaloproteinases (Argast *et al.*, 2004; Fausto & Riehle, 2005). Embora tenha efeitos sobre a motilidade celular e a vascularização tecidual, o principal efeito do TGF-alfa no fígado é a promoção da proliferação hepatocitária. A expressão de RNA mensageiro (mRNA) de TGF-alfa é muito baixa no fígado normal, mas, após a hepatectomia parcial, aumenta antes do início da replicação do DNA. Contudo, estudos com camundongos *knock-out* para TGF-alfa não mostraram defeito na regeneração do fígado após hepatectomia parcial, possivelmente por que há sobreposição de atuação dos vários ligantes da família dos EGF (Fausto & Riehle, 2005).

Outro fator da família EGF envolvido na regeneração hepática é o HB-EGF. A expressão de HB-EGF está muito aumentada no fígado em regeneração após hepatectomia parcial. Sua expressão precede o aumento de HGF e TGF-alfa e possivelmente regula a transição da fase de sensibilização para a replicação do DNA no hepatócito (Su *et al.*, 2002; Fausto & Riehle, 2005; Mitchell *et al.*, 2005). Pacientes submetidos a grandes ressecções hepáticas apresentam níveis plasmáticos aumentados por 5 a 7 dias após a cirurgia (Yamada *et al.*, 1997). A deficiência na expressão do HB-EGF determina atraso na replicação do DNA após hepatectomia parcial (Fausto & Riehle, 2005).

Via metabólica

Uma terceira via de regulação da regeneração hepática tem sido observada. Na via metabólica a demanda metabólica e a oferta de nutrientes estimulariam a proliferação hepatocitária na busca da homeostase sistêmica de nutrientes. A regeneração hepática seria uma resposta às exigências corporais e de todo organismo. Contudo, há poucos estudos abordando essa forma de estimulação da proliferação hepatocitária (Nelsen *et al.*, 2003; Fausto *et al.*, 2006).

Mecanismos de indução gênica da regeneração hepática

O mecanismo pelo qual a hepatectomia parcial leva à indução gênica de citocinas e à ativação de fatores de transcrição ainda não é totalmente conhecido (Campbell *et al.*, 2006).

Alguns estudos sugerem que os lipopolissacarídeos (LPS) de origem entérica podem ser o agente estimulante da produção inicial de citocinas pró-inflamatórias no processo regenerativo hepático. LPS e outros produtos bacterianos e virais se ligam a receptores específicos (TLR), os quais regulam a imunidade inata e adaptativa (Fausto & Riehle, 2005; Campbell *et al.*, 2006). O aumento absoluto ou relativo de LPS ou de endotoxinas de origem bacteriana intestinal no tecido hepático foi sugerido como um fator mediador do aumento de TNF-alfa. Ratos tratados com antibióticos e com flora intestinal livre de bactérias têm atraso no pico da replicação do DNA após hepatectomia. A administração de LPS sensibiliza os hepatócitos aos fatores de crescimento em ratos não operados (Webber *et al.*, 1998). Entretanto, em camundongos *knock-out* para TLR ou deficientes em Cd14, uma molécula que participa na ligação do LPS ao seu receptor, não houve atraso na replicação hepatocitária após hepatectomia parcial (Campbell *et al.*, 2006). Contudo, camundongos *knock-out* para Myd88, uma molécula intracelular chave nas vias de sinalização do LPS e de outras citocinas, apresentaram redução na expressão do TNF-alfa tecidual e nos níveis de séricos de IL-6. Esses resultados sugerem que ligantes que compartilham a via de sinalização com LPS, ao invés do próprio LPS, poderiam desencadear a liberação de citocinas na fase inicial da regeneração hepática (Fausto & Riehle, 2005; Campbell *et al.*, 2006).

Os complementos C3 e C5, potentes mediadores inflamatórios, foram indicados como agentes estimulantes da citocinas pró-inflamatórias na regeneração. Camundongos deficientes em C3 e C5 apresentam redução na ativação de citocinas e na replicação de DNA após hepatectomia parcial. Em particular, nos animais deficientes em ambos os complementos há redução na produção de TNF-alfa e IL-6 e pobre ativação de NF-kappa B (*Nuclear Factor-kappa B*) e STAT3 (*Signal Transducer and Activator of Transcription 3*). A administração do complemento deficiente restabeleceu a resposta regenerativa (Strey *et al.*, 2003). Esses dados sugerem que os complementos podem ser sinalizadores do início da regeneração através da indução da produção de citocinas. Entretanto, não são conhecidos quais são os agentes responsáveis pelo aumento nos componentes dos complementos após a hepatectomia parcial (Daveau *et al.*, 2004; Fausto & Riehle, 2005; Michalopoulos, 2007).

2.1.2. Mecanismos de finalização da regeneração hepática

Há pouco conhecimento sobre os mecanismos envolvidos na finalização do processo de regeneração hepática. Possivelmente a restauração da função e da massa hepática seja um dos controladores do processo. Entretanto, os mecanismos exatos que regulam e que reconhecem o restabelecimento do estado de equilíbrio funcional hepático não são

conhecidos (Fausto & Riehle, 2005). A manutenção da homeostase energética, com equilíbrio entre a capacidade geradora de energia do fígado e a demanda corporal de glicose, poderia ser um dos fatores determinantes do encerramento da regeneração hepática (Michalopoulos, 2010).

A redução dos fatores estimulantes que induziram inicialmente a regeneração hepática ocorre via expressão gênica de moléculas como o SOCS3 (*Suppressor of Cytokine Signaling 3*) e o TGF-beta (*Transforming Growth Factor-beta*). O SOCS3, induzido pela IL-6, provavelmente interage com a JAK (*Janus kinase*), inibindo a expressão de STAT3 e potencialmente encerrando a sinalização da IL-6 (Taub, 2004; Fausto & Riehle, 2005). Entretanto, SOCS3 não é essencial para o término da resposta regenerativa. Camundongos *knock-out* SOCS3 não apresentam diferença na massa hepática no final do processo regenerativo (Riehle *et al.*, 2008; Alison *et al.*, 2009).

O TGF-beta 1 é produzido pelas células mesenquimais na maioria dos tecidos e tem ação inibidora da mitose para a maioria das células epiteliais (Michalopoulos & DeFrances, 1997). No fígado o TGF-beta é produzido principalmente pelas células estreladas hepáticas (Ikeda *et al.*, 1998). A síntese de TGF-beta começa 2 a 3 horas após hepatectomia parcial, possivelmente induzida pelo HGF e EGF e permanece elevada por até 72 horas. Os níveis séricos também aumentam logo após a hepatectomia parcial, permanecendo elevados por várias horas. Durante a regeneração os hepatócitos se tornam resistentes aos efeitos inibitórios do TGF-beta devido à redução da expressão de seus receptores (Jakowlew *et al.*, 1991; Michalopoulos & DeFrances, 1997; Michalopoulos *et al.*, 2001). Ao final do processo de regeneração, sua ação é restabelecida, auxiliando no retorno dos hepatócitos ao seu estado quiescente (Michalopoulos & DeFrances, 1997; Campbell *et al.*, 2001; Taub, 2004).

2.2. INSUFICIÊNCIA HEPÁTICA AGUDA

O fígado tem um papel sistêmico e vital para a homeostase metabólica e para a manutenção da vida. Diferentes graus de lesão hepática repercutem de formas diversas sobre os outros órgãos e sobre o organismo como um todo (Taub, 2004; Michalopoulos, 2010). A insuficiência hepática aguda é a expressão da perda da função hepática resultante da necrose aguda do fígado, que se origina de diversas causas com evolução e desfechos variados (Sass & Shakil, 2005; Lee *et al.*, 2008). Nos Estados Unidos, a incidência de insuficiência hepática aguda é estimada em 2.300 a 2.800 casos por ano, e representa 0,1% de todas as mortes, e 6% das mortes relacionadas ao fígado (Polson & Lee, 2005). Na Alemanha ocorrem de 200 a

500 casos a cada ano (Canbay *et al.*, 2011). Na infância a insuficiência hepática aguda é uma condição rara e que tem, geralmente, o óbito como resultante do seu curso natural (Kelly, 2002). Diversas são as causas da insuficiência hepática aguda e as duas principais são as hepatites virais agudas e a hepatotoxicidade decorrente de medicações (Polson & Lee, 2005; Sass & Shakil, 2005; Lee, 2008). Em nosso meio, a hepatite viral A é a principal causa de insuficiência hepática aguda em crianças. Entre 1996 e 2006, de 33 crianças com hepatite fulminante avaliadas pelo Programa de Transplante Hepático Infantil do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 13 (39,4%) tinham hepatite A (Ferreira *et al.*, 2008).

A insuficiência hepática aguda ocorre quando a extensão da morte das células hepáticas supera a capacidade regenerativa do fígado e expressa a perturbação das funções hepáticas, com redução na capacidade de eliminação de drogas, toxinas e bilirrubina, diminuição na síntese de fatores de coagulação, alteração na homeostase da glicose e aumento na produção de lactato (Rutherford & Chung, 2008). Como resultado os pacientes tendem a desenvolver icterícia, coagulopatia e hemorragia gastrointestinal, hipoglicemia e acidose, encefalopatia e edema cerebral, infecções bacterianas e fúngicas, síndrome da resposta inflamatória sistêmica e falência de múltiplos órgãos, e frequentemente evoluem para o óbito (Kieling, 2012).

A insuficiência hepática aguda resulta da perda súbita da função do fígado em uma pessoa sem doença hepática pré-existente. Também é chamada de insuficiência ou falência hepática fulminante, de hepatite fulminante ou de necrose hepática aguda. A definição clássica inclui o desenvolvimento de alteração da coagulação (INR >1,5) e de algum grau de alteração mental (encefalopatia) nas primeiras 8 semanas do início dos sintomas, em um indivíduo previamente saudável sem história de doença hepática, e com duração menor de 26 semanas. Tem sido proposto o emprego preferencial do termo insuficiência hepática aguda (*acute liver failure*) para designar a síndrome de forma geral e que abrangeria as outras nomenclaturas (Polson & Lee, 2005; Lee *et al.*, 2008).

O aprimoramento da assistência intensiva nos últimos anos e o desenvolvimento do transplante de fígado possibilitaram a modificação da história natural e o aumento na sobrevida (Canbay *et al.*, 2011). Devida a sua raridade, existem poucos estudos controlados sobre tratamento e não há padronização dos cuidados intensivos dos pacientes em insuficiência hepática aguda. Por isso, persistem em aberto inúmeras questões sobre o seu desenvolvimento e o seu manejo (Kelly, 2002; Polson & Lee, 2005; Lee *et al.*, 2008).

O transplante de fígado de urgência é o único tratamento definitivo para a maioria dos pacientes em insuficiência hepática aguda e sua introdução como opção terapêutica

modificou a sobrevida (Farmer *et al.*, 2009; Miloh *et al.*, 2010). Nos Estados Unidos da América, a insuficiência hepática aguda foi o motivo do transplante em cerca de 12% dos pacientes pediátricos (Baliga *et al.*, 2004; Rhee *et al.*, 2006). No Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), a insuficiência hepática aguda motivou o transplante de fígado em 12 dos nossos 100 primeiros transplantes realizados de 1995 a 2006 (Oliveira *et al.*, 2006). Contudo, a sobrevida após o transplante por insuficiência hepática aguda permanece inferior a dos pacientes com doença hepática crônica, devido à alta mortalidade operatória imediata, relacionada principalmente a falência de múltiplos órgãos, sépsis e utilização de enxertos sub-ótimos. A sobrevida em 1 ano descrita na maioria das séries é de cerca de 75% (Mahadeb *et al.*, 2009; Strauss *et al.*, 2009), embora relato recente apresente resultado de mais de 90% de sobrevida no primeiro ano após o transplante (Miloh *et al.*, 2010).

Para a sobrevida dos pacientes em insuficiência hepática aguda, o momento do transplante é um fator crítico. Entretanto, a falta de órgãos disponíveis em tempo hábil dificulta o emprego do transplante como opção terapêutica, e a mortalidade em lista atinge 40% (Polson & Lee, 2005). Cerca de 15% das crianças em insuficiência hepática aguda morrem em lista de espera por um transplante nos Estados Unidos e na Europa (Miloh *et al.*, 2010). A redução da mortalidade em lista pode ser alcançada com a realização precoce do transplante e com a utilização de enxerto partido e de doador vivo. A indicação precoce do transplante aumenta a sua probabilidade de sucesso. Contudo, a sua realização muito cedo encerra a possibilidade de recuperação espontânea através da regeneração hepatocitária (Farmer *et al.*, 2009; Miloh *et al.*, 2010).

2.3. RESPOSTA INFLAMATÓRIA SISTÊMICA NA INSUFICIÊNCIA HEPÁTICA AGUDA

O papel crucial da disfunção imunológica na evolução do paciente em insuficiência hepática aguda, expressa pela síndrome da resposta inflamatória sistêmica desencadeada pela lesão hepática extensa, tem sido recentemente reconhecido (Sato *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2005; Ikegami *et al.*, 2008; Takikawa & Suzuki, 2008).

Em resposta à lesão hepatocelular de qualquer origem, uma reação inflamatória é desencadeada com ativação simultânea de mediadores pró- e anti-inflamatórios que atuarão na sinalização da regeneração hepática (Antoniades *et al.*, 2008). Os mecanismos iniciais da regeneração hepática envolvem ativação de células de Kupffer e a sua liberação de citocinas pró-inflamatórias, como TNF-alfa e IL-6 (Karp, 2009; Liu, 2009).

Os níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias estão relacionados à gravidade da lesão hepática. Pacientes com insuficiência hepática aguda apresentam concentrações maiores dessas citocinas que aqueles com hepatite aguda ou voluntários sadios (Mao *et al.*, 2011). A magnitude do aumento das citocinas pró-inflamatórias (IL-6, TNF-alfa, IL-1, e IL-8) está relacionada ao desenvolvimento de resposta inflamatória sistêmica (SIRS - *Systemic Inflammatory Response Syndrome*), choque circulatório, necessidade de medicação vasopressora, edema cerebral e morte sem distinção da causa da insuficiência hepática aguda (Wigmore *et al.*, 1998; Nagaki *et al.*, 2000; Streetz *et al.*, 2000; Berry *et al.*, 2010; Chastre *et al.*, 2010).

A resposta anti-inflamatória inicial à lesão hepática envolve a liberação de IL-10 pelas células de Kupffer com inibição da síntese de citocinas pró-inflamatória (TNF-alfa, IL-6, IL-1 e IL-18), controlando a intensidade da cascata inflamatória (Kono *et al.*, 2006; Tilg *et al.*, 2006). A IL-10 recombinante administrada em modelos animais de lesão hepática exerceu um papel hepatoprotetor através da redução da liberação de TNF-alfa (Louis *et al.*, 1997; Nagaki *et al.*, 1999). Yumoto e colaboradores (2002) relataram que níveis mais elevados de IL-10 estavam associados à maior sobrevivência de pacientes com hepatite aguda e insuficiência hepática aguda (Yumoto *et al.*, 2002). Esses estudos sugerem que a resposta anti-inflamatória caracterizada pela produção de IL-10, inicialmente melhora a lesão hepática aguda (Asadullah *et al.*, 2003; Antoniades *et al.*, 2008).

Por outro lado, estudos têm demonstrado a associação de níveis elevados de IL-10 com pior desfecho, óbito ou transplante, em pacientes em insuficiência hepática aguda (Nagaki *et al.*, 2000; Antoniades *et al.*, 2006; Berry *et al.*, 2010). A elevação da IL-10 ocorre em até 6 horas após o início do insulto inflamatório e está associada à liberação de mediadores pró-inflamatórios. Entretanto, modelos experimentais de endotoxemia e estudos em seres humanos de sépsis têm documentado uma resposta bifásica da secreção da IL-10 (Antoniades *et al.*, 2008; Berry *et al.*, 2010). Em pacientes queimados que morreram por sépsis um segundo pico de IL-10 foi identificado, ocorrendo nos estágios mais tardios da endotoxemia e associado com a desativação dos monócitos (Yeh *et al.*, 2000; Antoniades *et al.*, 2008). Possivelmente, na evolução do paciente em insuficiência hepática aguda, o desenvolvimento de SIRS é contrabalanceado por uma forte e persistente resposta anti-inflamatória compensatória (CARS - *Compensatory Anti-inflammatory Response Syndrome*), representada pela elevação da IL-10, caracterizando uma desregulação do sistema imune (Antoniades *et al.*, 2008). Essa dissonância imunológica, com a perda do equilíbrio entre as atividades pró- e anti-inflamatória, determinaria a predisposição para

sépsis, falência de múltiplos órgãos, edema cerebral, hipertensão intracraniana e morte, características do estado terminal do paciente em insuficiência hepática aguda (Nagaki *et al.*, 2000; Jalan *et al.*, 2002; Antoniades *et al.*, 2008; Bemeur *et al.*, 2010; Berry *et al.*, 2010).

A terapia celular, pela ação anti-inflamatória das células-tronco, é uma possível opção terapêutica na insuficiência hepática aguda. A modulação da resposta imunológica e o efeito anti-inflamatório dessas células poderiam, através da estimulação da regeneração hepatocitária, promover a recuperação do fígado lesado (Yagi *et al.*, 2009).

2.4. TERAPIA CELULAR NO TRATAMENTO DA INSUFICIÊNCIA HEPÁTICA AGUDA

A terapia através do uso de células surgiu nos últimos anos como uma alternativa promissora para o tratamento de inúmeras doenças (Almeida-Porada *et al.*, 2010). A maioria dos estudos clínicos avaliou o emprego de terapia celular no tratamento de doenças hepáticas crônicas e metabólicas e os principais tipos celulares empregados foram os hepatócitos e as células da medula óssea (Soto-Gutierrez *et al.*, 2009; Russo & Parola, 2011).

Quadro 2 - Tipos celulares empregados nos estudos de terapia de doenças hepáticas.

Hepatócitos: <ul style="list-style-type: none">- Isolados- Fetais- Imortalizados
Células progenitoras hepáticas
Células-tronco da medula óssea: <ul style="list-style-type: none">- Mesenquimais- Hematopoiéticas

2.4.1. Transplante de hepatócitos

O transplante de hepatócitos isolados foi empregado em diversos experimentos (Horslen & Fox, 2004; Fitzpatrick *et al.*, 2009) e no tratamento de pacientes com doenças crônicas (Mito *et al.*, 1992; Strom *et al.*, 1997; Dhawan *et al.*, 2005; Khan *et al.*, 2008), metabólicas (Ellor *et al.*, 2008; Enns & Millan, 2008; Khan *et al.*, 2008) e em insuficiência hepática aguda (Habibullah *et al.*, 1994; Bilir *et al.*, 2000; Soriano *et al.*, 2001; Schneider *et al.*, 2006; Meyburg *et al.*, 2008).

A limitação do emprego de hepatócitos isolados está relacionada à incapacidade de isolamento de um número suficiente de hepatócitos (Muraca, 2011; Vosough *et al.*, 2011). A utilização de células humanas obtidas de culturas primárias seria a opção ideal, devido à capacidade de síntese de proteínas homólogas e à redução do risco de complicações imunológicas. Os hepatócitos seriam isolados de doadores falecidos ou de parte do fígado de um doador vivo e mantidos em cultura ou congelados (Mitry *et al.*, 2004). Contudo, a fonte dessas células é limitada e a manutenção dessas culturas apresenta dificuldades de viabilidade e de perda de funções celulares (Grad-Itach *et al.*, 2003; Muraca, 2011; Vosough *et al.*, 2011).

Os hepatócitos fetais também podem ser considerados como uma fonte alternativa de células para o transplante celular em modelos animais de insuficiência hepática ou doença metabólica, contudo questões éticas limitam sua aplicabilidade em seres humanos (Horslen & Fox, 2004; Fitzpatrick *et al.*, 2009; Kisseleva *et al.*, 2010).

As linhagens de hepatócitos humanos imortalizados constituem uma boa fonte de células, pois apresentam crescimento ilimitado. Entretanto, além do risco de desenvolvimento de câncer, a expressão fenotípica metabólica dessas células pode estar alterada, inviabilizando a restauração da função hepática após o seu transplante (Nakamura *et al.*, 1997; Fitzpatrick *et al.*, 2009).

2.4.2. Transplante de células da medula óssea

As células-tronco da medula óssea, devido a sua capacidade de diferenciação em diversos tipos celulares, entre eles hepatócitos e colangiócitos, têm sido estudadas como opção terapêutica nas doenças hepáticas agudas e crônicas (Fitzpatrick *et al.*, 2009; Almeida-Porada *et al.*, 2010). Elas apresentam diversas vantagens quando utilizadas como fonte alternativa aos hepatócitos, pois estão prontamente disponíveis e seu número pode ser ampliado *in vitro* e *in vivo*. As células-tronco também seriam mais resistentes à

criopreservação e menos imunogênicas que os hepatócitos (Almeida-Porada *et al.*, 2010; Ismail *et al.*, 2010; Nikeghbalian *et al.*, 2011). O uso de células autólogas, como da medula óssea, eliminaria a necessidade de imunossupressão (Lysy *et al.*, 2008).

A medula óssea é constituída de diferente subpopulações de células, em diversos estágios de diferenciação. A fração mononuclear da medula óssea contém além dos linfócitos e macrófagos, as células-tronco hematopoiéticas e mesenquimais, e pode ser isolada por centrifugação e gradiente de densidade de Ficoll. As células-tronco mesenquimais e hematopoiéticas necessitam isolamento e purificação em cultura e não há padronização dos métodos utilizados nos diferentes laboratórios (Almeida-Porada *et al.*, 2010; Russo & Parola, 2011).

Usualmente a regeneração hepática envolve principalmente hepatócitos maduros. Quando a lesão hepática é tão extensa que compromete o potencial de mitose dos hepatócitos, outros tipos celulares podem ser envolvidos e contribuem com o processo regenerativo (Korbling *et al.*, 2002; Austin & Lagasse, 2003; Cantz *et al.*, 2008; Viebahn & Yeoh, 2008). A segunda fonte de células mobilizadas na regeneração hepática se compõe das células ovais, que são células-tronco ou progenitoras situadas dentro do fígado (Thorgeirsson, 1996; Dalakas *et al.*, 2005; Oh *et al.*, 2007). Uma terceira fonte de células que podem participar da regeneração hepática são as células-tronco da medula óssea (Petersen *et al.*, 1999; Korbling *et al.*, 2002; Austin & Lagasse, 2003; Piscaglia *et al.*, 2008). Estudos com seres humanos (Alison *et al.*, 2000; Theise *et al.*, 2000) e em animais (Petersen *et al.*, 1999; Lagasse *et al.*, 2000; Theise *et al.*, 2000; Oertel & Shafritz, 2008) sugerem que as células da medula óssea podem se diferenciar em hepatócitos e repovoar o fígado sob condições especiais, tal como na radiação subletal de corpo inteiro e na doença hepática crônica (Zhang *et al.*, 2009). Apesar disso, os mecanismos e a cinética de mobilização das células da medula óssea permanecem pouco compreendidos (Zocco *et al.*, 2011).

Em modelos animais, o grau de contribuição das células-tronco da medula óssea parece ser proporcional à extensão de danos e à redução da capacidade regenerativa das células hepáticas (Thorgeirsson & Grisham, 2006; Zocco *et al.*, 2011). Resultados de experimentos em modelos animais sugerem que a indução de lesão parenquimatosa é um pré-requisito para a migração e o repovoamento pelas células-tronco (Schwartz *et al.*, 2002; Muraca, 2011).

Em seres humanos, poucos relatos foram publicados sobre a contribuição das células da medula óssea em pacientes submetidos à ressecção parcial do fígado (De Silvestro *et al.*, 2004; Di Campli *et al.*, 2005; Gehling *et al.*, 2005; Lemoli *et al.*, 2006; Herencia *et al.*, 2011;

Zocco *et al.*, 2011). Alguns artigos mostraram envolvimento dessas células na regeneração hepática, enquanto outros autores não descreveram esse efeito (Di Campli *et al.*, 2005; Menegazzo *et al.*, 2008; Herencia *et al.*, 2011). Os resultados relatados também foram conflitantes em termos do tipo de célula-tronco mobilizada (Di Campli *et al.*, 2005). Essas diferenças estão provavelmente relacionadas à escassez e à heterogeneidade dos pacientes avaliados e aos diferentes desenhos de estudos (Zocco *et al.*, 2011).

O microambiente do fígado parece ser crucial para a regulação do equilíbrio homeostático hepático e alguns sinais químicos poderiam estimular o recrutamento de células-tronco, tanto do próprio fígado, como da medula óssea através da circulação (Piscaglia *et al.*, 2008; Zocco *et al.*, 2011). Aparentemente o processo de recrutamento celular é finamente regulado por variações nos níveis de citocinas e enzimas proteolíticas envolvidas na degradação da matriz e na regeneração hepática (Kollet *et al.*, 2003; Dalakas *et al.*, 2010; Herencia *et al.*, 2011). As moléculas como o SCF (*Stem Cell Factor*) e SDF-1 (*Stromal Cell-Derived Factor-1*) têm papel fundamental na estimulação da proliferação e da mobilização das células-tronco e seus níveis podem ser influenciados pelo grau de lesão hepática (Hatch *et al.*, 2002; Kollet *et al.*, 2003; Bacarani *et al.*, 2006; Swenson *et al.*, 2008; Herencia *et al.*, 2011). Alguns fatores de crescimento, como o HGF, o TGF-alfa e o G-CSF (*Granulocyte-Colony Stimulating Factor*) também poderiam estar relacionados à mobilização celular, atuando sobre as células-tronco do próprio fígado e da medula óssea, como um fator quimiotático e mitogênico autócrino e parácrino (Yannaki *et al.*, 2005; Gaia *et al.*, 2006; Piscaglia *et al.*, 2008; Jin *et al.*, 2010; Herencia *et al.*, 2011).

Os mecanismos pelos quais essas células da medula óssea exercem seus efeitos benéficos sobre a regeneração hepática não estão completamente esclarecidos e permanecem como uma questão em aberto (Quadro 3). Diversos possíveis efeitos têm sido sugeridos e envolveriam a ampliação do número de hepatócitos por transdiferenciação ou por fusão celular, o estímulo à regeneração através da liberação de fatores tróficos, a inibição da apoptose, e a modulação do processo inflamatório local e sistêmico (Houlihan & Newsome, 2008; Almeida-Porada *et al.*, 2010). Por exemplo, as células-tronco mesenquimais são conhecidas por secretar diversas moléculas bioativas, que através de um efeito parácrino sobre a dinâmica celular local, estimulam a regeneração das células parenquimatosas endógenas e a recuperação dos tecidos (Caplan & Dennis, 2006; Parekkadan *et al.*, 2007; Parekkadan *et al.*, 2007; Meirelles Lda *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2009; Lin *et al.*, 2011). Em um modelo de lesão hepática aguda por D-Galactosamina, o tratamento com meio condicionado de células-tronco mesenquimais aumentou a sobrevivência, melhorou a

regeneração hepática, com redução de IL-6, IL-1 e TNF-alfa e com aumento de IL-10 (van Poll *et al.*, 2008).

Os efeitos anti-inflamatórios locais e sistêmicos das células-tronco provavelmente envolvem a liberação de prostaglandina E2 e IL-10 e a redução da produção de citocinas pró-inflamatórias como interferon-gama (INF-gama), TNF-beta e IL-1 (Aggarwal & Pittenger, 2005; van Poll *et al.*, 2008; Giuliani *et al.*, 2011). A IL-10 e o TNF-alfa também podem inibir a regeneração das células estreladas hepáticas e a síntese da matriz (Parekkadan *et al.*, 2007; Lin *et al.*, 2010). Outros mediadores também têm sido identificados e podem explicar os efeitos anti-apoptóticos e mitogênicos das células-tronco. A produção de SDF-1, IGF-1 (*Insulin-like Growth Factor 1*), VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) e TGF-beta pode ter efeitos na inibição da morte celular programada (Togel *et al.*, 2007; van Poll *et al.*, 2008; Block *et al.*, 2009). A liberação de HGF, IL-6, TNF-alfa e TLR3 (*Toll-Like Receptor 3*) pode estimular a proliferação e a manutenção das funções hepatocitária (Liu *et al.*, 2006; Tomchuck *et al.*, 2008; Lin *et al.*, 2011).

Quadro 3 - Efeitos das células-tronco da medula óssea no tecido hepático.

Proteção dos hepatócitos
Redução da apoptose
Estimulação da regeneração hepática
Modulação da resposta inflamatória

O uso clínico de células-tronco derivadas da medula óssea para a reparação do fígado permanece no campo experimental (Almeida-Porada *et al.*, 2010). Diversos ensaios clínicos em seres humanos realizados nos últimos anos avaliaram o potencial do transplante das células-tronco da medula óssea no tratamento do doente hepático crônico. Apesar de promissores, esses estudos ainda não são conclusivos e as diferenças metodológicas, como o tipo de célula infundida, dificultam a comparação entre eles (am Esch *et al.*, 2005; Gordon *et al.*, 2006; Mohamadnejad *et al.*, 2007; Mohamadnejad *et al.*, 2007; Levicar *et al.*, 2008). De maneira geral, os resultados desses ensaios têm demonstrado que o transplante dessas células

é seguro e exequível (Lyra *et al.*, 2007; Lyra *et al.*, 2010), contudo estudos controlados e randomizados serão ainda necessários para a avaliação de sua eficácia (Almeida-Porada *et al.*, 2010; Russo & Parola, 2011; Vosough *et al.*, 2011).

No tratamento de pacientes em insuficiência hepática aguda não localizamos nenhum estudo que avaliasse o potencial terapêutico do transplante de células da medula óssea. Em um relato de caso, foi descrito o uso clínico de células mononucleares da medula óssea em um paciente em insuficiência hepática aguda de causa medicamentosa. Apesar de apresentar uma rápida melhora da função hepática após a infusão portal de células autólogas, o paciente morreu 50 dias após o procedimento devido à infecção bacteriana (Gasbarrini *et al.*, 2007).

No campo da experimentação animal, a maioria dos estudos sobre a infusão de células da medula óssea foi realizado em modelos de lesão hepática crônica (Gilchrist & Plevris, 2010). As publicações com modelos de insuficiência hepática ou lesão aguda são restritas (Tabela 1). Somente 16 artigos foram localizados, sendo 2 realizados no Centro de Terapia Gênica (CTG) do HCPA (Belardinelli *et al.*, 2008; Baldo *et al.*, 2010). Os artigos existentes são heterogêneos quanto ao agente provocador da lesão, ao animal de experimentação, ao tipo de células empregado, ao modo de administração e aos desfechos observados, dificultando a comparação dos resultados. Os experimentos em murinos são predominantes, tanto em ratos como em camundongos, assim como os modelos tóxicos prevalecem sobre os modelos cirúrgicos, sendo utilizado o paracetamol, a D-galactosamina e principalmente o tetracloreto de carbono (CCl₄). A maioria dos estudos empregou todas as células da medula óssea ou somente a fração mononuclear e a via endovenosa foi a principal forma de administração das células, preferencialmente pela veia da cauda. Os objetivos dos ensaios compreendiam a avaliação da capacidade de migração, de enxertia e de transdiferenciação das células da medula óssea no tecido hepático lesado, e dos efeitos dessas células sobre a regeneração e a função do fígado. Em geral os experimentos sugerem um efeito positivo da terapia celular sobre a alta mortalidade dos modelos experimentais de insuficiência hepática aguda.

Tabela 1 – Artigos originais sobre transplante de células da medula óssea em modelos animais de insuficiência hepática aguda.

Autores, ano de publicação	Modelo de IHA	Animais	Tipos celulares (número de células)	Doadores singênicos	Locais de administração	Cápsulas	Desfechos observados
Liu et al., 2005	HP 90%	Ratos Wistar	MOT (3×10^7) e HTC (3×10^7)	Sim	Peritônio	APA	Sobrevida em 14 dias
Liu et al., 2006	HP 90%	Ratos Wistar	MOT (3×10^7) e HTC (3×10^7)	Sim	Peritônio	APA	Sobrevida e peso lobos remanescentes em 14 dias, ALT, AST, albumina, HGF
Liu et al., 2009	HP 90%	Ratos Wistar	TMMO (3×10^7) e HTC (3×10^7)	Sim	Baço	APA	Sobrevida em 14 dias
Nakamura et al., 1997	HP 90%	Ratos Lewis	MOT (2×10^8) e HTC (2×10^8)	Sim	Baço	Não	Sobrevida em 96 horas, glicemia
Zhang et al., 2009	HP 70% + retrorsina	Ratos Fischer 344	MOT (1×10^7) e HTC (2×10^6)	Não	Veia porta e peniana	Não	Sobrevida e peso lobos remanescentes em 28 dias, ALT, AST, bilirrubinas
Tokai et al., 2009	HP70% + ligadura pedículo LD	Ratos Sprague-Dawley	MOT (2×10^6)	Não	Baço	Não	Sobrevida em 48 horas, ALT, AST, bilirrubinas
Dahlke et al., 2003	CCL ₄ + retrorsina	Ratos Lewis e Lewis.7B	MOT (1×10^8)	Não	Veia da cauda	Não	Sobrevida e peso lobos remanescentes em 14 dias, capacidade de enxertia
Jung et al., 2006	CCL ₄	Camundongo C57BL6	MOT (1×10^7)	Sim	Veia da cauda	Não	ALT, AST, bilirrubinas, albumina, expressão de SDF-1
Cho et al., 2009	CCL ₄	Camundongo C57BL6	MMO (1×10^6), TMMO (1×10^6) e THMO (1×10^6)	Sim	Veia da cauda	Não	Capacidade de enxertia
Jin et al., 2009	CCL ₄	Camundongo BALB/c	MMO (1×10^6)	Não	Veia da cauda	Não	ALT, AST, expressão de PCNA e albumina
Jin et al., 2010	CCL ₄	Camundongo BALB/c	MMO (1×10^6)	Não	Veia da cauda	Não	Expressão de PCNA e albumina
Jin et al., 2011	CCL ₄	Camundongo BALB/c	MMO (5×10^6)	Não	Veia da cauda	Não	ALT, AST, expressão de PCNA e albumina
Baldo et al., 2010	CCL ₄	Ratos Wistar	MMO (1×10^6)	Não	Veia porta	Não	Sobrevida em 72 horas, ALT, mitoses e apoptoses
Makowka et al., 1980	D-galactosamina	Ratos Lewis	MOT (4×10^7) e HTC (4×10^7)	Sim	Peritônio	Não	Sobrevida em 20 dias
Shang et al., 2009	D-galactosamina	Coelhos	MMO (2×10^7)	Não	Fígado	Não	ALT, AST, expressão de VEGF e anti-CD34
Belardinelli et al., 2008	Paracetamol	Ratos Wistar	MMO (1×10^6)	Não	Veia porta	Não	Sobrevida em 72 horas, ALT, mitoses

IHA=insuficiência hepática aguda; HP=hepatectomia parcial; LD=lobo direito; MOT=medula óssea total; HTC=hepatócito; TMMO=tronco mesenquimais da medula óssea; THMO=tronco hematopoiéticas da medula óssea; MMO=mononucleares da medula óssea; APA= Alginato-poli-L-lisina-alginato; ALT=alanino aminotransferase; AST=aspartato aminotransferase; HGF=*Hepatocyte Growth Factor*; PCNA=*Proliferating Cell Nuclear Antigen*; SDF-1=*Stromal cell Derived Factor-1*; VEGF=*Vascular Endothelial Growth Factor*; CCL₄= tetracloreto de carbono.

2.5. MODELOS EXPERIMENTAIS DE INSUFICIÊNCIA HEPÁTICA AGUDA

Um dos principais fatores limitantes do sucesso do tratamento clínico dos pacientes em insuficiência hepática aguda é o incompleto conhecimento de seus processos patofisiológicos (Liu, 2009). Os modelos animais são importantes instrumentos para a ampliação do entendimento da patogênese da insuficiência hepática aguda, da evolução da doença, do manejo das complicações e dos mecanismos envolvidos na regeneração hepática (Belanger & Butterworth, 2005; Berry *et al.*, 2010). O desenvolvimento de modelos experimentais adequados possibilita, além de maior compreensão da patofisiologia, o desenvolvimento e o refinamento da terapêutica na insuficiência hepática aguda (Newsome *et al.*, 2000; Martins *et al.*, 2008).

Nos últimos 30 anos diversos modelos animais de insuficiência hepática aguda foram propostos, com limitado sucesso. Geralmente, eles não conseguem reproduzir a síndrome completa e refletem somente o aspecto particular da falência hepática (Rahman & Hodgson, 2000; Belanger & Butterworth, 2005; Martins *et al.*, 2008). O modelo ideal deveria preencher os requisitos propostos por Terblanche & Hickman e descritos no Quadro 4 (Terblanche & Hickman, 1991).

As abordagens cirúrgica e farmacológica têm sido empregadas em modelos animais de insuficiência hepática aguda. No modelo farmacológico são utilizadas drogas hepatotóxicas, como o paracetamol, a D-galactosamina, o CCl₄, a tioacetamida e, mais recentemente, a concanavalina A e os LPS (Rahman & Hodgson, 2000; Filipponi & Mosca, 2001). No Centro de Terapia Gênica do HCPA o paracetamol e o CCl₄ foram empregados em modelos animais de lesão hepática aguda (Belardinelli *et al.*, 2008; Baldo *et al.*, 2010). A grande limitação desses modelos tóxicos é a imprevisibilidade da extensão da lesão hepática devido à variabilidade metabólica individual e toxicidade extra-hepática (Rahman & Hodgson, 2000; Filipponi & Mosca, 2001; Belanger & Butterworth, 2005).

Os modelos cirúrgicos podem ser divididos em três grupos: hepatectomia parcial, hepatectomia total e desvascularização parcial e total do fígado (Filipponi & Mosca, 2001; Martins *et al.*, 2008). A maior limitação dos modelos cirúrgicos é a dependência da experiência e da habilidade técnica do cirurgião que podem interferir na sua reprodutibilidade (Rahman & Hodgson, 2000; Belanger & Butterworth, 2005).

O modelo anepático foi originalmente entendido como a reprodução da insuficiência hepática aguda pela ausência de total das funções metabólicas, sintéticas e de biotransformação. Atualmente, grande importância tem sido dada à patofisiologia e à

resposta inflamatória do fígado lesado e necrótico, aspectos não contemplados por esse modelo (Rahman & Hodgson, 2000).

Quadro 4 - Requisitos para modelo animal ideal de insuficiência hepática aguda.

Reversibilidade	A insuficiência hepática aguda produzida precisa ser potencialmente reversível de modo que o animal possa responder e sobreviver ao tratamento utilizado.
Reprodutibilidade	Desfechos reprodutíveis são essenciais na padronização do modelo animal.
Morte por falência hepática	O curso dos eventos após a lesão deve refletir o padrão clínico humano e a morte deve resultar diretamente da lesão hepática.
Janela terapêutica	O tempo decorrente entre a injúria hepática e a morte deve ser suficiente para permitir o tratamento e a observação dos seus efeitos.
Modelos de grandes animais	Para a avaliação seriada de sangue e tecido são necessários grandes animais, porém a praticidade faz com que a imensa maioria dos estudos seja em modelo murino.
Risco mínimo	As técnicas e as toxinas utilizadas devem oferecer risco mínimo ao pessoal do laboratório.

Fonte: Terblanche & Hickman, 1991.

A hepatectomia parcial em ratos e camundongos tem sido utilizada como modelo experimental em estudos de regeneração hepática e de insuficiência hepática aguda (Martins *et al.*, 2008). As características anatômicas do fígado de ratos e camundongos permitem a realização de diferentes graus de ressecção da massa hepática (Figura 1), conforme a combinação dos lobos removidos (Aller *et al.*, 2009).

A hepatectomia parcial de até 70% de ressecção produz intensa regeneração e sobrevivência de quase 100% em ratos (Emond *et al.*, 1989), sendo o principal modelo utilizado nos estudos de regeneração hepática (Aller *et al.*, 2009). Ressecções hepáticas mais extensas

(70 a 80%) induzem à insuficiência, e estão associadas à maior mortalidade (Panis *et al.*, 1997).

A sobrevivência após ressecção maciça deve contar com uma massa hepática mínima para manter a vida e as funções, além de possibilitar a regeneração. Vários autores têm utilizado a hepatectomia de 90% como modelo experimental de insuficiência hepática aguda (Madrahimov *et al.*, 2006; Martins *et al.*, 2008; Aller *et al.*, 2009).

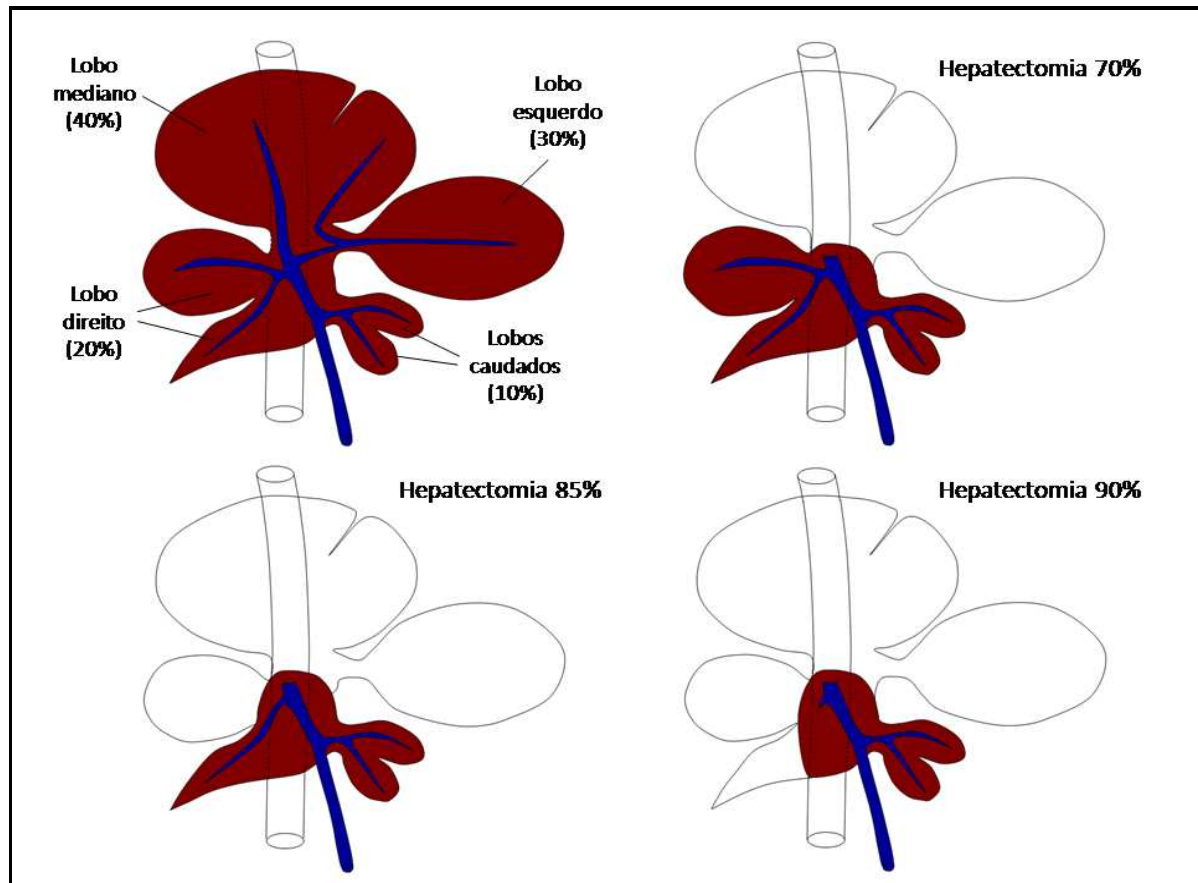


Figura 1 - Modelos de hepatectomia parcial em ratos.

A cinética de regeneração hepática e a quantidade de tecido hepático remanescente compatível com a vida não são idênticas entre as diferentes espécies. Roedores podem sobreviver à hepatectomia de 95%, enquanto que os humanos apenas toleram a retirada de 70 a 80% do volume do fígado original (Leelaudomlipi *et al.*, 2002; Madrahimov *et al.*, 2006; Martins *et al.*, 2008). A transposição para os seres humanos dos resultados obtidos com os modelos animais de regeneração e de insuficiência hepática aguda pode ser restrita e deve ser feita com cautela. Apesar de algumas limitações, o uso de modelos de hepatectomia parcial em roedores proporciona ferramentas indispensáveis ao estudo de muitos fenômenos

relacionados à lesão hepática aguda, ao processo regenerativo e às repercussões sistêmicas da insuficiência hepática aguda.

2.6. ISOLAMENTO CELULAR EM MICROCAPSULAS DE ALGINATO DE SÓDIO

O envolvimento de células por membranas semi-permeáveis antes do transplante tem sido utilizado como estratégia de isolamento e de imobilização de células para a prevenção da rejeição por parte do hospedeiro e da migração celular para outras partes do corpo. As substâncias poliméricas, como o alginato de sódio, proporcionam um envoltório semi-permeável, que possibilita, conforme o diâmetro dos poros, a entrada de nutrientes e oxigênio e a saída de proteínas sintetizadas pelas células, e impede a ação de macromoléculas, como os anticorpos. O isolamento imunológico das células transplantadas dentro das microcapsulas permite a ampliação da sobrevivência e da viabilidade celular, além de evitar a necessidade de imunossupressão (Orive *et al.*, 2004; Hernandez *et al.*, 2010).

As microcapsulas consistem de esferas de polímeros de 400 a 800 micrômetros (Maria-Engler *et al.*, 2001) e podem ser aplicadas na cavidade peritoneal, no fígado, no baço ou no músculo (Orive *et al.*, 2004; Rahman *et al.*, 2005). Para a sua produção, as células são suspensas em uma substância polimérica que é perfundida através de um sistema encapsulador. Um fluxo de ar aplicado sobre a ponta da agulha do perfusor produz microgotas, que ao caírem em uma solução polimerizadora (ex.: cloreto de cálcio) formam o envoltório capsular (Zimmermann *et al.*, 2005).

Grande variedade de substâncias naturais (alginato, colágeno e quitosana) e sintéticas (celulose e silicone) tem sido utilizada na produção de microcapsulas. O alginato de sódio, por ser barato e não imunogênico, é uma das substâncias mais amplamente empregadas na encapsulação de diferentes tipos celulares (Orive *et al.*, 2004; Murua *et al.*, 2008; Barminko *et al.*, 2011). A microencapsulação celular foi utilizada preferencialmente no desenvolvimento de órgãos bioartificiais e estudo de tratamentos de doenças genéticas com produção enzimática deficiente e de doenças endócrinas, como o diabetes, o hipotireoidismo e o hipoparatiroidismo (Maria-Engler *et al.*, 2001; Zimmermann *et al.*, 2005; Simpson *et al.*, 2006). No CTG do HCPA, o alginato de sódio tem sido utilizado para o isolamento de linhagens celulares geneticamente modificadas (Lagranha *et al.*, 2008; Mayer *et al.*, 2010; Matte *et al.*, 2011; Baldo *et al.*, 2012) para a terapia celular experimental de doenças genéticas.

Diversos estudos avaliaram o efeito da microencapsulação em modelos de insuficiência hepática aguda como uma alternativa à infusão direta de hepatócitos. Alguns resultados sugerem que o isolamento dos hepatócitos (alogênicos e xenogênicos), e seu implante tanto na cavidade peritoneal (Wong & Chang, 1986; Demetriou *et al.*, 1988; Hamazaki *et al.*, 2002; Mai *et al.*, 2005), como no baço (Aoki *et al.*, 2005) apresentam efeito benéfico. Os autores sugerem que os hepatócitos encapsulados auxiliam na manutenção das funções vitais hepáticas (Mai *et al.*, 2005) e na regulação inflamatória da regeneração hepática (Rahman *et al.*, 2005; Sgroi *et al.*, 2011), determinando aumento da sobrevivência dos animais em insuficiência hepática aguda. Alguns estudos, contudo, não identificaram diferença na sobrevivência entre os animais que receberam hepatócitos encapsulados daqueles em que foram administradas células livres diretamente no peritônio (Aoki *et al.*, 2005; Liu & Chang, 2005; Liu & Chang, 2006; Sgroi *et al.*, 2011).

Poucos estudos avaliaram o potencial terapêutico da encapsulação das células da medula óssea na insuficiência hepática aguda (Hernandez *et al.*, 2010). Liu e colaboradores imobilizaram células da medula óssea de ratos doadores singênicos em microcápsulas de alginato de sódio e transplantaram no peritônio (Liu & Chang, 2005; Liu & Chang, 2006) e no baço (Liu & Chang, 2009). O aumento na sobrevivência dos animais foi superior aos que receberam células da medula óssea livre e hepatócitos livres ou encapsulados. Recentemente, a viabilidade celular e a manutenção da capacidade funcional das células-tronco mesenquimais humanas encapsuladas foi comprovada. As células permanecem viáveis e funcionais mesmo no microambiente das cápsulas. Na presença de estímulos pró-inflamatórios, como o TNF-alfa, as células-tronco promoveram a secreção de um painel de citocinas reguladoras e de fatores de crescimento (Barminko *et al.*, 2011). Esses resultados sugerem um potencial terapêutico das células-tronco na insuficiência hepática aguda, cujo mecanismo envolveria possivelmente a produção de efeitos tróficos e imuno moduladores da resposta inflamatória local e sistêmica pelas células da medula óssea imobilizadas.

3. JUSTIFICATIVA

3. JUSTIFICATIVA

A insuficiência hepática aguda, apesar do avanço nas terapias de suporte obtido nas últimas décadas, tem como desfecho mais comum a morte. O conhecimento incompleto de seus processos patofisiológico e dos mecanismos de regeneração do tecido hepático são fatores que limitam o sucesso do tratamento dos pacientes em insuficiência hepática aguda.

Uma parcela de pacientes, devido à capacidade de regeneração hepática, pode apresentar recuperação espontânea, mas em muitos casos o único tratamento efetivo é o transplante de fígado. Infelizmente, o transplante não está disponível para todos os pacientes e muitos evoluem para óbito enquanto aguardam doação de órgão. O transplante hepático possibilita a sobrevivência da maioria dos pacientes, mas determina a necessidade de utilização continuada de medicações imunossupressoras, as quais não são isentas de efeitos colaterais, tanto imediatos como em longo prazo. Os custos do transplante, da medicação imunossupressora, do acompanhamento clínico e laboratorial, e do tratamento das complicações são bastante significativos.

Por essas razões, alternativas ao transplante de fígado devem ser buscadas. Sistemas de suporte que desempenhassem as funções hepáticas vitais foram propostos e poderiam permitir a manutenção da vida, impedir sequelas neurológicas irreversíveis, permitir a regeneração do fígado e propiciar mais tempo para a obtenção de um enxerto. Estudos sobre as alternativas ao transplante, como a terapia celular, e que elucidem os mecanismos do processo regenerativo hepático e os seus efeitos sistêmicos, podem ampliar o conhecimento e ajudar no aprimoramento da assistência ao paciente em insuficiência hepática aguda com consequente redução da mortalidade.

4. OBJETIVOS

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GERAL

Estudar os efeitos da terapia com células imobilizadas em microcápsulas de alginato de sódio na sobrevivência e na regeneração hepática em ratos Wistar submetidos à insuficiência hepática aguda por hepatectomia.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos são:

- Padronizar um modelo de insuficiência hepática aguda por hepatectomia em ratos Wistar que possibilite uma janela terapêutica adequada ao estudo da terapia celular (Fase 1);
- Avaliar os efeitos da terapia com células da medula óssea total (MOT) e fração mononuclear (FM) e células HepG2, contidas em microcápsulas de alginato de sódio colocadas no peritônio de ratos Wistar em insuficiência hepática aguda por hepatectomia extensa, sobre os níveis de glicose e lactato sanguíneos e sobre a sobrevivência em 10 dias (Fase 2);
- Avaliar os efeitos da terapia com células da medula óssea total e fração mononuclear da medula óssea, contidas em microcápsulas de alginato de sódio colocadas no peritônio de ratos Wistar em insuficiência hepática aguda por hepatectomia extensa, em 5 diferentes momentos nas primeiras 72 horas após hepatectomia, sobre a proliferação hepatocitária e os níveis séricos de citocinas e de fatores de crescimento (Fase 3).

5. MATERIAL E MÉTODOS

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. ASPECTOS GERAIS

Essa tese foi desenvolvida no Programa de Pós-Graduação Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e foi composta de diferentes etapas. Cada etapa apresentou objetivos distintos e métodos próprios. Por outro lado, algumas técnicas foram comuns em todas as fases. A descrição abaixo reproduziu o desenvolvimento do projeto em cada uma das suas fases:

- Fase 1: padronização de um modelo de insuficiência hepática aguda por hepatectomia em ratos;
- Fase 2: avaliação dos efeitos de diferentes tipos celulares contidos em microcápsulas de alginato de sódio na sobrevida dos animais submetidos ao modelo padronizado;
- Fase 3: avaliação dos efeitos das células encapsuladas sobre o processo de regeneração hepática em diferentes momentos após a hepatectomia.

5.2. HIPÓTESES

Por se tratar da etapa de padronização de um modelo experimental para posterior aplicação em ensaio terapêutico, não foi formulada hipótese específica para a primeira fase do estudo.

Para a segunda fase a hipótese formulada foi de que células, da medula óssea ou hepatócitos de uma linhagem imortalizada, contidas em microcápsulas de alginato de sódio, quando colocadas no peritônio de ratos Wistar submetidos à insuficiência hepática aguda por hepatectomia de 90%, seriam capazes de aumentar a sobrevida dos animais após o procedimento.

Na terceira fase foram elaboradas as hipóteses de que as células da medula óssea, em sua totalidade ou apenas a fração mononuclear, administradas da mesma forma e na mesma situação acima descritas, modificariam a proliferação hepatocitária e os níveis sanguíneos de citocinas relacionadas ao processo de regeneração e inflamação nas primeiras 72 horas após o procedimento.

5.3. DELINEAMENTO

Trata-se de um estudo de experimental, controlado e com montagem natural com ratos Wistar em insuficiência hepática aguda secundária à hepatectomia extensa.

5.3.1. Fator em estudo

Terapia com células contidas em microcápsulas de alginato de sódio e administradas na cavidade abdominal ao final da hepatectomia:

- HepG2 (Fase 2);
- Fração mononuclear da medula óssea (Fases 2 e 3);
- Medula óssea total (Fases 2 e 3);
- Sem células – controle (Fases 2 e 3).

5.3.2. Desfechos

- Sobrevida em 3 e 10 dias (Fases 1 e 2);
- Níveis sanguíneos de glicose e lactato (Fases 1 e 2);
- Proliferação hepatocitária: número de hepatócitos em mitoses (Fase 3) e peso dos lobos hepáticos remanescentes (Fases 1, 2 e 3);
- Níveis séricos de citocinas e de fatores de crescimento relacionados à regeneração hepática e à inflamação (Fase 3).

5.3.3. Grupos de estudo

Após a padronização do modelo de insuficiência hepática aguda, os ratos foram submetidos à hepatectomia parcial de 90% e, de forma aleatória, foram distribuídos em grupos, caracterizados pelo tipo de intervenção:

a) Controle:

- Grupo sem células: microcápsulas de alginato de sódio vazias (Fases 1, 2 e 3);

b) Intervenção:

- Grupo fração mononuclear 1×10^6 : microcápsulas de alginato de sódio com 1×10^6 células da fração mononuclear da medula óssea por rato (Fases 2 e 3);
- Grupo fração mononuclear 3×10^7 : microcápsulas de alginato de sódio com 3×10^7 células da fração mononuclear da medula óssea por rato (Fase 2);
- Grupo medula óssea total 3×10^7 : microcápsulas de alginato de sódio com 3×10^7 células da medula óssea total por rato (Fases 2 e 3);

- Grupo HepG2 5×10^7 : microcápsulas de alginato de sódio com 5×10^7 células HepG2 por rato (Fase 2).

5.3.4. Desenhos de estudo

- Fase 1: experimento para padronização de um modelo de insuficiência hepática aguda por hepatectomia parcial em ratos Wistar que apresentasse alta mortalidade com uma janela terapêutica de 48 a 72 horas. Avaliação de diferentes extensões da ressecção hepática, da suplementação de glicose e do regime anestésico. Padronização dos procedimentos experimentais.

- Fase 2: experimento para avaliação do efeito de diferentes tipos celulares contidos em microcápsulas de alginato de sódio na sobrevida em 10 dias de ratos em insuficiência hepática aguda por hepatectomia de 90%.

- Fase 3: experimento para avaliação dos efeitos das células da medula óssea, total e fração mononuclear sobre a regeneração hepática e os níveis sanguíneos de citocinas e fatores de crescimento envolvidos no processo de regeneração e inflamação em ratos em insuficiência hepática aguda por hepatectomia de 90% às 6, 12, 24, 48 e 72 horas após a hepatectomia.

5.4. AMOSTRA E AMOSTRAGEM

5.4.1. Critérios de inclusão

Foram incluídos nas análises das diferentes fases deste projeto somente os ratos que estavam vivos ao final do procedimento de hepatectomia parcial.

5.4.2. Critérios de exclusão

Em todas as fases do projeto foram excluídos os animais nos quais houve algum problema de técnica cirúrgica que pudesse interferir nos desfechos estudados, como sangramento significativo durante e após a hepatectomia e deiscência de sutura. Para a segunda fase do estudo foram excluídos os ratos que morreram na primeira hora após a hepatectomia. Na terceira fase, todos os animais que faleceram durante o período de acompanhamento foram excluídos.

5.4.3. Tamanho amostral

Para a realização da Fase 1 foi arbitrariamente estabelecido um número mínimo de 12 animais em cada grupo. Para a Fase 2 foi estimado um número de 15 animais por grupo, considerando uma expectativa de sobrevida de 70% no animais tratados e de 5% no grupo controle, um nível de significância de 0,05 e um poder estatístico de 80%. Na terceira fase foi estabelecido um número arbitrário de 5 ratos por momento de avaliação, totalizando 25 animais para cada regime terapêutico. Este número se baseou na previsão do número de animais necessários no grupo controle para que o tamanho necessário em cada etapa fosse atingido, devido à alta mortalidade do modelo.

5.5. VARIÁVEIS

As variáveis avaliadas estão descritas abaixo nas Tabela 2 e Tabela 3.

Tabela 2 – Lista de variáveis não laboratoriais avaliadas.

Variável	Definição	Unidade	Tipo de variável	Momento da avaliação
Peso corporal	Peso corporal dos animais	Gramas	Quantitativa contínua	Antes e a cada 24 horas após a hepatectomia parcial
Peso dos lobos retirados	Peso dos lobos hepáticos avaliado imediatamente após a hepatectomia parcial	Gramas	Quantitativa contínua	Imediatamente após a hepatectomia parcial
Razão peso dos lobos remanescentes em relação ao peso corporal	Peso dos lobos hepáticos retirados dividido pelo peso corporal avaliado antes da hepatectomia multiplicado por 100	%	Quantitativa contínua	Imediatamente após a hepatectomia parcial
Peso dos lobos remanescentes	Peso dos lobos hepáticos remanescentes avaliado imediatamente após o sacrifício	Gramas	Quantitativa contínua	6, 12, 24, 48 e 72 horas após a hepatectomia parcial
Razão peso dos lobos remanescentes em relação ao peso corporal do dia do sacrifício	Peso dos lobos hepáticos remanescentes avaliado imediatamente após o sacrifício dividido pelo peso corporal mensurado no dia do sacrifício multiplicado por 100	%	Quantitativa contínua	6, 12, 24, 48 e 72 horas após a hepatectomia parcial
Tempo de cirurgia	Intervalo de tempo entre o momento da abertura e o fechamento da parede abdominal	Minutos	Quantitativa contínua	Durante a hepatectomia parcial
Recuperação anestésica	Recuperação do estado de consciência	Sim/Não	Catagórica	Imediatamente após a hepatectomia parcial.
Tempo de recuperação anestésica	Intervalo de tempo entre o final da cirurgia e a recuperação anestésica	Minutos	Quantitativa contínua	Imediatamente após a hepatectomia parcial
Atividade	Avaliação subjetiva do grau de intensidade da atividade dos animais após a hepatectomia parcial: Ativo: movimento corporal espontâneo; Hipoativo: movimento corporal somente após estímulo tátil; Não ativo: sem resposta ao estímulo tátil	Ativo / Hipoativo / Não ativo	Catagórica	1 e 6 horas e diariamente até 10 dias após a hepatectomia parcial
Sobrevida	Número de animais vivos dividido pelo número de animais submetidos à hepatectomia e elegíveis multiplicado por 100	%	Quantitativa contínua	1 e 6 horas e diariamente até 10 dias após a hepatectomia parcial

Tabela 3 – Lista de variáveis laboratoriais avaliadas.

Variável	Definição	Unidade	Tipo de variável	Momento da avaliação
Glicose sanguínea	Valor da glicose em sangue total	mg/dL	Quantitativa contínua	Antes e 1, 6, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168 e 240 horas após a hepatectomia parcial
Lactato sanguíneo	Valor do lactato em sangue total	mmol/L	Quantitativa contínua	Antes e 1, 6, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168 e 240 horas após a hepatectomia parcial
Hepatócitos em mitose	Média do número de hepatócitos com núcleo em mitose por campo de grande aumento (400x) avaliado em 10 campos	Número de hepatócitos em mitose	Quantitativa discreta	6, 12, 24, 48 e 72 horas após a hepatectomia parcial
IL-6 sérica	Valor de IL-6 no soro	pg/mL	Quantitativa contínua	0, 6, 12, 24, 48 e 72 horas após a hepatectomia parcial
TGF-beta sérico	Valor de TGF-beta no soro	ng/mL	Quantitativa contínua	0, 6, 12, 24, 48 e 72 horas após a hepatectomia parcial
PDGF-BB sérico	Valor de PDGF-BB no soro	ng/mL	Quantitativa contínua	0, 6, 12, 24, 48 e 72 horas após a hepatectomia parcial

IL-6=Interleucina-6; TGF-beta=*Transforming Growth Factor-beta*; PDGF-BB=*Platelet-Derived Growth Factor-BB*; mg/dL=miligramma por decilitro; mmol/L=milimol por litro; pg/mL=picograma por mililitro; ng/mL=nanograma por mililitro.

5.6. PROCEDIMENTOS

5.6.1. Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos adultos adquiridos pela Unidade de Experimentação Animal (UEA). Antes da realização dos experimentos os animais permaneciam em quarentena por 15 dias na UEA em gaiolas com no máximo cinco animais. Eles eram alimentados com ração e água “*ad libitum*”, em ciclo de sono vigília de 12 horas, sob temperatura controlada (22°C).

Todos os procedimentos e avaliações realizados em cada rato eram registrados nos instrumentos individuais de acompanhamento (Anexos 1, 2 e 3). Antes do procedimento cirúrgico e diariamente após a hepatectomia os ratos eram pesados em balança eletrônica digital própria para a pesagem de roedores. As doses individuais dos anestésicos e da suplementação diária de glicose intraperitoneal eram calculadas a partir do peso corporal. Imediatamente após a hepatectomia os animais eram mantidos em gaiolas dentro de incubadoras com temperatura controlada (24 a 25°C) e suplementação de oxigênio (1 litro/minuto) por 24 horas. O acesso à alimentação e à água era livre. À água foi acrescida glicose em concentração de 20%.

A recuperação anestésica e o momento do despertar eram estritamente observados durante a primeira hora após o final da cirurgia. Após esse período eram realizadas avaliações periódicas do grau de atividade física dos animais vivos às 6 horas e de 24/24 horas, até final do período de acompanhamento ou o óbito do animal.

As doses individuais de glicose, diluídas em 2 mL de água de injeção, eram administradas na cavidade peritoneal por paracentese abdominal com agulha e seringa de insulina. A dose de glicose aplicada no transoperatório era diluída no veículo da microcápsulas de alginato de sódio (3 mL de PBS). Nos animais submetidos à hepatectomia de 85% e que receberam glicose a dose aplicada foi de 100 mg, independentemente do peso corporal. Os ratos com hepatectomia de 90% receberam doses de 0,5 mg de glicose por grama de peso corporal.

Os procedimentos relacionados à hepatectomia parcial obedeciam à seguinte sequência: pesagem dos animais, anestesia, coleta das amostras de sangue, hepatectomia, administração das microcápsulas e da glicose, pesagem dos lobos retirados, e observação da recuperação anestésica.

Os procedimentos relacionados à avaliação diária dos animais incluíam: avaliação da atividade de cada animal, pesagem corporal, anestesia, coleta de sangue e administração de glicose.

Ao final do período de acompanhamento os animais eram sacrificados em câmara de CO₂. No dia do sacrifício os animais eram avaliados quanto à atividade, pesados e sacrificados. Imediatamente após a morte era coletado sangue, os lobos remanescentes eram retirados, pesados, colocados em formol e nitrogênio líquido.

Os detalhes de cada procedimento estão descritos abaixo.

Coleta, processamento e armazenamento das amostras de sangue

As amostras de sangue eram obtidas por punção da veia da cauda, do plexo venoso orbital ou intracardíaca. As gotas de sangue colhidas na punção da veia da cauda eram utilizadas para as dosagens imediatas de glicose e lactato nas ocasiões nas quais não eram realizadas coletas de maiores volumes de sangue. As coletas de sangue do plexo venoso orbital eram realizadas com o animal sob anestesia. Aproximadamente 1 mL de sangue era retirado a cada punção. As punções intracardíacas eram realizadas imediatamente após sacrifício e todo o sangue obtido era armazenado.

Do sangue coletado era obtido soro por centrifugação a 4000 rotações por minuto por 10 minutos, o qual era separado em alíquotas de 0,1 mL em microtubos de 0,5 mL identificados e armazenado a -80°C.

Anestesia

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados com os animais sob anestesia. Nos primeiros experimentos da Fase 1 foi utilizada a combinação de ketamina (Cetamin® – Sespo Ltda – Paulínia, São Paulo, Brasil) e xilazina (Anasedan® – Rhobifarma Ltda – Cotia, São Paulo, Brasil) administrada via intraperitoneal em doses ajustadas aos pesos corporais (50 e 20 mg/kg, respectivamente). Após as primeiras avaliações o regime anestésico foi modificado e utilizado isoflurano (Forane® – Abbott AS – Buenos Aires, Argentina) inalatório. Foi empregada concentração de 3% para indução e de 1% para manutenção em vaporizador calibrado, associada a 1 litro/minuto de oxigênio.

Hepatectomia parcial

Após indução anestésica os animais eram colocados sobre colchão térmico (27 a 28°C) e imobilizados em decúbito dorsal na mesa de procedimento. Antes da

laparotomia era realizada tricotomia e assepsia com polivinilpirrolidona-iodo na superfície abdominal. Uma incisão mediana era realizada na pele, na musculatura e no peritônio. O fígado era gentilmente mobilizado e as estruturas lobulares identificadas. Para hepatectomia de 85% era realizada ligadura com fio ácido poliglicólico 4.0 (Vicryl® – Johnson & Johnson – São José dos Campos, São Paulo, Brasil) dos pedículos e exérese dos lobos mediano (40%), esquerdo (30%) e do segmento superior do lobo direito (15%) (Figura 1). Hepatectomia de 90% era obtida com a retirada completa do lobo direito e manutenção somente dos lobos caudados (10%) (Emond *et al.*, 1989). A integridade dos lobos remanescentes e de seu fluxo sanguíneo era avaliada antes do fechamento da cavidade abdominal. Fio mononylon 4.0 (Ethicon® – Johnson & Johnson – São José dos Campos, São Paulo, Brasil) era utilizado para a sutura da cavidade abdominal.

Retirada dos lobos hepáticos

Os lobos hepáticos retirados durante a hepatectomia e os lobos hepáticos remanescentes removidos após o sacrifício eram pesados em balança digital. Uma amostra de tecido hepático dos lobos remanescentes era colocada em tubo Eppendorf e congelada em nitrogênio líquido e armazenada a -80°C. O restante era colocado em formol a 10% tamponado para posterior processamento em parafina.

Administração das microcápsulas:

Após a hepatectomia e antes de completado o fechamento da parede abdominal, 2 mL de microcápsulas (vazias ou com células) suspensos em 3 mL de PBS (*Phosphate Buffered Saline*) eram cuidadosamente depositados no peritônio utilizando-se seringa de 60 mL.

5.6.2. Células

Foram utilizadas células da medula óssea de ratos, em sua totalidade ou sua fração mononuclear, e células HepG2. Para obtenção das células da medula, ratos doadores adultos eram sacrificados na câmara de CO₂. As patas eram retiradas e o fêmur e a tíbia levados para um ambiente estéril (capela de fluxo laminar) onde as epífises eram cortadas e toda a medula removida com DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium* – LGC® – Brasil) suplementado com 10% SFB (Soro Fetal Bovino – GIBCO® – Grand

Island, NY, EUA) e 1% P/S (Penicilina/Estreptomicina – GIBCO® – Grand Island, NY, EUA).

Para a obtenção da fração mononuclear, a medula óssea era submetida a um gradiente de densidade de Ficoll (GE-Healthcare® – Piscataway, New Jersey, EUA), conforme descrito por Belardinelli e colaboradores (Belardinelli *et al.*, 2008). A viabilidade e a quantidade de células eram avaliadas com o corante Azul de Trypan em câmara de Neubauer.

As células HepG2, uma linhagem celular derivada de hepatocarcinoma humano, catalogada sob o número ATCC HB-8065 foram obtidas do Banco de Células da Universidade Federal do Rio de Janeiro. As células foram mantidas em condições normais de cultivo a 37°C e 5% CO₂ com meio DMEM suplementado com 10% SFB e 1% P/S. Quando as células atingiam confluência eram realizadas passagens seriais por tripsinização (0.25% trypsin-EDTA – GIBCO® – Grand Island, New York, EUA). A contagem era realizada com Azul de Trypan em câmara de Neubauer.

5.6.3. Encapsulação das células em microcápsulas de alginato de sódio

Para encapsulação das células foi utilizada a técnica de formação de microcápsulas de alginato de sódio padronizada no CTG (Lagranha *et al.*, 2008; Mayer *et al.*, 2010). As células a serem encapsuladas eram suspensas em uma solução de meio DMEM contendo 1,5% de alginato de sódio (Sigma® – Saint Louis, Missouri, EUA), previamente esterilizado por radiação ultravioleta.

Essa suspensão com a concentração celular determinada para cada animal era perfundida em fluxo constante de 40 mL/h determinada por aparelho perfusor JMS (modelo SP-500) através da agulha da unidade de encapsulação (Nisco® – Zurich, Suíça) (Figura 2). Um jato de ar medicinal (5 L/minuto) contínuo era aplicado à ponta da agulha provocando a formação de microgotas que precipitavam em uma solução de cloreto de cálcio (CaCl₂; 125mM). A reação dos polímeros de alginato de sódio com o CaCl₂ formava as microcápsulas contendo as células. A solução de CaCl₂ era retirada e substituída por DMEM. As microcápsulas (2 mL) e o meio (4 mL de DMEM) eram colocados em poços de placas de cultivo celular e mantidos na estufa a 37°C por até 24 horas. No momento da hepatectomia, o meio era removido do poço, as microcápsulas eram suspensas em PBS e transferidas para a seringa urológica. As microcápsulas sem células foram confeccionadas, mantidas e manuseadas de forma idêntica às com células.

5.6.4. Análise laboratorial

Os níveis sanguíneos de glicose e de lactato foram determinados com os aparelhos Accu-Check Active (Roche® – Laval, Québec, Canadá) e Accutred Lactato (Roche® – Mannheim, Baden-Württemberg, Alemanha), respectivamente.

As dosagens séricas de IL-6, TGF-beta e PDGF-BB (*Platelet-Derived Growth Factor-BB*) foram determinadas por ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) utilizando kits comerciais (R&D Systems® – Minneapolis, Minnesota, EUA).

5.6.5. Avaliação histológica

As amostras de tecido hepático fixadas em formol a 10% tamponado foram incluídas em blocos de parafina em até 48 horas após o sacrifício. Para a avaliação histológica foram confeccionadas lâminas coradas com hematoxilina e eosina (HE) que foram analisadas por um patologista experiente, sem conhecimento prévio dos grupos, e consistiu da descrição dos achados histológicos (congestão sinusoidal e venosa, esteatose, necrose e infiltração leucocitária) e da contagem do número de hepatócitos em mitose em 10 campos de grande aumento (400x).

5.7. LOGÍSTICA

Os ratos foram mantidos e submetidos a todos os procedimentos na UEA. A coleta e a separação das células da medula óssea, o cultivo das células HepG2 e a encapsulação foram executadas no CTG. As amostras de sangue e de tecido hepático foram armazenadas em *freezers* do Laboratório Experimental de Hepatologia e Gastroenterologia (LEHG). O processamento e a coloração das lâminas foram realizados na Unidade de Patologia Experimental (UPE). A análise por ELISA foi processada na Unidade de Análise Molecular e de Proteínas (UAMP).

5.8. TRATAMENTO ESTATÍSTICO

Inicialmente, os dados foram armazenados empregando-se o programa Excel da Microsoft. Os cálculos estatísticos foram realizados pelo programa SPSS (*Statistical Package for Social Sciences*). Os dois programas foram utilizados para a elaboração dos gráficos. Os resultados foram descritos empregando-se tabelas de distribuição de frequências para variáveis categóricas e medidas de tendência central e dispersão, como média e desvio padrão (DP) para as variáveis contínuas. As comparações entre os

grupos foram feitas empregando-se teste t de Student ou teste de Mann-Whitney, análise de variância (ANOVA) ou teste de Kruskal Wallis, conforme a presença de normalidade (teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov). Quando necessário foi aplicado o teste de Tukey ou teste de Dunn para a análise de comparação das médias. As variáveis categóricas foram analisadas através do teste do qui-quadrado de Person e do teste exato de Fisher. As curvas de sobrevida foram elaboradas pelo método de Kaplan-Meier e a comparação das taxas de sobrevida foram avaliadas pelo teste *log rank*. Os resultados foram considerados significantes quando o nível de significância (P) foi menor que 0,05.

5.9. ASPECTOS ÉTICOS

Os projetos desta tese foram submetidos ao Comitê de Ética em Pesquisa do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG) do HCPA e aprovados sob os números 05-181 e 10-0062. No manejo dos animais foram respeitadas as normas para a Utilização de Animais em Projetos de Pesquisa do Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA e a Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008.

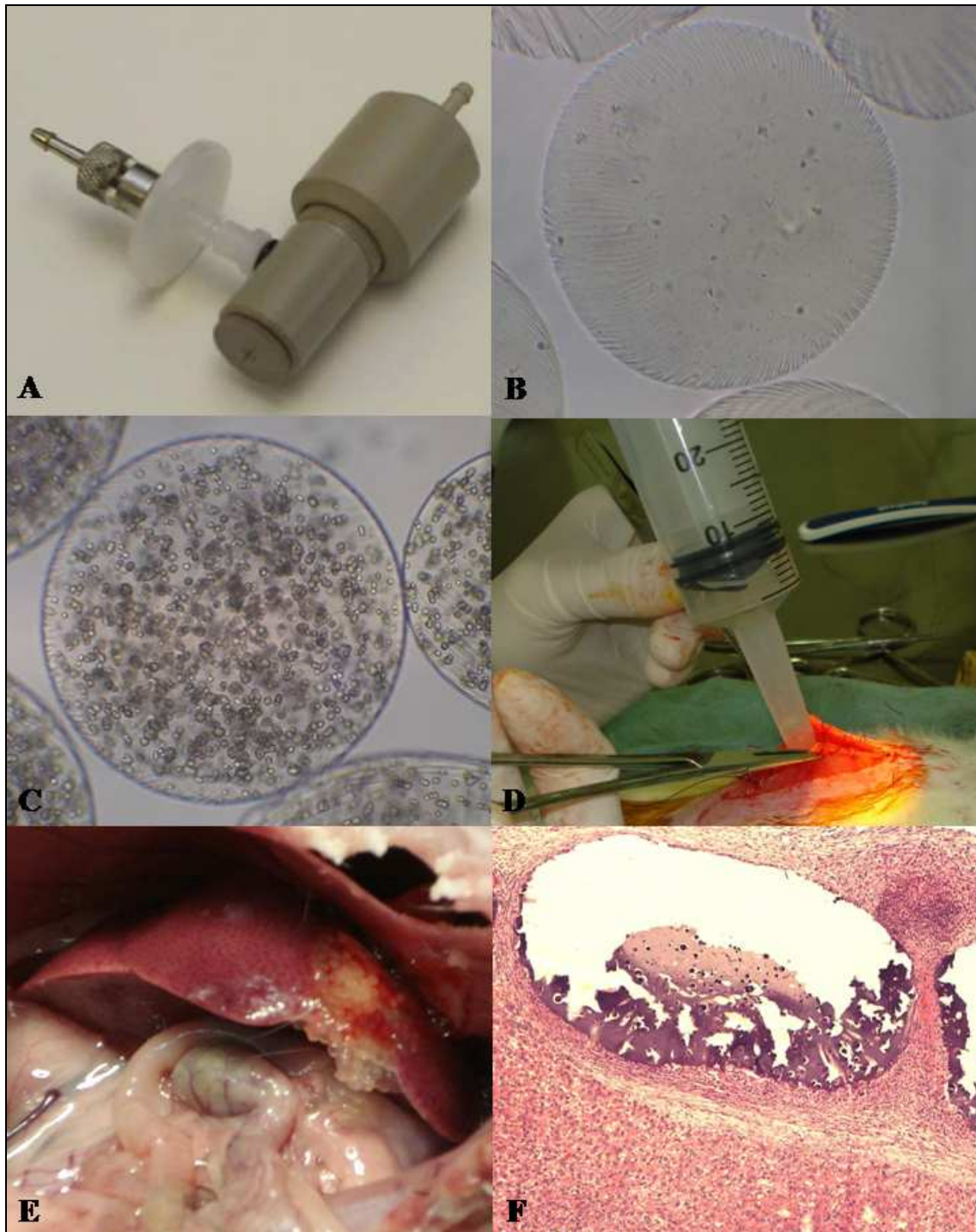


Figura 2 – Microencapsulação com alginato de sódio: A) Unidade de Encapsulação Nisco; B) Microcápsula sem células; C) Microcápsula com células HepG2; D) Administração das microcápsulas na cavidade peritoneal; E) Microcápsulas aderidas ao fígado; F) Fotomicrografia de microcápsula contendo células HepG2 e aderida ao tecido hepático (HE 100x).

6. RESULTADOS

6. RESULTADOS

Os resultados abaixo apresentados foram organizados de forma a reproduzir as três fases do desenvolvimento do estudo.

6.1. FASE 1 - PADRONIZAÇÃO DE UM MODELO DE INSUFICIÊNCIA HEPÁTICA AGUDA POR HEPATECTOMIA PARCIAL EM RATOS

Na primeira fase do estudo foi realizada a padronização dos procedimentos relacionados ao manejo dos animais de experimentação e ao registro dos dados coletados. Durante essa etapa ficou estabelecido o padrão dos procedimentos de coleta de amostras sanguíneas e de pesagem corporal e dos lobos hepáticos retirados.

Os cuidados anestésicos, como a utilização de colchão aquecido, controle da temperatura, oferta de oxigênio, doses das medicações anestésicas e de suplementação de glicose também foram estabelecidos e padronizados nessa etapa. Todo o treinamento da técnica cirúrgica foi realizado nessa fase e envolveu desde a tricotomia e abertura da cavidade abdominal, passando pela ligadura e ressecção dos lobos hepáticos até a sutura da parede abdominal. Também foi desenvolvido durante essa etapa o instrumento de registro individual de dados, contendo as informações relacionadas ao acompanhamento do animal submetido ao procedimento.

Hepatectomia de 85%

Inicialmente foi realizada a hepatectomia de 85% com a retirada dos lobos mediano (40%) e do esquerdo (30%) e do segmento superior do lobo direito (15%). O efeito da suplementação da glicose na sobrevivência foi estudado comparando dois grupos de doze animais. No grupo tratamento foi administrado intraperitonealmente 100 mg de glicose (diluídos em 2 mL de água de injeção) 1, 6, 24 e 48 horas após o final da cirurgia e colocado 20% de glicose na água de beber. No grupo controle os doze animais não receberam suplementação de glicose. Os animais foram anestesiados com a combinação de ketamina e xilazina, administrada via intraperitoneal. Somente um animal (grupo com glicose) apresentou recuperação anestésica na primeira hora após a hepatectomia. Na avaliação das 6 horas após a hepatectomia, 6 (50%) ratos do grupo que não recebeu glicose estavam ativos e 6 permaneciam hipoativos. No grupo que recebeu suplementação de glicose, dos 11 ratos vivos, 9 estavam ativos e 2 hipoativos. Não houve diferença entre os grupos quanto ao peso corporal, o tempo de cirurgia, o

peso dos lobos retirados e a razão peso dos lobos retirados em relação ao peso corporal (Tabela 4). A sobrevivência em 72 horas após a hepatectomia foi de 50% e não houve diferença entre os grupos (Log rank=0,920) (Figura 3).

Tabela 4 – Características dos ratos submetidos à hepatectomia de 85% conforme a suplementação de glicose.

	Sem glicose		Com glicose		P*
	N	Média ±DP	N	Média ±DP	
Peso corporal (g)	12	331,0 ±48,6	12	356,7 ±38,2	0,164
Tempo de cirurgia (minutos)	12	13,1 ±2,3	12	12,0 ±1,5	0,185
Peso dos lobos retirados (g)	12	9,6 ±0,9	11	9,8 ±1,8	0,756
Razão peso dos lobos retirados/peso corporal (%)	12	2,9 ±0,3	11	2,8 ±0,4	0,228

DP=desvio padrão.

* Teste t de Student.

Não houve diferença entre os dois grupos nos níveis de glicose e de lactato sanguíneo (Figura 4) em todos os momentos avaliados, excetuando o valor de glicose às 6 horas que foi significativamente superior no grupo que recebeu a suplementação de glicose (P=0,027).

Não houve diferença entre os dois grupos quanto ao peso dos lobos remanescentes retirados após o sacrifício e à razão peso dos lobos remanescentes em relação ao peso corporal (Tabela 5).

Tabela 5 – Peso dos lobos remanescentes (g) e razão peso dos lobos remanescentes em relação ao peso corporal do dia do sacrifício (%) de ratos submetidos à hepatectomia de 85% conforme a suplementação de glicose.

	Sem glicose		Com glicose		P*
	N	Média ±DP	N	Média ±DP	
Peso dos lobos remanescentes (g)	6	9,0 ±1,3	6	8,5 ±1,5	0,582
Razão peso dos lobos remanescentes/peso corporal (%)	6	3,1 ±0,5	6	2,7 ±0,5	0,220

DP=desvio padrão; g=gramas.

* Teste t de Student.

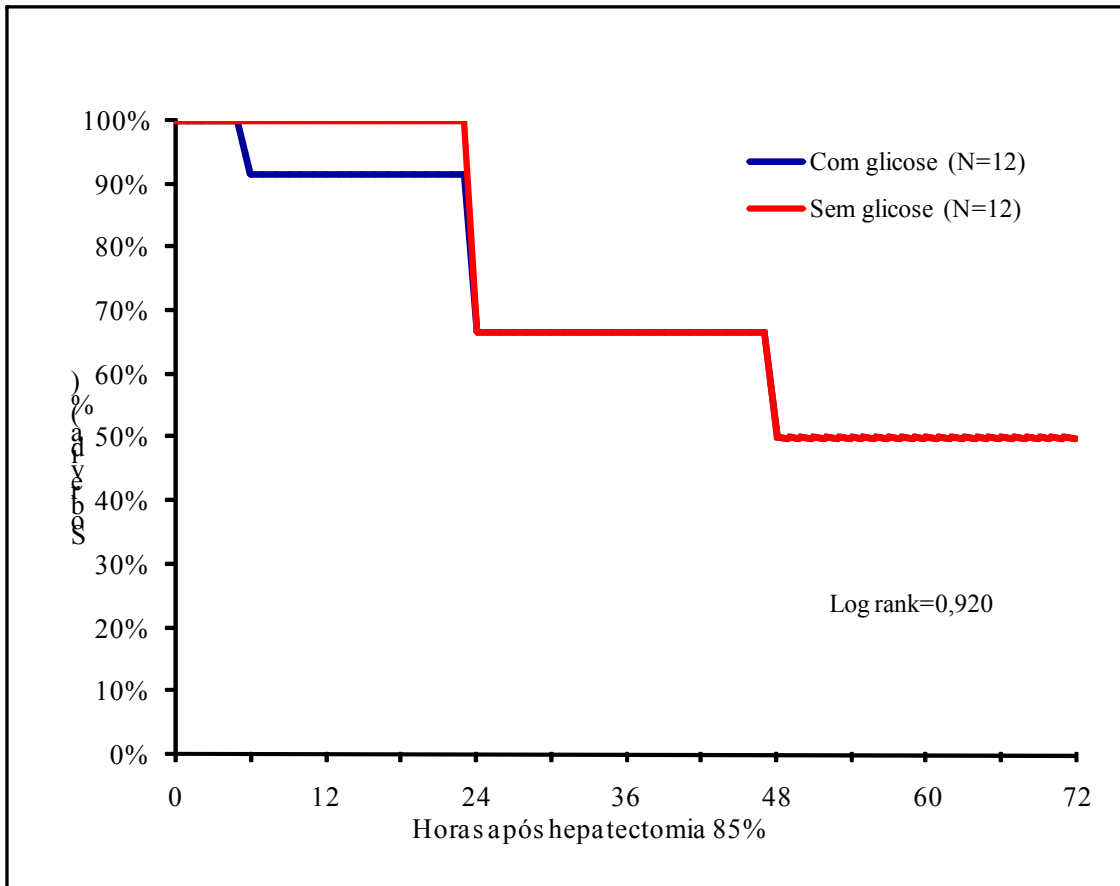


Figura 3 - Sobrevida após hepatectomia de 85% conforme a suplementação de glicose.

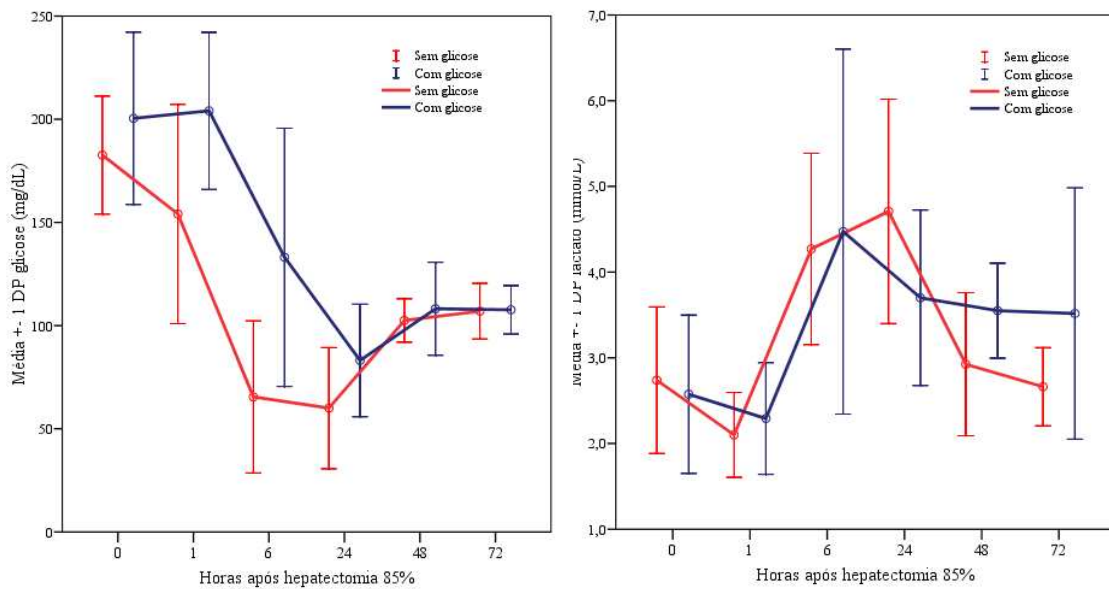


Figura 4 - Glicose (mg/dL) e lactato (mmol/L) sanguíneos em ratos submetidos à hepatectomia de 85% conforme a suplementação de glicose.

Hepatectomia de 90%

Considerando que o modelo de hepatectomia de 85% acima descrito não reproduziu a alta mortalidade esperada na insuficiência hepática aguda, na busca de um modelo mais adequado, foi realizada a ampliação da extensão do volume de fígado retirado para 90%, com a ressecção de todo o lobo direito e manutenção apenas dos lobos caudados (10%) (Figura 1).

Além da ampliação da extensão da hepatectomia, foram realizados ajustes em alguns procedimentos. Para reduzir o número de intervenções no pós-operatório imediato, a coleta de amostra de sangue na primeira hora não foi mais realizada. A suplementação da glicose uma hora após a hepatectomia foi substituída pela administração ao final da cirurgia, antes do fechamento da cavidade abdominal. A dose de glicose administrada intraperitonealmente foi ajustada ao peso corporal de cada animal (0,5 mg de glicose por grama de peso). O tempo de observação após a hepatectomia foi ampliado para 10 dias. A suplementação intraperitoneal e oral de glicose foi estendida até o 7º e 10º dia, respectivamente. As dosagens sanguíneas de glicose e de lactato foram realizadas diariamente até o dia 7 e no dia 10. Os animais sobreviventes foram sacrificados após completar os 10 dias de observação. O instrumento individual de registro de dados foi adaptado para atender às modificações acima descritas.

Para atender o objetivo do desenvolvimento de modelo de insuficiência hepática para a terapia com células imobilizadas, os animais passaram a receber intraperitonealmente, após a hepatectomia e antes do fechamento da cavidade abdominal, juntamente com a dose de glicose, microcápsulas de alginato de sódio (2 mL), sem células, suspensas em 3 mL de PBS.

Inicialmente os animais submetidos à hepatectomia de 90% foram anestesiados com a administração intraperitoneal da combinação de ketamina e xilazina. A elevada mortalidade nas primeiras horas do pós-operatório associada a um tempo de recuperação prolongado, provavelmente associada à redução de metabolismo dos anestésicos, tornava esse modelo inadequado à proposta de terapia celular, exigindo a mudança para um regime anestésico não dependente do metabolismo hepático.

O efeito do regime anestésico na sobrevivência de ratos submetidos à hepatectomia de 90% foi estudado comparando dois grupos de animais. Quinze ratos foram anestesiados com a combinação de ketamina e xilazina administrada via intraperitoneal

e 15 com isoflurano inalatório. Os dados referentes a esta comparação estão apresentados em artigo submetido para publicação (Anexo 4). Em resumo, a recuperação anestésica foi diferente nos dois grupos, com efeitos sobre os níveis sanguíneos de glicose sanguínea e a sobrevida. Uma hora após o final da cirurgia todos os ratos anestesiados com ketamina e xilazina permaneciam sob efeito anestésico. Diferentemente, no grupo anestesiado com isoflurano todos os animais estavam despertos e ativos. A sobrevida em 10 dias após a hepatectomia também foi diferente entre os dois grupos, sendo significativamente maior no grupo anestesiado com isoflurano (Figura 5). O peso dos lobos remanescentes do único rato vivo no décimo dia de observação, retirado após o sacrifício foi de 4,45 gramas, correspondendo a 1,94% do peso corporal.

A mudança do regime anestésico para isoflurano inalatório resultou em redução do tempo de recuperação anestésica e em redução da mortalidade imediata. A elevada mortalidade registrada a partir do terceiro ou quarto dias foram compatíveis com um modelo de insuficiência hepática aguda. A janela terapêutica resultante desse modelo foi considerada adequada para a experimentação com terapia celular desenvolvida na próxima fase desse estudo.

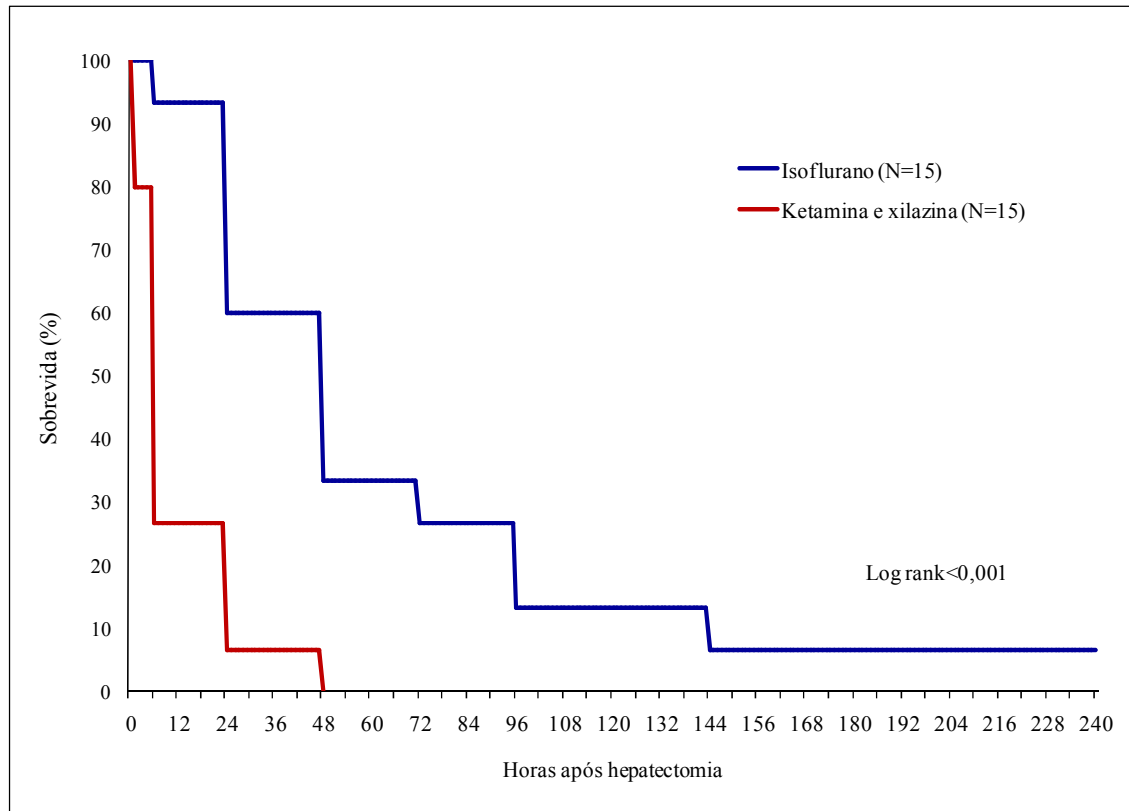


Figura 5 - Sobrevida em 10 dias após hepatectomia de 90% conforme o regime anestésico.

6.2. FASE 2 - AVALIAÇÃO DO EFEITO DE DIFERENTES TIPOS CELULARES NA SOBREVIDA DE RATOS SUBMETIDOS À HEPATECTOMIA DE 90%

Na segunda fase do estudo foram realizados os experimentos com diferentes tipos e quantidades de células contidas nas microcápsulas de alginato de sódio. Foram avaliados os efeitos das células HepG2 e das células da medula óssea de ratos Wistar doadores. A quantidade de células utilizadas em cada rato e o número de animais por grupo estão demonstradas na Tabela 6.

Tabela 6 – Tipo, número de células administradas em cada animal e número de animais por grupo.

Tipo de célula	Número de células por animal	Número de animais por grupos
Fração mononuclear	1×10^6	14
Fração mononuclear	3×10^7	11
Medula óssea total	3×10^7	11
HepG2	5×10^7	13
Sem células	-	15

Foi utilizado o modelo de hepatectomia de 90% anteriormente padronizado, sob anestesia inalatória com isoflurano e com suplementação peritoneal e oral de glicose. Em 64 animais foram observadas as curvas de sobrevida nos 10 dias que seguiram o procedimento cirúrgico dos diferentes regimes terapêuticos e comparadas com a do grupo que recebeu cápsulas sem células.

Em todos os grupos, a maioria dos óbitos ocorreu até 72 horas (Figura 6). A sobrevida do grupo que recebeu células HepG2 foi de 30,8%. Não houve diferença significativa em relação ao grupo sem células ($P=0,090$) e aos grupos que receberam células da medula óssea (MOT: $P=0,095$; FM 1×10^6 : $P=0,073$ e FM 3×10^7 : $P=0,128$). Os animais que receberam cápsulas com células da medula óssea apresentaram sobrevidas ao final dos 10 dias de observação superiores a 50%. O grupo que recebeu medula óssea total apresentou a maior sobrevida (63,6%), diferindo estatisticamente dos animais que não receberam células ($P=0,002$). As sobrevidas dos grupos tratados com fração mononuclear, 1×10^6 e 3×10^7 células (57,1% e 54,5%, respectivamente) foram superiores a sobrevida dos animais que não receberam células ($P=0,001$ e $P=0,003$, respectivamente), contudo não houve diferença entre esses 3 grupos.

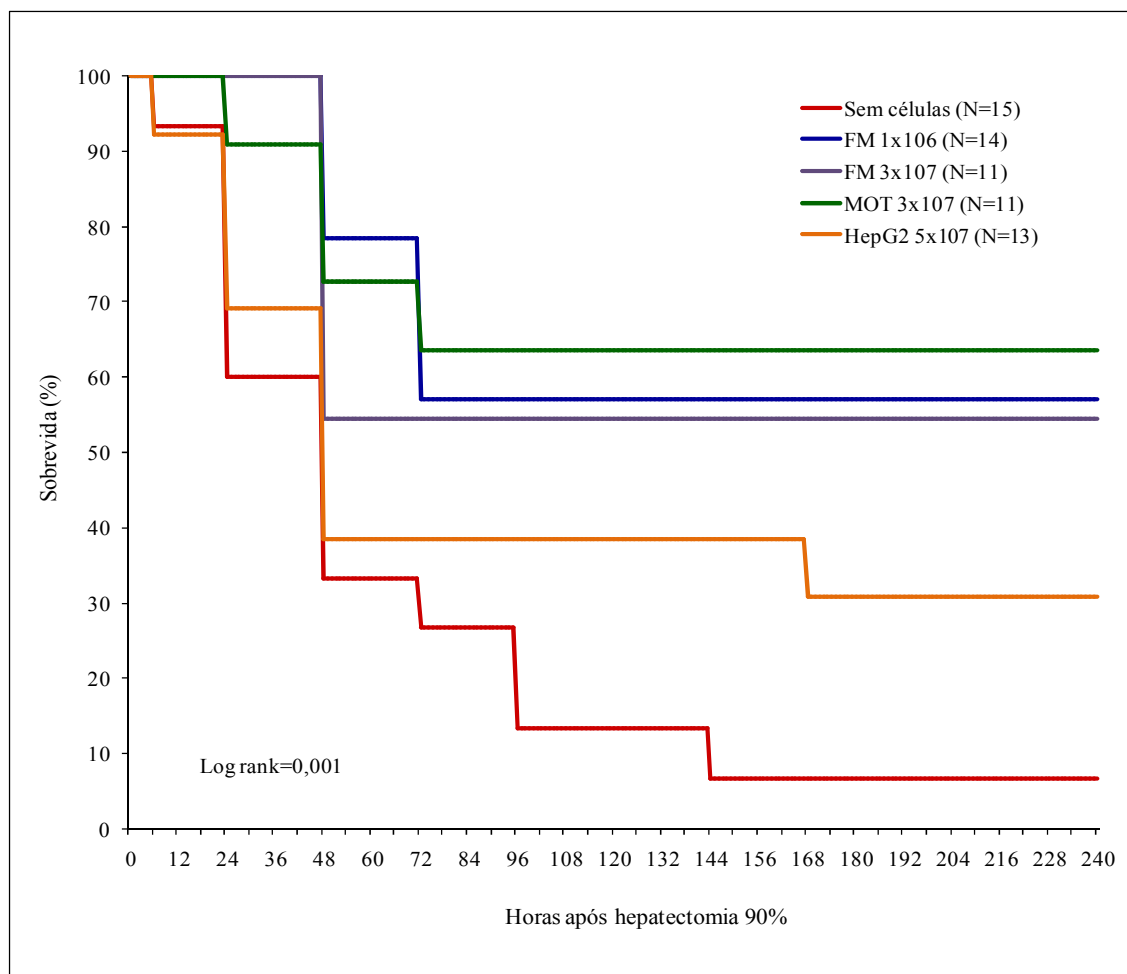


Figura 6 - Sobrevivida em 10 dias após hepatectomia de 90% conforme o tipo de célula encapsulada.

FM=fração mononuclear; MOT=medula óssea total.

Em todos os grupos houve queda dos níveis de glicose sanguínea nas primeiras 48 horas após a hepatectomia (Tabela 7 e Figura 7). Houve diferenças nos valores de glicose entre os grupos em alguns momentos avaliados. Antes da hepatectomia a glicose sanguínea foi significativamente maior no grupo MOT que nos animais do grupo FM 1×10^6 ($P=0,012$). Às 72 horas, a glicose dos ratos sem células foi menor que a do grupo FM 1×10^6 ($P=0,045$). Na avaliação das 96 horas após a hepatectomia a glicemia foi maior no grupo MOT quando comparada aos valores dos grupos sem células ($P=0,000$), FM 3×10^7 ($P=0,000$), HepG2 ($P=0,000$) e FM 1×10^6 ($P=0,003$). O grupo sem células também apresentava glicose menor que do FM 1×10^6 ($P=0,008$). Às 120 horas, os animais que receberam FM 1×10^6 tiveram glicemia superior aos dos grupos HepG2 ($P=0,001$), sem células ($P=0,004$), MOT ($P=0,008$) e FM 3×10^7 ($P=0,041$). Da mesma forma o grupo FM 1×10^6 apresentou níveis de glicose sanguínea maiores na avaliação das 144 horas (HepG2: $P=0,038$).

Tabela 7 – Glicose sanguínea (mg/dL) em ratos submetidos à hepatectomia de 90% conforme o regime terapêutico.

Horas após HP	Sem células	Fração mononuclear 1x10 ⁶	Fração mononuclear 3x10 ⁷	Medula óssea total 3x10 ⁷	HepG2 5x10 ⁷	P*
	N	N	N	N	N	
	Média ±DP Mediana (Q1-Q3)	Média ±DP Mediana (Q1-Q3)	Média ±DP Mediana (Q1-Q3)	Média ±DP Mediana (Q1-Q3)	Média ±DP Mediana (Q1-Q3)	
0	15	14	11	11	13	0,012 ^{&}
	123,7 ±19,8 116,0 (108,0-132,0)	119,9 ±17,2 116,0 (104,8-132,3)	129,6 ±18,7 126,0 (117,0-131,0)	143,4 ±11,6 141,0 (138,0-155,0)	129,0 ±16,8 125,0 (116,0-138,5)	
	6	14	14	11	11	
98,6 ±21,2 101,0 (78,8-113,5)		93,1 ±20,8 96,5 (79,3-114,0)	114,2 ±60,7 94,0 (65,0-186,0)	84,5 ±23,7 89,0 (70,0-102,0)	98,1 ±20,6 98,5 (89,0-107,5)	
24		9	13	11	10	9
	65,3 ±18,0 62,0 (56,5-74,5)	88,5 ±36,0 72,0 (60,5-114,5)	101,9 ±42,8 103,0 (73,0-119,0)	81,2 ±27,8 80,5 (57,5-102,5)	71,7 ±34,5 70,0 (38,5-89,5)	
	48	5	11	6	8	5
78,8 ±16,3 81,0 (66,0-90,5)		71,8 ±27,6 72,0 (58,0-81,0)	81,0 ±12,8 83,5 (66,5-93,3)	89,8 ±13,9 90,5 (78,3-103,3)	86,8 ±18,8 80,0 (71,5-105,5)	
72		4	8	6	7	5
	71,5 ±20,6 73,5 (50,8-90,3)	106,3 ±18,5 99,5 (96,0-122,5)	83,8 ±16,5 91,5 (79,5-99,0)	97,4 ±18,1 101,0 (87,0-116,0)	83,8 ±16,5 89,0 (67,5-97,5)	
	96	2	8	6	7	5
68,5 ±34,6 68,5 (44,0-93,0)		121,3 ±11,0 123,5 (109,3-129,3)	104,2 ±9,6 102,5 (95,5-114,0)	164,6 ±31,8 177,0 (120,0-190,0)	94,0 ±12,9 90,0 (84,0-106,0)	
120		2	8	6	7	5
	81,5 ±12,0 81,5 (73,0-0,0)	149,1 ±27,0 158,5 (120,3-173,5)	114,8 ±16,0 112,5 (102,5-127,5)	108,3 ±19,4 107,0 (96,0-123,0)	96,0 ±17,4 98,0 (79,5-111,5)	
	144	1	8	6	7	5
180,0		142,1 ±19,5 140,0 (126,5-163,8)	107,5 ±24,5 109,0 (86,0-131,8)	131,1 ±40,1 142,0 (135,0-155,0)	93,4 ±30,3 109,0 (62,0-117,0)	
168		1	8	6	7	4
	121,0	151,6 ±32,9 144,0 (126,3-164,3)	111,2 ±20,1 118,5 (96,5-124,5)	120,4 ±14,4 127,0 (114,0-132,0)	113,5 ±16,4 115,0 (97,5-128,0)	
	240	1	8	6	7	4
109,0		122,4 ±19,4 117,5 (110,5-136,8)	107,8 ±15,6 110,0 (93,0-123,3)	116,1 ±24,1 112,0 (90,0-138,0)	103,3 ±20,1 100,0 (86,0-123,8)	

DP=desvio padrão; FM=fração mononuclear; HP=hepatectomia parcial; MOT= medula óssea total; Q1=primeiro quartil; Q3=terceiro quartil.

* Teste de Kruskal Wallis e teste de Dunn.

[&] MOT x FM 1x10⁶ (P=0,008).

[§] Sem células x FM 1x10⁶ (P=0,048).

[#] MOT x sem células (P=0,018); MOT x FM 3x10⁷ (P=0,036); MOT x HepG2 (P=0,004);

[£] FM 1x10⁶ x HepG2 (P=0,025); FM 1x10⁶ x sem células (P=0,034);

£ FM 1x10⁶ x HepG2 (P=0,038).

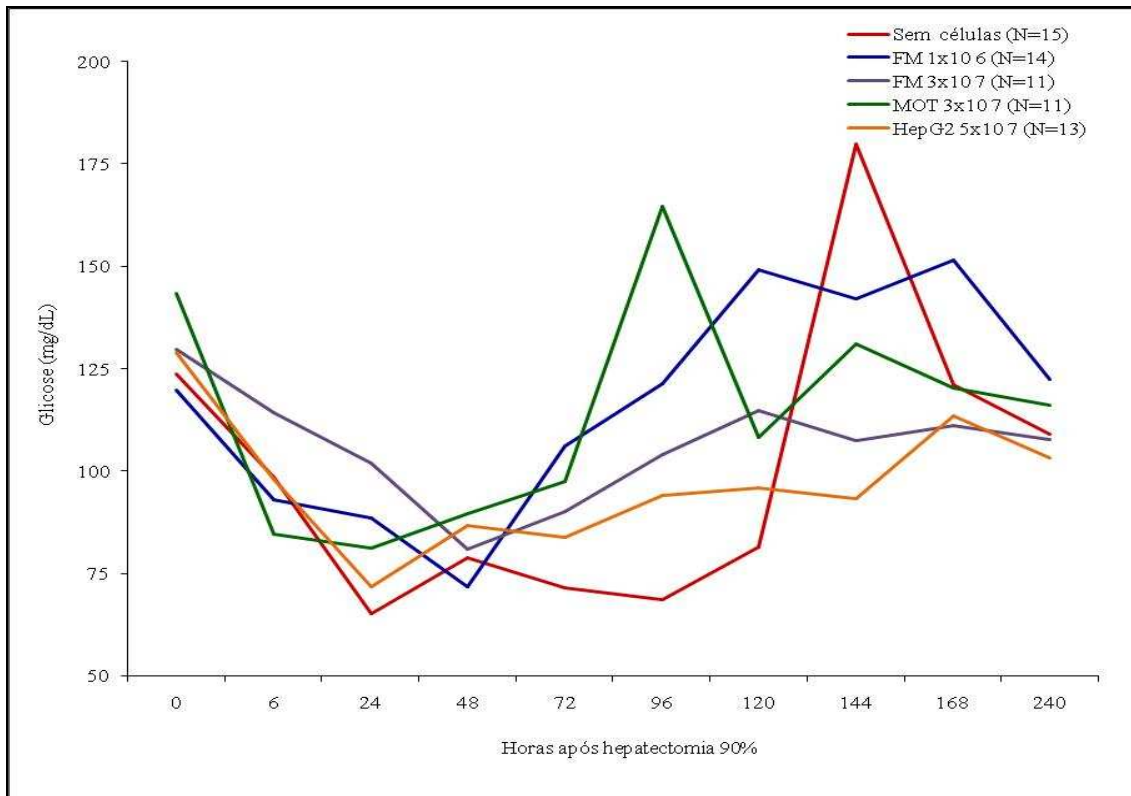


Figura 7 - Média da glicose sanguínea (mg/dL) em ratos submetidos à hepatectomia de 90% conforme o regime terapêutico.
FM=fração mononuclear; MOT=medula óssea total.

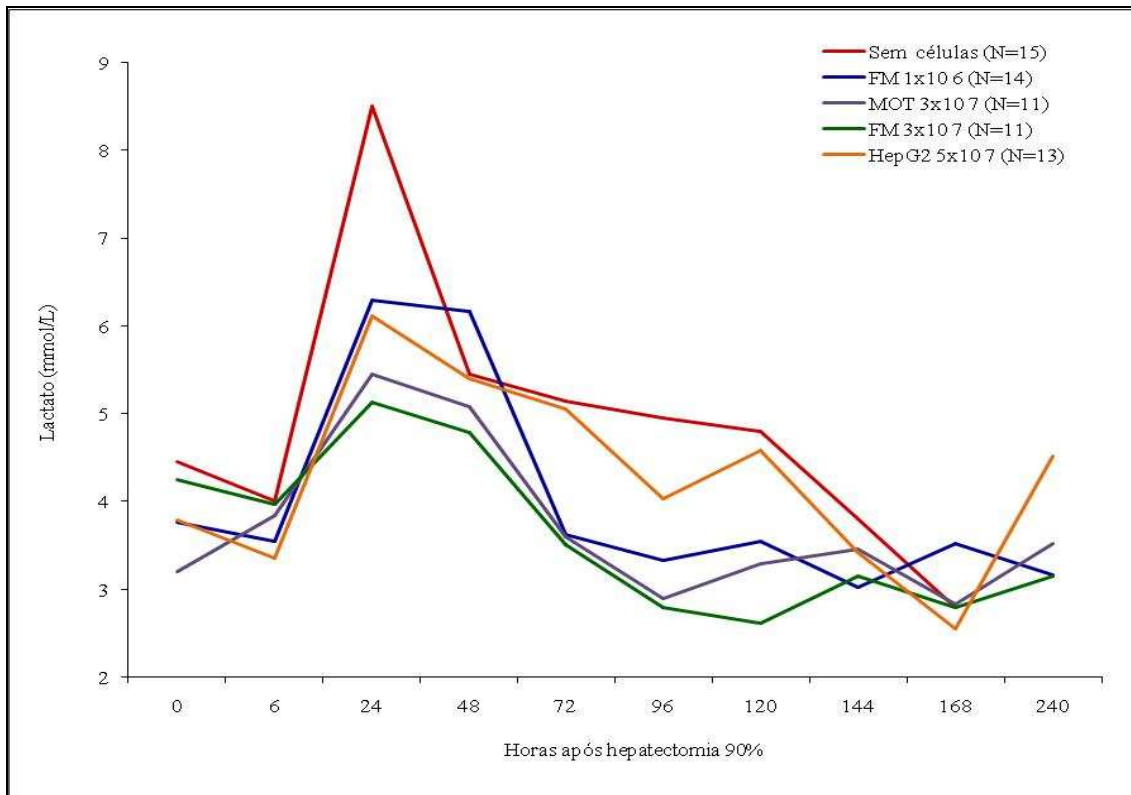


Figura 8 - Média do lactato sanguíneo (mmol/L) em ratos submetidos à hepatectomia de 90% conforme o regime terapêutico.
FM=fração mononuclear; MOT=medula óssea total.

Inversamente ao ocorrido com a glicose, os níveis de lactato sanguíneo apresentaram elevação nas primeiras 48 horas (Figura 8). Contudo, em todos os momentos avaliados não houve diferença entre os grupos.

Não houve diferença entre os regimes terapêuticos quanto ao peso dos lobos remanescentes retirados após o sacrifício e à razão peso dos lobos remanescentes em relação ao peso corporal (Tabela 8).

Tabela 8 – Peso dos lobos remanescentes (g) e razão peso dos lobos remanescentes em relação ao peso corporal do dia do sacrifício (%) de ratos submetidos à hepatectomia de 90% conforme o regime terapêutico.

	Sem células (N=1)	FM 1x10 ⁶ (N=8)	FM 3x10 ⁷ (N=6)	MOT 3x10 ⁷ (N=7)	HepG2 5x10 ⁷ (N=4)	P*
	Valor	Média ±DP Mediana (Q1-Q3)	Média±DP Mediana (Q1-Q3)	Média ±DP Mediana (Q1-Q3)	Média ±DP Mediana (Q1-Q3)	
Peso dos lobos remanescentes (g)	4,5	8,3 ±1,2 8,5 (7,6-9,1)	8,8 ±1,5 8,6 (7,4-10,5)	7,4 ±2,2 7,1 (6,2-8,9)	7,6 ±1,2 7,7 (6,3-8,7)	0,139
Razão peso dos lobos remanescentes/ peso corporal (%)	1,9	3,1 ±0,3 3,1 (2,8-3,4)	3,3 ±0,4 3,1 (2,9-3,7)	3,6 ±0,7 3,6 (3,4-4,1)	3,0 ±0,6 3,1 (2,4-3,6)	0,061

DP=desvio padrão; FM=fração mononuclear; g=gramas; MOT=medula óssea total; Q1=primeiro quartil; Q3=terceiro quartil.

* Análise de variância.

Os resultados dessa fase mostraram que as células da medula óssea, mas não as células HepG2, imobilizadas em microcápsulas de alginato de sódio foram capazes de reduzir a mortalidade nas primeiras 72 horas após a hepatectomia de 90% (Figura 6). A manutenção da vida durante esse período possibilitou a regeneração do fígado e a aparente resolução do quadro de insuficiência hepática. Os mecanismos envolvidos neste processo foram estudados na terceira etapa da pesquisa.

6.3. FASE 3 - AVALIAÇÃO DO EFEITO PRECOCE DA TERAPIA CELULAR EM RATOS SUBMETIDOS À HEPATECTOMIA DE 90%

Esta fase envolveu o estudo de possíveis mecanismos fisiopatogênicos relacionados aos efeitos das células da medula óssea sobre a mortalidade de ratos em insuficiência hepática secundária à hepatectomia de 90%. Foram estudados os possíveis efeitos celulares sobre a regeneração hepática e sobre as citocinas e fatores de crescimento envolvidos no processo de regeneração e inflamação em cinco diferentes momentos após hepatectomia.

Setenta e cinco animais foram divididos em 3 grupos. Dois grupos receberam microcápsulas de alginato de sódio contendo células da medula óssea de ratos doadores. Em um grupo foi utilizada a totalidade de células da medula óssea, na proporção de 3×10^7 células para cada animal. No outro grupo foi encapsulada somente a fração mononuclear das células da medula óssea (na proporção de 1×10^6 células por rato). Os possíveis efeitos das células foram comparados com um grupo controle de ratos que recebeu microcápsulas sem células. Quinze animais, cinco em cada grupo, foram sacrificados em cada um dos seguintes momentos: 6, 12, 24, 48 e 72 horas após a hepatectomia.

Proliferação hepatocitária

O peso dos lobos remanescentes apresentou elevação a partir das 24 horas após a hepatectomia, mais que dobrando a sua massa entre 6 e 72 horas (Tabela 9 e Figura 9). O grupo sem células apresentou lobos remanescentes com pesos significativamente superiores aos lobos dos animais que receberam medula óssea total ($P=0,001$) e fração mononuclear ($P=0,002$).

Tabela 9 – Peso dos lobos remanescentes (g) de ratos submetidos à hepatectomia de 90% conforme o momento do sacrifício e o regime terapêutico.

Horas após HP	Sem células		Fração mononuclear		Medula óssea total		P*
	N	Média ±DP Mediana (Q1-Q3)	N	Média ±DP Mediana (Q1-Q3)	N	Média ±DP Mediana (Q1-Q3)	
6	5	2,9 ±0,3	5	3,1 ±0,7	5	3,0 ±0,2	0,910
		3,0 (2,7-3,2)		3,4 (2,4-3,6)		3,0 (2,9-3,2)	
12	5	3,5 ±0,6	5	3,0 ±0,5	5	2,9 ±0,6	0,188
		3,6 (3,1-4,0)		2,8 (2,6-3,5)		2,9 (2,4-3,4)	
24	5	3,9 ±0,7	5	4,2 ±0,6	5	3,6 ±0,5	0,299
		4,2 (3,2-4,6)		4,4 (3,7-4,7)		3,6 (3,3-4,0)	
48	5	4,4 ±0,7	5	5,4 ±0,8	5	5,1 ±0,3	0,074
		4,1 (3,8-5,1)		5,2 (4,7-6,2)		5,1 (4,9-5,3)	
72	5	7,2 ±0,8	5	5,6 ±0,5	5	5,3 ±0,4	0,000 ^{&}
		7,2 (6,5-7,9)		5,6 (5,1-6,0)		5,4 (4,9-5,6)	

DP=desvio padrão; g=gramas; HP=hepatectomia parcial; Q1=primeiro quartil; Q3=terceiro quartil.

* Análise de variância e teste de Tukey.

[&] Sem células x medula óssea total: $P=0,001$; Sem células x fração mononuclear: $P=0,002$.

Em todos os grupos a razão peso dos lobos remanescentes em relação ao peso corporal avaliado antes do sacrifício aumentou de 1% ou menos às 6 horas para 2% ou

mais às 72 horas (Tabela 10 e Figura 10). O grupo sem células apresentou maior razão de massa hepática que o grupo medula óssea total às 12 horas ($P=0,006$) e às 72 horas ($P=0,020$) e que o grupo que recebeu fração mononuclear às 72 horas ($P=0,008$).

Tabela 10 – Razão peso dos lobos remanescentes em relação ao peso corporal do dia do sacrifício (%) de ratos submetidos à hepatectomia de 90% conforme o momento do sacrifício e o regime terapêutico.

Horas após HP	Sem células		Fração mononuclear		Medula óssea total		P*
	N	Média ±DP Mediana (Q1-Q3)	N	Média ±DP Mediana (Q1-Q3)	N	Média ±DP Mediana (Q1-Q3)	
6	5	0,9 ±0,1 1,0 (0,8-1,0)	5	1,0 ±0,3 1,1 (0,8-1,2)	5	1,0 ±0,1 1,0 (1,0-1,1)	0,549
12	5	1,2 ±0,1 1,2 (1,1-1,3)	5	1,0 ±0,2 1,0 (0,9-1,2)	5	0,9 ±0,1 0,9 (0,8-1,0)	0,007 ^{&}
24	5	1,4 ±0,1 1,3 (1,3-1,5)	5	1,5 ±0,3 1,7 (1,2-1,7)	5	1,3 ±0,3 1,4 (1,0-1,6)	0,470
48	5	1,7 ±0,3 1,9 (1,4-2,0)	5	1,9 ±0,3 1,9 (1,7-2,2)	5	1,9 ±0,3 1,8 (1,7-2,3)	0,492
72	5	2,3 ±0,2 2,2 (2,2-2,5)	5	2,0 ±0,1 2,0 (1,9-2,1)	5	2,0 ±0,1 2,0 (1,9-2,2)	0,006 [§]

DP=desvio padrão; HP=hepatectomia parcial; Q1=primeiro quartil; Q3=terceiro quartil.

* Análise de variância e teste de Tukey.

[&] Sem células x medula óssea total: $P=0,006$.

[§] Sem células x fração mononuclear: $P=0,008$; Sem células x medula óssea total: $P=0,020$.

O estudo do tecido hepático através da microscopia óptica, corado com hematoxilina e eosina, dos animais sacrificados 6 horas após hepatectomia mostrou importante congestão sinusoidal e venosa com dilatação dos ramos portais, presença de infiltrado neutrocitário difuso e esteatose macrofotocular difusa (Figura 11). Foi também identificada a presença de material hialino sinusoidal de origem não determinada, mais intensamente nas amostras do grupo que recebeu microcápsulas sem células.

No tecido hepático colhido às 12 horas após a hepatectomia foi identificada, além da congestão, da dilatação sinusoidal e da esteatose macrofotocular, necrose hepatocitária isolada e focos de necrose acompanhados de infiltrado neutrocitário. A presença de material hialino sinusoidal também foi observada, porém aparentemente com menor intensidade que a verificada às 6 horas.

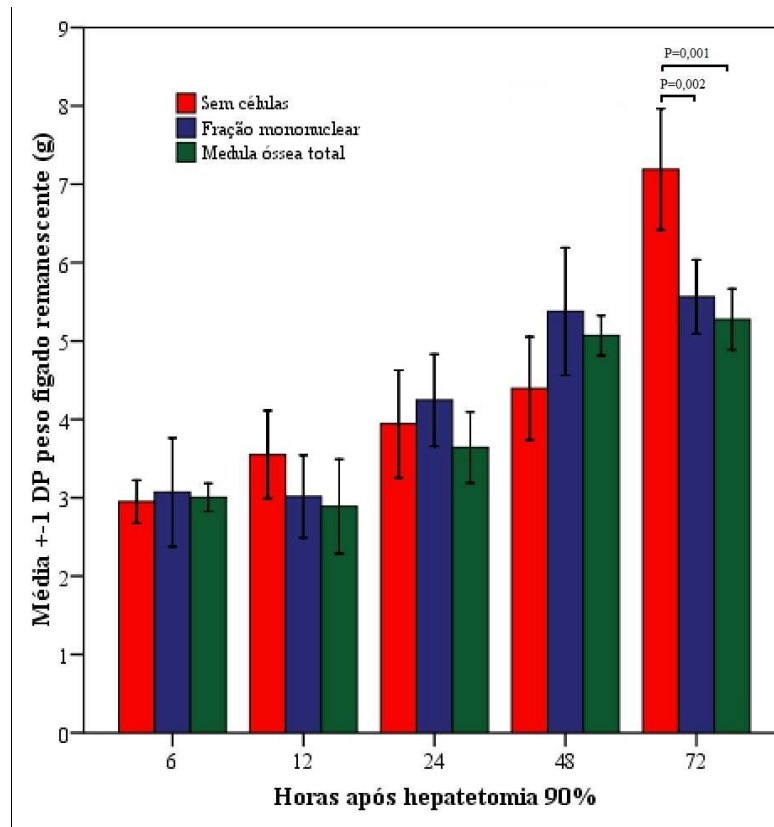


Figura 9 - Peso dos lobos remanescentes (g) de ratos submetidos à hepatectomia de 90% conforme o momento do sacrifício e o regime terapêutico.

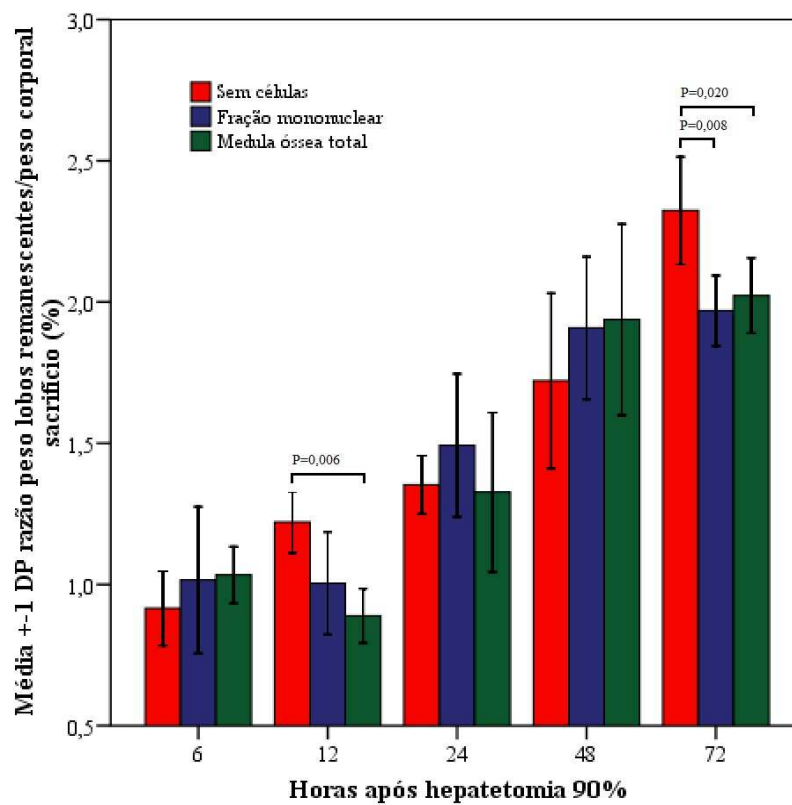


Figura 10 - Razão peso dos lobos remanescentes em relação ao peso corporal do dia do sacrifício (%) de ratos submetidos à hepatectomia de 90% conforme o momento do sacrifício e o regime terapêutico.

Na avaliação histológica das 24 horas foi observada menor congestão, alguma necrose de hepatócitos isolados e sinais de regeneração traduzidos por poucos hepatócitos em mitose. Eventual presença de material hialino sinusoidal e discreta esteatose macrogoticular também foram identificados. Entretanto, houve significativa esteatose microgoticular de distribuição difusa.

Às 48 horas após a hepatectomia, a análise microscópica do tecido hepático revelou a presença de grande número de hepatócitos em mitose, além de esteatose microgoticular difusa. Aparentemente a esteatose foi menos intensa no grupo tratado com células da fração mononuclear da medula óssea.

No tecido hepático obtido 72 horas após a hepatectomia pode ser observada modificação do padrão de esteatose, predominando a forma macrogoticular, acompanhada de um grande número de hepatócitos em mitose. A dinâmica das alterações histológicas observadas em diferentes momentos posteriores à hepatectomia pode ser visualizada nas fotomicrografias da Figura 11.

Em todos os grupos o número de hepatócitos em mitose apresentou marcada elevação a partir da 24ª hora, atingindo em média mais de 60 mitoses por campo de grande aumento às 72 horas após hepatectomia (Tabela 11 e Figura 12). Não houve diferença estatística significativa entre os grupos nos momentos avaliados.

Tabela 11 – Hepatócitos em mitoses de ratos submetidos à hepatectomia de 90% conforme o momento do sacrifício e o regime terapêutico.

Horas após HP	Sem células		Fração mononuclear		Medula óssea total		P*
	N	Média ±DP Mediana (Q1-Q3)	N	Média ±DP Mediana (Q1-Q3)	N	Média ±DP Mediana (Q1-Q3)	
6	5	0,2 ±0,4	5	1,0 ±1,0	5	1,0 ±0,7	0,178
		0,0 (0,0-0,5)		1,0 (0,0-2,0)		1,0 (0,5-1,5)	
12	5	0,6 ±0,5	5	0,4 ±0,5	5	0,8 ±0,4	0,459
		1,0 (0,0-1,0)		0,0 (0,0-1,0)		1,0 (0,5-1,0)	
24	5	7,2 ±5,5	5	1,2 ±2,2	5	12,6 ±24,0	0,252
		9,0 (1,5-12,0)		0,0 (0,0-3,0)		0,0 (0,0-31,5)	
48	5	48,0 ±25,4	5	57,8 ±23,3	5	68,4 ±26,4	0,264
		44,0 (29,0-69,0)		56,0 (38,5-78,0)		58,0 (46,5-95,5)	
72	5	55,2 ±13,2	5	62,8 ±17,5	5	58,4 ±28,8	0,740

51,0 (44,0-68,5)	68,0 (48,5-74,5)	60,0 (32,5-83,5)
---------------------	---------------------	---------------------

DP=desvio padrão; HP=hepatectomia parcial; Q1=primeiro quartil; Q3=terceiro quartil.

* Teste de Kruskal Wallis.

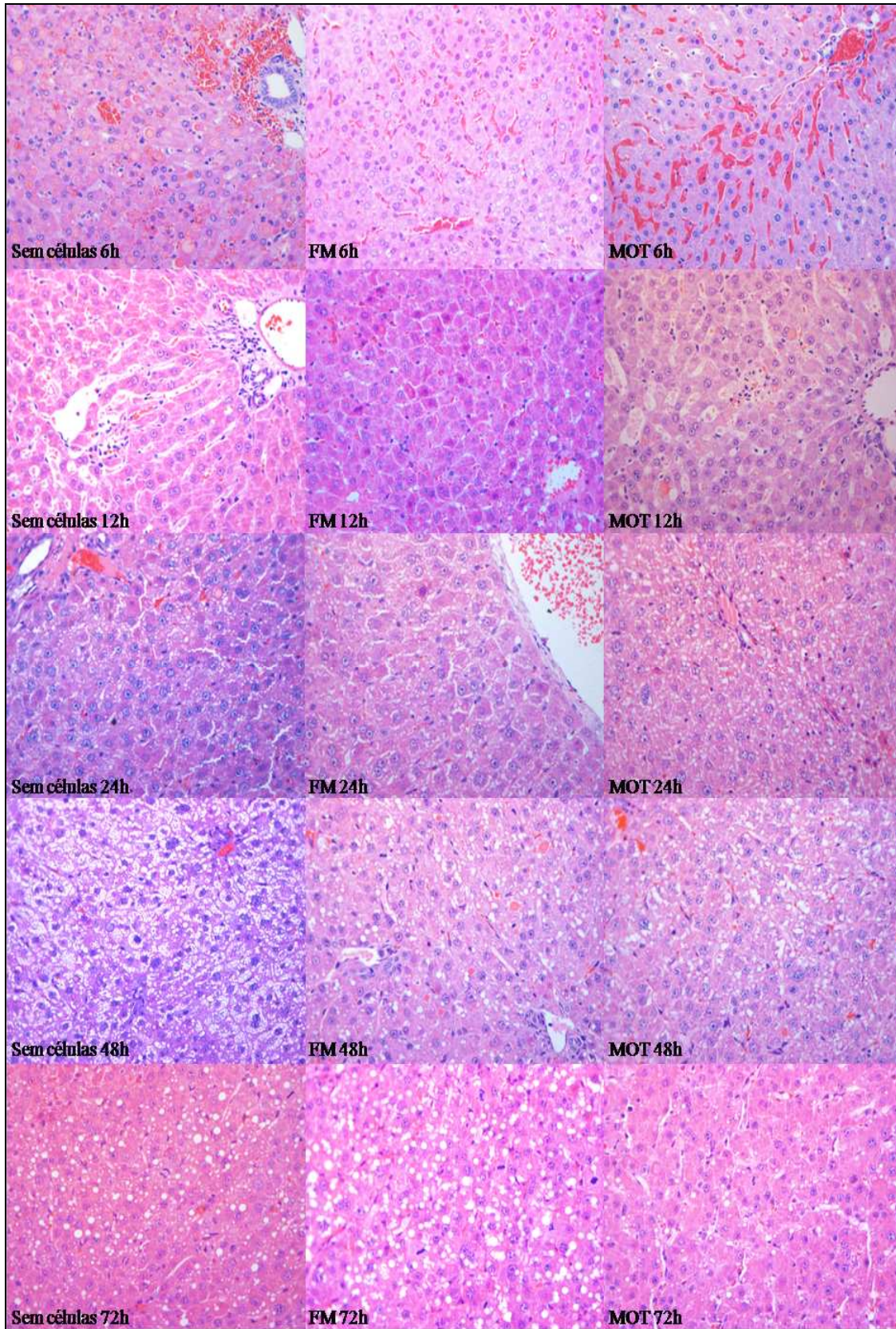


Figura 11 – Tecido hepático corado por hematoxilina e eosina (HE) (400x) de ratos submetidos à hepatectomia de 90% conforme o momento do sacrifício e o regime terapêutico.

FM=fração mononuclear; MOT=medula óssea total.

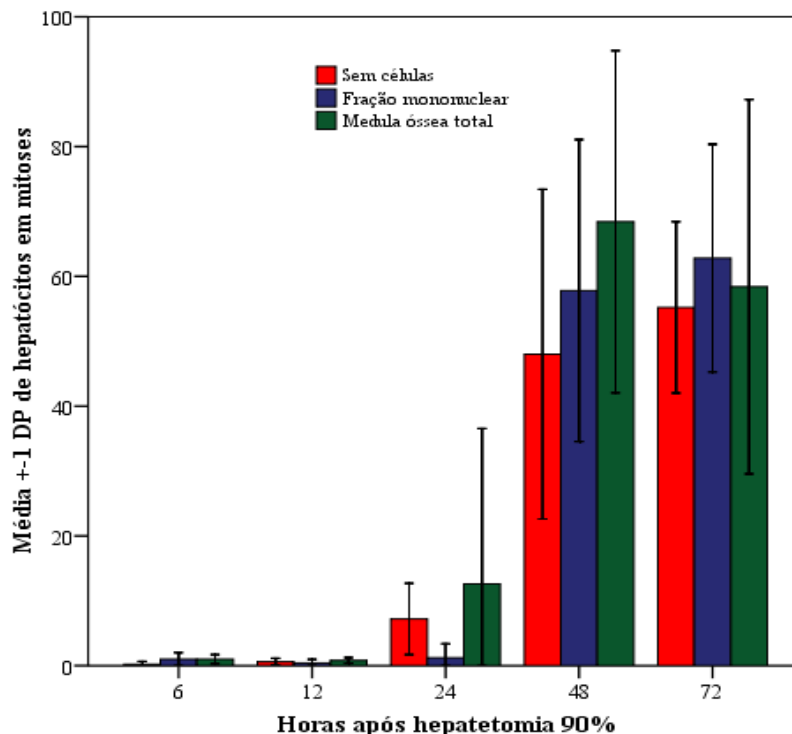


Figura 12 - Hepatócitos em mitoses de ratos submetidos à hepatectomia de 90% conforme o momento do sacrifício e o regime terapêutico.

Níveis séricos de citocinas e de fatores de crescimento

A média do nível de IL-6 nas 3 amostras coletadas antes da hepatectomia foi de $5,1 \pm 3,6$ pg/mL, com mediana de 4,6 (Q1=1,7; Q3=6,7) pg/mL. Os valores nos diversos momentos e conforme os regimes terapêuticos estão demonstrados na Tabela 12 e na Figura 13. Não houve diferença estatística significativa dos níveis de IL-6 entre os grupos.

A média do nível de TGF-beta nas 3 amostras coletadas antes da hepatectomia foi de $42,2 \pm 7,74$ ng/mL, com mediana foi de 42,3 (Q1=34,4; Q3=46,1) ng/mL. Os valores nos diferentes momentos e conforme os regimes terapêuticos estão demonstrados na Tabela 13 e na Figura 14. Houve diferença estatística significativa dos níveis de TGF-beta entre os grupos somente nas amostras coletadas às 12 horas após a hepatectomia. Os valores dos animais do grupo sem células foram significativamente superior aos dos ratos tratados com fração mononuclear ($P=0,036$).

Tabela 12 – IL-6 sérica (pg/mL) de ratos submetidos à hepatectomia de 90% conforme o momento do sacrifício e o regime terapêutico.

Horas após HP	Sem células		Fração mononuclear		Medula óssea total		P*
	N	Média ±DP Mediana (Q1-Q3)	N	Média ±DP Mediana (Q1-Q3)	N	Média ±DP Mediana (Q1-Q3)	
6	2	268,8 ±42,2	5	294,9 ±74,8	5	259,8 ±84,6	0,764
		268,8 (239,0-298,7)		278,5 (235,3-362,7)		264,2 (177,4-340,1)	
12	5	285,1 ±180,6	5	299,3 ±154,9	4	240,1 ±12,2	0,869
		217,0 (158,2-446,1)		261,8 (172,6-444,6)		239,5 (228,9-251,9)	
24	5	138,2 ±42,1	5	217,1 ±69,5	5	111,4 ±58,0	0,097
		124,9 (100,6-182,3)		253,4 (144,1-272,0)		106,6 (61,5-163,6)	
48	5	98,2 ±46,2	5	89,0 ±31,6	5	107,5 ±56,1	0,826
		110,5 (52,3-137,9)		89,3 (58,0-119,7)		90,6 (64,8-158,5)	
72	5	93,3 ±28,8	5	94,2 ±45,7	5	89,1 ±36,0	0,953
		90,6 (67,6-120,3)		90,6 (58,7-131,6)		74,5 (64,2-121,4)	

DP=desvio padrão; HP=hepatectomia parcial; Q1=primeiro quartil; Q3=terceiro quartil.

* Teste de Kruskal Wallis.

Tabela 13 – TGF-beta sérico (ng/mL) de ratos submetidos à hepatectomia de 90% conforme o momento do sacrifício e o regime terapêutico.

Horas após HP	Sem células		Fração mononuclear		Medula óssea total		P*
	N	Média ±DP Mediana (Q1-Q3)	N	Média ±DP Mediana (Q1-Q3)	N	Média ±DP Mediana (Q1-Q3)	
6	5	60,5 ±27,8	5	65,1 ±41,2	5	78,5 ±21,1	0,468
		47,0 (42,1-85,6)		41,3 (33,3-108,8)		87,8 (57,7-94,7)	
12	5	69,1 ±18,5	5	45,9 ±9,6	5	50,7 ±7,8	0,027 ^{&}
		64,8 (56,5-83,7)		41,1 (38,8-55,5)		54,9 (42,3-56,9)	
24	5	49,8 ±20,4	5	73,9 ±30,0	5	57,5 ±25,9	0,566
		49,5 (30,4-69,4)		75,2 (50,0-97,2)		47,8 (35,5-84,2)	
48	5	26,8 ±20,4	5	39,5 ±10,8	5	44,4 ±25,6	0,145
		25,1 (11,6-42,9)		33,7 (31,3-50,7)		38,2 (27,5-64,4)	
72	5	38,3 ±11,7	5	36,5 ±4,5	5	50,7 ±20,0	0,482
		42,2 (26,8-47,9)		35,0 (32,9-41,0)		39,3 (35,1-71,9)	

DP=desvio padrão; HP=hepatectomia parcial; Q1=primeiro quartil; Q3=terceiro quartil.

* Teste de Kruskal Wallis e teste de Dunn.

[&] Sem células x fração mononuclear: P=0,027

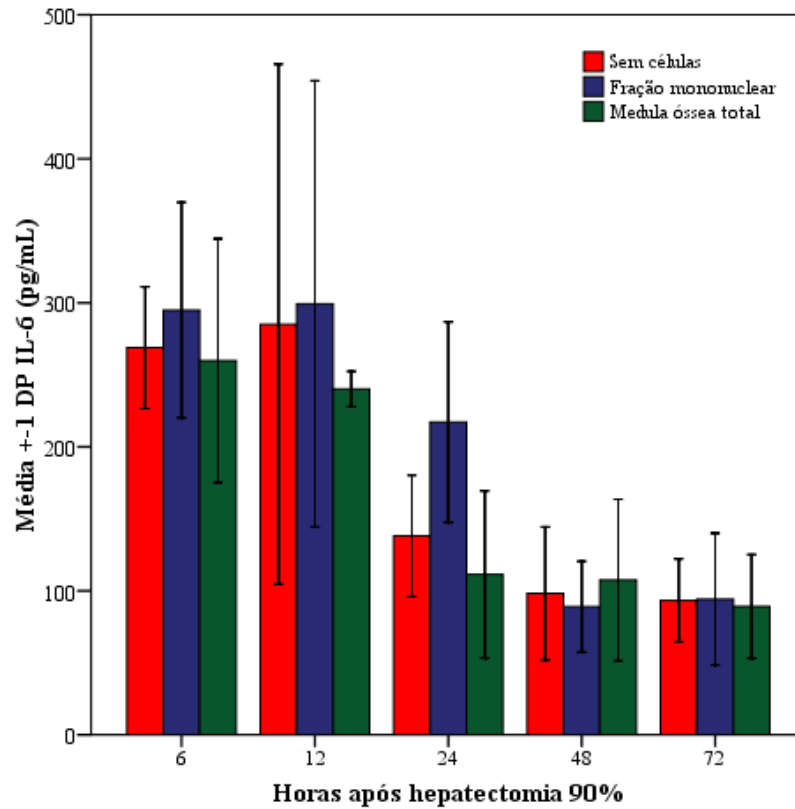


Figura 13 - IL-6 sérica (pg/mL) de ratos submetidos à hepatectomia de 90% conforme o momento do sacrifício e o regime terapêutico.

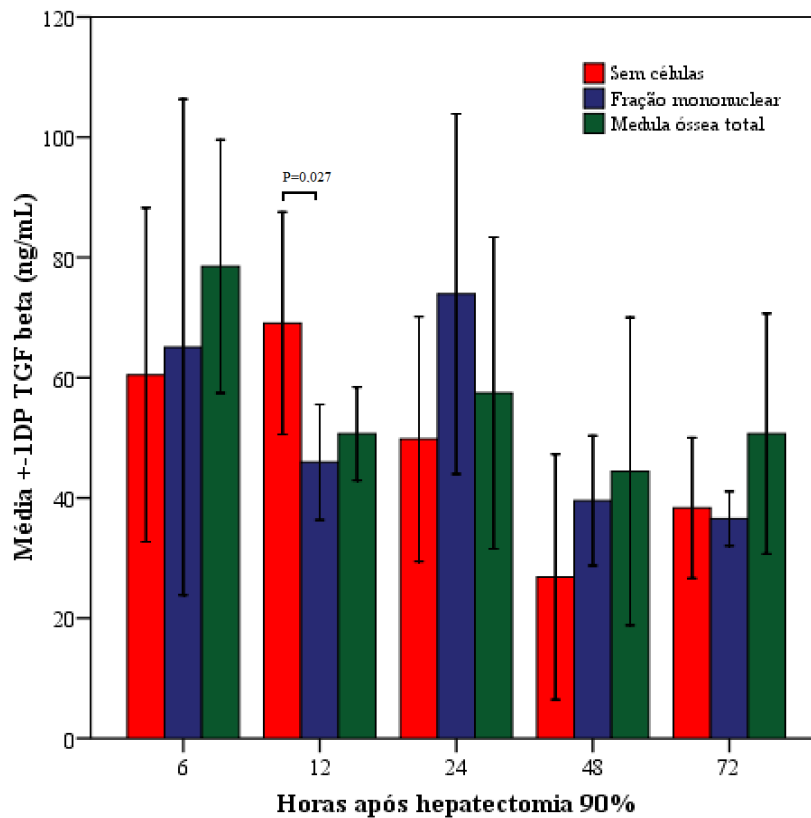


Figura 14 - TGF-beta sérico (ng/mL) de ratos submetidos à hepatectomia de 90% conforme o momento do sacrifício e o regime terapêutico.

A média do PDGF-BB sérico de 3 amostras coletadas antes da hepatectomia foi de $5,73 \pm 0,85$ ng/mL, com mediana de 6,2 (Q1=4,8; Q3=6,2) ng/mL. Os valores do PDGF-BB nos diferentes momentos e conforme os regimes terapêuticos estão demonstrados na Tabela 14 e na Figura 15. Não houve diferença estatística significativa dos níveis de PDGF-BB entre os grupos na maioria dos momentos avaliados. Somente nas amostras coletadas às 48 horas após a hepatectomia os valores de PDGF-BB dos animais do grupo sem células foram significativamente inferiores aos dos ratos tratados com fração mononuclear ($P=0,017$).

Tabela 14 – PDGF-BB sérico (ng/mL) de ratos submetidos à hepatectomia de 90% conforme o momento do sacrifício e o regime terapêutico.

Horas após HP	Sem células		Fração mononuclear		Medula óssea total		P*
	N	Média \pm DP Mediana (Q1-Q3)	N	Média \pm DP Mediana (Q1-Q3)	N	Média \pm DP Mediana (Q1-Q3)	
6	5	7,8 \pm 0,2	5	7,5 \pm 1,0	5	7,9 \pm 0,8	0,153
		7,9 (7,6-8,0)		7,8 (6,6-8,2)		8,1 (7,3-8,3)	
12	5	7,7 \pm 0,6	5	6,5 \pm 3,0	5	7,9 \pm 0,8	0,778
		7,8 (7,1-8,1)		7,6 (4,4-8,1)		7,7 (7,7-8,0)	
24	5	6,3 \pm 0,9	5	6,7 \pm 1,0	5	6,8 \pm 0,3	0,532
		6,3 (5,5-7,0)		6,8 (5,9-7,6)		6,8 (6,6-7,1)	
48	5	3,6 \pm 1,3	5	6,8 \pm 1,4	5	5,6 \pm 1,5	0,021 ^{&}
		3,4 (2,5-4,7)		7,6 (5,4-7,9)		5,7 (4,2-7,0)	
72	5	6,3 \pm 2,1	5	4,7 \pm 2,2	5	6,5 \pm 1,9	0,343
		6,6 (4,6-7,9)		4,7 (2,7-6,6)		7,4 (4,4-8,1)	

DP=desvio padrão; HP=hepatectomia parcial; Q1=primeiro quartil; Q3=terceiro quartil.

* Teste de Kruskal Wallis e teste de Dunn.

[&] Sem células x fração mononuclear: $P=0,017$.

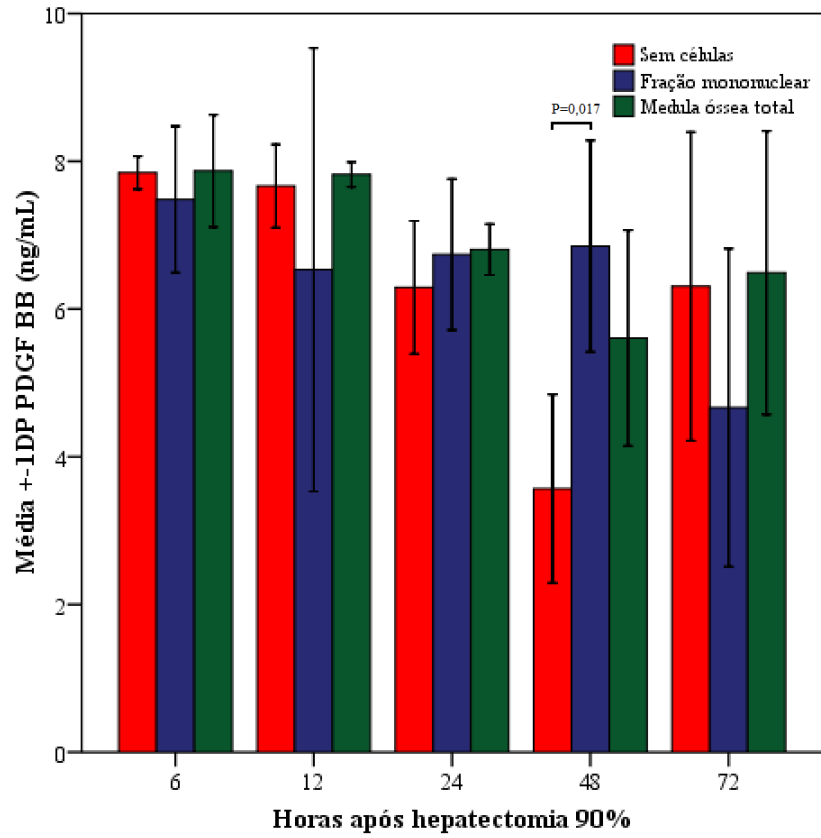


Figura 15 - PDGF-BB sérico (ng/mL) de ratos submetidos à hepatectomia de 90% conforme o momento do sacrifício e o regime terapêutico.

7. DISCUSSÃO

7. DISCUSSÃO

Os modelos animais são importantes instrumentos para a ampliação do entendimento da patogênese da insuficiência hepática aguda, da evolução da doença, do manejo das complicações e dos mecanismos envolvidos na regeneração hepática, sendo também necessários para o desenvolvimento e avaliação de novas abordagens terapêuticas (Martins *et al.*, 2008).

As características anatômicas do fígado de ratos e camundongos permitem a realização de diferentes graus de ressecção da massa hepática, conforme a combinação dos lobos removidos (Aller *et al.*, 2009). A hepatectomia de 70% é o principal modelo utilizado nos estudos de regeneração hepática (Roger *et al.*, 1995; Panis *et al.*, 1997; Myronovych *et al.*, 2008) e a ressecção de 90% constitui adequado modelo experimental de insuficiência hepática aguda (Madrahimov *et al.*, 2006; Martins *et al.*, 2008; Aller *et al.*, 2009).

7.1. FASE 1 – MODELO DE INSUFICIÊNCIA HEPÁTICA AGUDA POR HEPATECTOMIA PARCIAL EM RATOS

O desenvolvimento de um modelo experimental de avaliação de terapias para a insuficiência hepática aguda requer que ao menos 2 dos critérios propostos por Terblanche e Hickman (1991) sejam considerados: alta mortalidade antes da regeneração hepatocitária e janela terapêutica adequada (Terblanche & Hickman, 1991).

Após hepatectomia parcial extensa, a capacidade regenerativa do tecido hepático remanescente geralmente limita o tempo da condição de insuficiência a no máximo 3 ou 4 dias (Weinbren & Dowling, 1972; Emond *et al.*, 1989; Panis *et al.*, 1997). Para a reprodução da alta mortalidade característica da insuficiência hepática aguda, o número de óbitos deve ser elevado, mas os óbitos não devem ocorrer muito precocemente, possibilitando uma janela para a avaliação de possíveis tratamentos.

As ressecções hepáticas inferiores a 90% em ratos e camundongos apresentam elevada sobrevida, particularmente quando controlada a queda nos níveis de glicose sanguínea, e não determinam uma situação de insuficiência hepática (Panis *et al.*, 1997). Panis e colaboradores relataram elevada mortalidade em 96 horas com a ressecção de 85% do fígado de ratos Wistar sem a suplementação de glicose. A retirada de 90% do fígado determinou 100% de mortalidade nas primeiras 48 horas. Os autores atribuem os óbitos à hipoglicemia observada no pós-operatório de hepatectomia de 85 e 90%. O controle da queda dos níveis de glicose poderia reduzir a mortalidade após hepatectomia extensa (Panis *et al.*,

1997). Em nosso estudo, 50% dos animais submetidos à hepatectomia de 85% permaneceram vivos no terceiro dia de pós-operatório (Figura 3). A reposição de glicose não modificou a sobrevida, mas determinou nível de glicose maior às 6 horas após a hepatectomia (Figura 4). Também não houve diferença no peso dos lobos remanescentes entre os 2 grupos (Tabela 5). A sobrevida da metade dos animais após 72 horas inviabilizou a utilização desse grupo como modelo para eventuais estudos terapêuticos.

Níveis glicêmicos

A ampliação da ressecção hepática de 70 para 90%, além da redução da sobrevida (Caruana *et al.*, 1986; Emond *et al.*, 1989), se acompanha de queda dos níveis de glicose sérica nas primeiras horas (Cochran & Losek, 2007). Em animais submetidos à hepatectomia de 90 e 95% a hipoglicemia grave está associada à maior mortalidade (Gaub & Iversen, 1984; Caruana *et al.*, 1986; Emond *et al.*, 1989; Nakamura *et al.*, 1997). Os animais sobreviventes mantêm níveis glicêmicos mais elevados, próximos da normalidade, enquanto que os não sobreviventes apresentam hipoglicemia persistente após a hepatectomia (Nakamura *et al.*, 1997). Considerando que o fígado é o órgão chave na produção, armazenamento e distribuição de nutrientes e de energia, a perda aguda da massa hepatocitária se acompanha de redução do estoque de glicogênio, da capacidade de gliconeogênese e de manutenção da glicemia durante o jejum (Emond *et al.*, 1989).

Nesses casos, a mortalidade precoce pode ser parcialmente reduzida evitando-se a hipoglicemia grave com a administração de 20% de glicose na água de beber (Roger *et al.*, 1995; He *et al.*, 2003). Em nosso estudo, o prolongado tempo de recuperação anestésica da ketamina e xilazina tornou ineficaz o oferecimento de glicose na água de beber aos ratos submetidos a 90% de hepatectomia, pois somente, 20% dos animais haviam despertado da anestesia 6 horas após o final do procedimento (Anexo 4). No grupo anestesiado com isoflurano, a ingestão da água com glicose ocorreu minutos após o final da cirurgia. Não houve hipoglicemia nas primeiras horas e a sobrevida em 6 horas foi elevada (93,3%) (Figura 5).

A suplementação de glicose através da água de beber pode não ser suficiente para a prevenção de hipoglicemia grave em hepatectomias superiores a 90% (Roger *et al.*, 1995; He *et al.*, 2003). A monitoração estreita da glicemia e a correção da hipoglicemia com a administração intraperitoneal de 5% de glicose, associada a sua adição na água, em ratos com ressecção de 90%, pode elevar a sobrevida a 80% (He *et al.*, 2010). Com esse modelo foi possível a expansão da ressecção a 95%, com sobrevida superior 20%. Em nosso estudo, a

aplicação intraperitoneal profilática de glicose nos ratos submetidos a 90% de hepatectomia com ketamina e xilazina não foi capaz de prevenir a hipoglicemia em todo o período de acompanhamento e não impediu a evolução para o óbito de 73,3% dos animais.

Anestesia

A definição do regime anestésico para a realização de procedimentos cirúrgicos em animais de experimentação pode ser considerada um desafio. Muitos fatores influenciam na escolha, como a espécie, o sexo, a idade e o tamanho do animal, e o tipo de cirurgia que será realizado (He *et al.*, 2010). A experiência e a habilidade dos pesquisadores, os equipamentos e os recursos materiais e financeiros disponíveis devem ser considerados (Remie, 2010), assim como a segurança do animal e da equipe do laboratório. Nos procedimentos experimentais envolvendo ressecção hepática ou transplante de fígado, a anestesia ideal deveria ser a de mínimo efeito sobre a função hepática, pois a imediata redução da capacidade metabólica secundária à hepatectomia extensa pode alterar o metabolismo dos anestésicos utilizados, com repercussão sistêmica e sobre os parâmetros em estudo (Gaertner *et al.*, 2008; He *et al.*, 2010).

Apesar de seu emprego ser usual em experimentação com roedores (Richardson & Flecknell, 2005; Stokes *et al.*, 2009; Remie, 2010) e de oferecer vantagens técnicas e econômicas em relação aos outros regimes anestésicos (He *et al.*, 2010), as características farmacológicas da associação de ketamina e xilazina limitam a sua utilização em modelos de hepatectomia superiores a 85% em virtude da situação de insuficiência hepática aguda a que estão submetidos os animais,.

Nosso estudo mostrou que ketamina e xilazina em associação podem ser utilizadas em hepatectomia de até 85% (Figura 3). Com a ampliação da ressecção hepática para 90%, a mortalidade no pós-operatório imediato, em até 6 horas, aumentou de 8,3 para 73,3% (Figura 5). A diminuição da massa hepática remanescente determinou a redução da capacidade metabólica hepática dos anestésicos e dos carboidratos, pois a ketamina e a xilazina são metabolizadas extensivamente pelo sistema enzimático mitocondrial hepático (Gaertner *et al.*, 2008; He *et al.*, 2010). O aprofundamento do plano anestésico, provocando depressão cardiorrespiratória, e a hipoglicemia grave possivelmente foram os determinantes dos óbitos nas primeiras 6 horas no grupo de ratos submetidos a 90% de hepatectomia (Anexo 4). Além disso, foram descritos possíveis efeitos da ketamina e da xilazina sobre o metabolismo dos carboidratos. Em ratos, a ketamina (Reyes Toso *et al.*, 1995; Meyer & Fish, 2008) e a xilazina (Hsu *et al.*, 1986; Gaertner *et al.*, 2008) podem promover hiperglicemia,

isoladamente ou em associação (Kawai et al., 1997). Por outro lado, hipoglicemia foi relatada com a administração prolongada da associação de ketamina e xilazina (Simpson, 1997; Gaertner et al., 2008).

Para a realização de hepatectomia com remoção de 90% ou mais da massa hepática, outros esquemas anestésicos diferentes da ketamina e xilazina têm sido utilizados. O pentobarbital, empregado em alguns estudos (Zhang *et al.*, 1996; Liu & Chang, 2006; Hayashi *et al.*, 2009; Liu & Chang, 2009) tem pequeno poder anestésico e cirurgias invasivas precisam ser realizadas com altas doses, muito próximas da dose letal (Remie, 2010). A aplicação intraperitoneal em ratos está associada à agitação leve, tanto na indução como na recuperação (Meyer & Fish, 2008). Além da pobre atividade anestésica e da pequena janela terapêutica, o pentobarbital exige um tempo prolongado de recuperação anestésica. Seu metabolismo é hepático através do citocromo P450, com excreção biliar de 28% da dose administrada em até 6 horas em ratos (Meyer & Fish, 2008). Tais características tornam inadequada a utilização do pentobarbital na anestesia cirúrgica de ratos submetidos à hepatectomia extensa.

A anestesia inalatória, principal regime anestésico descrito nos estudos com hepatectomia de 90% ou mais, proporciona um procedimento seguro e reprodutível em roedores (Gaertner *et al.*, 2008). Os anestésicos inalatórios usualmente utilizados são líquidos voláteis, que antes de serem liberados ao animal, devem ser vaporizados e misturados a um gás carreador (Remie, 2010). Comparativamente aos injetáveis, oferecem maior controle do tempo de duração e da profundidade anestésica, possibilitando a rápida reversão da depressão do sistema nervoso central com a redução dos níveis de anestésicos oferecidos. Também apresentam menor impacto metabólico e conseqüentemente, menor interferência nos dados estudados nas pesquisas. As desvantagens estão relacionadas à necessidade de maior monitoramento anestésico, particularmente durante a indução, de pessoal treinado e de equipamento especializado, o que resulta na ampliação dos custos de pesquisa (Gaertner *et al.*, 2008).

O isoflurano é um anestésico inalatório metil-etil éter halogenado de alta estabilidade molecular, o que determina que menos de 0,2% da dose inspirada seja metabolizada, sendo quase completamente eliminado no ar exalado (Bovill, 2008; Brunson, 2008). O tempo de indução e de recuperação é pequeno, e a profundidade pode ser fácil e rapidamente ajustada. É considerado o anestésico ideal para estudos de metabolismo e toxicidade, por apresentar mínimo metabolismo sistêmico, pequeno efeito sobre o sistema enzimático hepático e reduzido risco de danos hepáticos e renais (Shibutani, 2000; Bovill, 2008; Brunson, 2008;

Gaertner *et al.*, 2008). Entretanto, poucos estudos com modelos de hepatectomia extensa em murinos utilizaram o isoflurano (Sarac *et al.*, 1994; Madrahimov *et al.*, 2006; Deng *et al.*, 2011; Vanheule *et al.*, 2011), sendo o éter o anestésico mais utilizado (Gaub & Iversen, 1984; Roger *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 1995; Panis *et al.*, 1997; He *et al.*, 2003; Morioka *et al.*, 2006; Tokunaga *et al.*, 2008; Arakawa *et al.*, 2009; Ninomiya *et al.*, 2010).

Em nosso estudo, podemos observar os efeitos do isoflurano no pós-operatório de ratos submetidos a 90% de hepatectomia (Figura 5). O reduzido tempo de recuperação anestésica do isoflurano permitiu o despertar dos animais em minutos. Na avaliação da primeira hora do final da cirurgia todos os ratos estavam despertos e ativos. Não houve hipoglicemia nas primeiras horas após a cirurgia e a sobrevida em 6 horas foi elevada (93,3%).

O modelo de insuficiência hepática aguda desenvolvido por esse estudo – hepatectomia de 90% sob anestesia com isoflurano e reposição de glicose oral e intraperitoneal – cumpriu os pré-requisitos necessários para um modelo experimental de avaliação de terapias para a insuficiência hepática aguda, oferecendo uma janela terapêutica adequada apesar da alta mortalidade em 72 horas.

7.2. FASE 2 – AVALIAÇÃO DO EFEITO DE DIFERENTES TIPOS CELULARES NA SOBREVIDA DE RATOS SUBMETIDOS À HEPATECTOMIA DE 90%

Na segunda fase do estudo foram realizados os ensaios com diferentes tipos e quantidades de células imobilizadas em microcápsulas de alginato de sódio. O objetivo foi de avaliar a capacidade da terapia celular em reduzir a alta mortalidade do modelo de hepatectomia de 90%. Foram utilizadas células HepG2 e células da medula óssea de ratos Wistar doadores (Tabela 6).

Transplante de hepatócitos

O efeito do transplante de hepatócitos em diferentes modelos murinos de insuficiência hepática aguda tem sido avaliado em diversos ensaios (Horslen & Fox, 2004; Fitzpatrick *et al.*, 2009; Muraca, 2011). Esses estudos são heterogêneos quanto à metodologia empregada e aos seus objetivos, tornando bastante difícil a comparação de seus resultados. Os modelos de indução de lesão hepática são diversos, sendo utilizada a técnica da hepatectomia de 90% na maioria dos artigos (Demetriou *et al.*, 1988; Emond *et al.*, 1989; Wang *et al.*, 1991; Wang *et al.*, 1995; Nakamura *et al.*, 1997; Kobayashi *et al.*, 2000; Kobayashi *et al.*, 2000; Hamazaki

et al., 2002; Aoki *et al.*, 2005; Liu & Chang, 2005; Liu & Chang, 2006; Zhang *et al.*, 2009). Em um estudo, foi realizada a hepatectomia total (Aoki *et al.*, 2000), e em outros foram empregadas substâncias tóxicas, como a D-galactosamina (Wong & Chang, 1986), a tioacetamida (Rahman *et al.*, 2005) e o paracetamol associado à hepatectomia de 30% (Mai *et al.*, 2005; Sgroi *et al.*, 2011). A terapia celular consistia da administração de hepatócitos primários colhidos de outros animais doadores (ratos e cobaias) ou de seres humanos, ou hepatócitos obtidos de linhagens imortalizadas. Os hepatócitos livres ou imobilizados em microcápsulas, em quantidades variadas, foram implantados na cavidade peritoneal, baço ou administrados através da veia da porta.

A maioria dos resultados relatados por esses artigos aponta para um efeito benéfico do transplante de hepatócitos na sobrevida dos animais em insuficiência hepática aguda. Em alguns relatos a administração de hepatócitos conjunta com células do pâncreas (Wang *et al.*, 1991; Rahman *et al.*, 2005) ou de hepatócitos cultivados em meio com insulina (Wang *et al.*, 1995) apresentaram maior sobrevida, sugerindo um efeito estimulador da regeneração ou imunoprotetor hepatocitário.

Alguns estudos têm sugerido um efeito benéfico da imobilização e da imunoproteção dos hepatócitos transplantados, proporcionando aumento da sobrevida quando comparada ao implante de células livres. Demetriou e colaboradores (1988) fixaram hepatócitos em microcarreadores revestidos por colágeno e transplantaram no peritônio em ratos singênicos e alogênicos submetidos à hepatectomia de 90%. Em ambos os grupos houve elevação da sobrevida em até 40% em 28 dias e redução da hipoglicemia. Nenhum animal que recebeu hepatócitos livres sobreviveu mais que 5 dias (Demetriou *et al.*, 1988).

Aoki e colaboradores (2005) realizaram transplante de hepatócitos alogênicos primários dentro do baço de ratos submetidos à hepatectomia de 90%. Foi observada a ampliação da sobrevida em 7 dias de 36,4% no grupo de ratos transplantados com hepatócitos livres para 64,3% entre os animais que receberam as células contidas em microcápsulas da alginato-poli-L-lisina-alginato (APA) (Aoki *et al.*, 2005).

Após a administração de dose tóxica de paracetamol em camundongos Mai e colaboradores (2005) realizaram hepatectomia de 30%. Os animais que receberam os hepatócitos primários imobilizados em microcápsulas alginato de sódio e poli-L-lisina apresentaram maior sobrevida do que os grupos controle, com cápsulas vazias e os tratados com hepatócitos livres (Mai *et al.*, 2005).

Wong e colaboradores (1986) observaram maior tempo de sobrevida em ratos em insuficiência hepática aguda induzida por D-galactosamina e que receberam hepatócitos

primários encapsulados em alginato de sódio na cavidade peritoneal. Não foram transplantados hepatócitos livres e o grupo controle recebeu cápsulas vazias (Wong & Chang, 1986).

Outros autores relataram aumento da sobrevida com o transplante de hepatócitos, independentemente se as células haviam sido aplicadas de forma livre ou imobilizadas dentro das cápsulas. Hamazaki e colaboradores (2002) encapsularam em agarose-hidrogel esferóides de 100 a 200 hepatócitos de ratos F433 que haviam sido cultivados por 14 dias. Após hepatectomia de 90% o transplante de hepatócitos elevou a sobrevida em relação ao grupo controle (25%). Entretanto, não houve diferença na sobrevida em 3 dias entre os grupos tratados com células livres (60%) e com células encapsuladas (50%) (Hamazaki *et al.*, 2002).

Aumento da sobrevida em 14 dias foi relatado por Liu e colaboradores (2005 e 2006) após o transplante de hepatócitos primários de doadores singênicos, tanto livres (83%) como encapsulados (83%) em ratos submetidos à hepatectomia de 90% (Liu & Chang, 2005; Liu & Chang, 2006).

SgROI e colaboradores (2011) realizaram hepatectomia de 30% 15 horas após a administração de dose tóxica de paracetamol em camundongos. Houve ampliação da sobrevida nos animais que receberam no peritônio hepatócitos humanos imortalizados contidos em cápsulas de alginato de sódio e poli-L-lisina (48%) em relação ao grupo controle (23%). Contudo não houve diferença na comparação com os camundongos que receberam hepatócitos livres (37%) (SgROI *et al.*, 2011).

Rahman e colaboradores (2005) transplantaram hepatócitos imortalizados humanos (HepG2) encapsulados em alginato de sódio e poli-L-lisina em um modelo de insuficiência hepática aguda induzida por tiocetamida e obtiveram sobrevida de 40% em 7 dias. Entre os animais que receberam as cápsulas vazias a mortalidade foi de 100% (Rahman *et al.*, 2005).

Diferentemente dos artigos acima descritos, no presente estudo não foi demonstrado efeito benéfico significativo do implante de hepatócitos da linhagem HepG2 imobilizados em cápsula de alginato de sódio. Ao final de 10 dias de acompanhamento a sobrevida desse grupo foi de 31%, enquanto que no grupo que recebeu cápsulas sem células somente 6,7% completaram o mesmo período vivos (Figura 6). O pequeno número de animais em cada grupo pode explicar a ausência da significância estatística na diferença observada.

Entre os estudos acima descritos a sobrevida após o transplante de hepatócitos encapsulados variou de 48 a 83%. As diferenças metodológicas, como o tipo de hepatócito transplantado, a técnica de obtenção do isolamento celular, a quantidade de células

transplantadas e o modelo de indução da insuficiência hepática aguda, podem explicar as diferenças de resultados entre os estudos.

A possível perda da expressão fenotípica das células imortalizadas poderia alterar as suas funções metabólicas e a sua utilidade na insuficiência hepática aguda (Nakamura et al., 1997; Horslen & Fox, 2004). Em nosso estudo, os níveis de glicose sanguínea não foram diferentes entre o grupo de animais transplantados com células HepG2 e o grupo que recebeu cápsulas vazias (Tabela 7 e Figura 7), sugerindo a ausência de efeito metabólico desses hepatócitos. Nos estudos de Demetriou e colaboradores (1988) e de Aoki e colaboradores (2005), os ratos que receberam hepatócitos primários apresentaram, além de maior sobrevida, níveis superiores de glicemia em relação ao grupo controle, indicando que essas células podem fornecer um suporte metabólico que resulta no aumento da sobrevida (Demetriou et al., 1988; Aoki et al., 2005).

Transplante de células da medula óssea

A utilização clínica de células da medula óssea no tratamento da insuficiência hepática aguda é rara (Gasbarrini *et al.*, 2007) e os estudos experimentais em modelos animais são pouco frequentes e heterogêneos em seus métodos e objetivos. Os artigos publicados que avaliaram a sobrevida após o transplante de células da medula óssea em animais de experimentação apresentaram resultados discordantes. Makowka e colaboradores (1980) transplantaram na cavidade peritoneal células da medula óssea e hepatócitos obtidos de ratos doadores singênicos. Foi verificado efeito positivo dos dois tipos celulares na sobrevida de ratos Lewis com lesão hepática induzida por D-galactosamina (Makowka *et al.*, 1980).

O efeito do transplante de células mononucleares em dois diferentes modelos animais de lesão hepática aguda foi recentemente avaliado no CTG do HCPA. Tanto no modelo tóxico por paracetamol, como no induzido por CCl₄, houve significativa melhora da sobrevida em 72 horas dos ratos tratados (Belardinelli *et al.*, 2008; Baldo *et al.*, 2010). A sobrevida no modelo por paracetamol aumentou de 33,3% para 70,8% nos animais que receberam as células (Belardinelli *et al.*, 2008). No modelo com CCl₄, a infusão da mesma quantidade de células da medula óssea (1x10⁶ por rato) resultou em elevação da taxa de sobrevida de 48% para 100% dos animais (Baldo *et al.*, 2010).

Zhang e colaboradores (2009) induziram lesão hepática aguda com hepatectomia de 70% em ratos F344 pré-tratados com retrorsina para bloquear a capacidade proliferativa dos hepatócitos. A infusão de células da medula óssea obtidas de doadores congênicos, tanto pela

veia porta como pela veia peniana elevaram a sobrevida de 35% para 70% e 75%, respectivamente. O transplante de hepatócitos via portal não aumentou de forma significativa a sobrevida nos 28 dias de observação (50%) (Zhang *et al.*, 2009).

Tokai e colaboradores (2009) induziram falência hepática fulminante submetendo ratos à hepatectomia de 70% e à ligadura do pedículo do lobo direito. O transplante de células da medula óssea (2×10^6) não foi capaz de prolongar o tempo de sobrevida (Tokai *et al.*, 2009).

Somente os estudos de Liu e colaboradores (2005, 2006 e 2009) avaliaram o efeito do isolamento de células da medula óssea em microcápsulas em modelo murino de hepatectomia 90% (Liu & Chang, 2005; Liu & Chang, 2006; Liu & Chang, 2009). Inicialmente, esses autores relataram que o implante de células da medula óssea contidas em microcápsulas de alginato de sódio no peritônio eliminou os óbitos após a hepatectomia de 90%. A sobrevida dos animais que receberam células da medula óssea livres foi de 33%, semelhante ao grupo controle (Liu & Chang, 2005; Liu & Chang, 2006). O mesmo grupo realizou o implante de células-tronco mesenquimais microencapsuladas no baço de ratos e demonstrou aumento da sobrevida de nos animais tratados (92%). No grupo que recebeu as células livres a sobrevida foi de apenas 25%, semelhante ao grupo controle (Liu & Chang, 2009). Os autores sugerem que a imobilização e o isolamento proporcionado pelas microcápsulas protegeriam as células da reação imunológica do hospedeiro e permitiriam a sua transdiferenciação em hepatócitos. Esses novos hepatócitos derivados poderiam contribuir para a função hepática, aumentando a sobrevida (Liu & Chang, 2005; Liu & Chang, 2006). Outro mecanismo sugerido envolveria a estimulação da regeneração hepática pelos fatores tróficos secretados pelas células da medula óssea, particularmente as células-tronco mesenquimais (Liu & Chang, 2009).

Apesar da aparente semelhança metodológica com os estudos de Liu e colaboradores, as taxas de sobrevida dos ratos tratados com células da medula óssea foram menores em nosso estudo. O grupo que recebeu a totalidade das células da medula óssea atingiu sobrevida de 63,6% em 10 dias. Os animais que receberam a fração mononuclear da medula óssea, independentemente do número de células transplantadas, apresentaram sobrevida de aproximadamente 55% (Figura 6). Questões metodológicas e operacionais podem explicar as diferenças nos resultados. As variações na sobrevida podem ter sido influenciadas pelo pequeno número de animais transplantados pelo grupo de Liu, particularmente nos artigos de 2005 e 2006, nos quais grupo era constituído de somente 6 ratos. Em nosso estudo, os ratos doadores das células da medula óssea não eram singênicos aos animais receptores. Apesar do isolamento celular pelo alginato, a falta de identidade genética pode ter gerado algum tipo de

reação imunológica dos hospedeiros às proteínas secretadas, o que pode ter influenciado na sobrevida. Além disso, a presença de imperfeições na superfície e de impurezas no alginato de sódio pode estimular a resposta imunológica do hospedeiro às cápsulas, com produção de fibrose ao seu redor em longo prazo. A redução da permeabilidade dificulta o aporte de oxigênio e as trocas de nutrientes e pode levar à morte das células encapsuladas (Uludag *et al.*, 2000; Mai *et al.*, 2005; Zimmermann *et al.*, 2005; Sgroi *et al.*, 2011). Variações na concentração da diluição do alginato podem influenciar a viscosidade e a porosidade das microcápsulas (Zimmermann *et al.*, 2005; Barminko *et al.*, 2011). No modelo de hepatectomia de 90%, o efeito benéfico do suporte metabólico das células transplantadas precisa durar o tempo necessário para a recuperação da massa hepatocitária, o que geralmente ocorre até o 3º ou 4º dia após a cirurgia (Sgroi *et al.*, 2011). Apesar da padronização da técnica de encapsulação na fase inicial de nosso estudo e da experiência da equipe do CTG (Lagranha *et al.*, 2008; Mayer *et al.*, 2010; Matte *et al.*, 2011; Baldo *et al.*, 2012), algumas dificuldades verificadas na manutenção da velocidade do fluxo da suspensão celular e do ar constantes podem ter determinado imperfeições na superfície, além de microcápsulas de tamanho e formas irregulares. Durante os ensaios não foram feitas avaliações das características morfológicas das microcápsulas.

Níveis glicêmicos

Em nenhum dos estudos acima descritos foi avaliado o efeito do transplante de células da medula óssea e de hepatócitos sobre os níveis glicêmicos. Somente Nakamura e colaboradores (1997) relataram a associação de maior mortalidade nos animais que apresentavam hipoglicemia após o transplante celular e que essa tendência era independente do tipo de célula aplicada (Nakamura *et al.*, 1997). Em nosso estudo, não houve diferença nos níveis sanguíneos de glicose entre os grupos nas primeiras 48 horas após a hepatectomia (Tabela 7 e Figura 7). Somente a partir do terceiro dia, os grupos tratados com células da medula óssea apresentaram valores mais elevados que demais grupos. Aparentemente, o maior nível glicêmico poderia representar um melhor estado metabólico nesses grupos. Contudo, não houve diferença nos níveis de lactato sanguíneo (Figura 8). Possivelmente, o pequeno número de animais vivos a partir do 4º dia da cirurgia nos grupos sem células e com HepG2 pode ter influenciado esses resultados.

Regeneração hepática

A avaliação do ganho de peso dos lobos remanescentes após hepatectomia parcial foi relatada em dois artigos. Liu e colaboradores (2006) não observaram diferença no peso do

figado dos ratos que sobreviveram ao período de acompanhamento de 14 dias entre os grupos que receberam microcápsulas com e sem células. Aparentemente, o peso dos lobos foi menor nos grupos *sham* e naqueles com cápsulas vazias e com células da medula óssea livres. O pequeno número de ratos sobreviventes talvez possa explicar a ausência de diferença estatística significativa (Liu & Chang, 2006). No estudo de Zhang e colaboradores (2009) a taxa de recuperação da massa hepática original foi de aproximadamente 80% em 28 dias após a hepatectomia de 70%. A administração prévia de retrorsina reduziu a taxa de regeneração para 44%, demonstrando o efeito inibidor da regeneração celular da retrorsina. O transplante de células da medula óssea não modificou essa taxa (49%). Contudo, os animais que receberam hepatócitos apresentaram 63% da massa hepática original, indicando um efeito positivo sobre a regeneração hepatocitária (Zhang *et al.*, 2009). Em nosso estudo, não houve diferença entre os grupos tratados no peso dos lobos remanescentes e na razão peso dos lobos/peso corporal dos animais sobreviventes ao final do período de 10 dias (Tabela 8). O único rato sobrevivente do grupo que recebeu as cápsulas vazias apresentou aparente menor recuperação hepática. Contudo, a análise estatística foi prejudicada pelo pequeno número de animais. A avaliação tardia, com 10 dias ou mais, talvez não tenha capacidade de refletir os possíveis efeitos benéficos precoces da terapia celular sobre a regeneração hepática. A modulação da capacidade de recuperação da massa hepatocitária nos primeiros dias pode ser determinante da sobrevivência após a hepatectomia de 90%.

Os resultados dessa fase de nosso estudo e dos poucos trabalhos publicados sugerem que a terapia com células da medula óssea pode auxiliar na manutenção da vida durante as primeiras horas após a hepatectomia extensa, possibilitando a regeneração do fígado e a resolução do quadro de insuficiência hepática.

7.3. FASE 3 - AVALIAÇÃO DO EFEITO PRECOCE DA TERAPIA CELULAR EM RATOS SUBMETIDOS À HEPATECTOMIA DE 90%

O objetivo da terceira fase foi avaliar os efeitos da terapia celular no tecido hepático e no sangue nas primeiras horas que se seguem à hepatectomia extensa. O estudo foi desenhado para a obtenção de amostras de sangue e de fígado em 5 diferentes momentos nos 3 regimes terapêuticos. Somente os animais que sobrevivessem até o tempo estabelecido seriam analisados e, portanto, no mínimo 5 animais de cada grupo deveriam sobreviver em cada período de acompanhamento.

O conhecimento atualmente existente sobre a regeneração hepática está baseado nos resultados dos estudos com modelos animais de hepatectomia parcial, particularmente pela

ressecção de 70% da massa hepática de ratos e de camundongos (Taub, 2004; Aller *et al.*, 2009). Contudo, esse modelo não produz insuficiência hepática e não reproduz integralmente a situação clínica da perda aguda da função do fígado. Tal como ocorre com os modelos de lesão hepática induzidos por toxinas ou medicamentos, os mecanismos metabólicos e celulares descritos no processo regenerativo após hepatectomia de 70% não podem ser simplesmente transpostos à condição orgânica determinada pela hepatectomia de 90% (Martins *et al.*, 2008).

A ampliação da massa hepática ressecada, com manutenção de somente 10% do fígado original, provoca repercussão sistêmica e alta mortalidade (Eguchi *et al.*, 1996; Rahman & Hodgson, 2000; Madrahimov *et al.*, 2006; Martins *et al.*, 2008; Aller *et al.*, 2009). Em alguns poucos artigos, os conhecimentos originados com o modelo de hepatectomia de 70% foram comparados aos observados quando a ressecção hepática era estendida a 90% (Zieve *et al.*, 1985; Caruana *et al.*, 1986; Emond *et al.*, 1989; Zhang *et al.*, 1996; Panis *et al.*, 1997; Jensen, 2001; Mimuro *et al.*, 2002; Chang *et al.*, 2004; Makino *et al.*, 2005; Miura *et al.*, 2011; Vanheule *et al.*, 2011). Porém há poucos estudos sobre os mecanismos regenerativos hepáticos na insuficiência hepática aguda e sobre o seu impacto em todo organismo.

O processo adaptativo à condição da insuficiência hepática aguda secundária à ressecção hepática extensa se inicia imediatamente após a ligadura dos pedículos hepáticos de cada lobo e se concentra nas primeiras 72 horas. O tecido hepático remanescente deve garantir as funções hepáticas essenciais à vida e à homeostase do organismo durante esse período de recuperação da massa hepática (Fausto & Campbell, 2003; Michalopoulos, 2007). A superação dos primeiros 3 dias aumenta as chances de sobrevivência dos animais submetidos à hepatectomia de 90% (Figura 6).

Imediatamente após a lesão hepática ocorre uma amplificação na expressão de genes de resposta de fase aguda e de gliconeogênese (Greenbaum *et al.*, 1995; Leu *et al.*, 2001; Fausto & Campbell, 2003; Taub, 2004). Há uma interação entre os diferentes conjuntos de fatores de transcrição que são induzidos pela resposta regenerativa, a qual permite a manutenção das funções vitais e da homeostase metabólica e o desenvolvimento do processo regenerativo (Leu *et al.*, 2001; Taub, 2004).

7.3.1. Alterações histológicas após hepatectomia

As alterações histológicas verificadas nos primeiros dias após hepatectomia de 90% mostram a expressão celular e tecidual desse processo adaptativo à condição de insuficiência

hepática. Além disso, a redução da massa hepática provocada pela hepatectomia parcial leva ao aumento relativo do aporte sanguíneo portal, resultando em hiperperfusão e congestão venosa nos lobos remanescentes (Panis *et al.*, 1997; Martins & Neuhaus, 2007). Essa situação é semelhante ao observado após o transplante de um fígado pequeno para o tamanho do receptor, tanto em animais como em seres humanos (Lo *et al.*, 2003; Martins & Neuhaus, 2007; Ninomiya *et al.*, 2010).

A remoção cirúrgica dos lobos do fígado, mesmo sem dano direto aos lobos residuais, determina elevação relativa do fluxo sanguíneo nos lóbulos remanescentes. Enquanto que após hepatectomia de 70% o fluxo sanguíneo portal triplica sobre os lobos remanescentes (Michalopoulos, 2007), na ressecção de 90% do fígado o fluxo aumenta em até 10 vezes. Essa elevação do fluxo portal sobre o tecido hepático remanescente induz alterações metabólicas e hemodinâmicas na microcirculação portal e lesão nas células endoteliais sinusoidais levando à disfunção do sistema reticuloendotelial, com ativação das células de Kupffer, liberação de citocinas e desencadeamento de atividade inflamatória e do processo regenerativo (Yoshida *et al.*, 2007). Em pacientes que receberam enxerto de fígado pequeno para o seu tamanho foi descrito elevação dos níveis de HGF e de TGF-beta, tal como ocorre após a hepatectomia parcial em ratos (Sato *et al.*, 1997; Sato *et al.*, 1999; Ninomiya *et al.*, 2003; Michalopoulos, 2007).

A redução da pressão portal pode proteger o fígado após hepatectomia extensa pela redução da lesão da estrutura da parede sinusoidal. A realização conjunta de derivação porto-sistêmica aumenta a sobrevivência de ratos submetidos à hepatectomia de 90% (Fukuchi *et al.*, 2000). A realização de esplenectomia foi descrita como benéfica ao processo regenerativo após hepatectomia, possivelmente por reduzir a pressão venosa portal (Ito *et al.*, 2005; Arakawa *et al.*, 2009). Contudo, tem sido sugerido que a esplenectomia pode produzir também um efeito anti-inflamatório sobre o sistema porta e modificar a regeneração hepática. Na fase inicial da regeneração, a secreção de TGF-beta pelo baço retarda a regeneração hepática via inibição do HGF (Tomikawa *et al.*, 1996; Arakawa *et al.*, 2009). A esplenectomia em ratos submetidos à hepatectomia de 90% reduz a pressão portal e induz o aumento na expressão de hemeoxigenase-1, uma proteína induzida pelo estresse e que tem efeito citoprotetor sobre os hepatócitos via redução do TNF-alfa (Arakawa *et al.*, 2009). Esses mecanismos anti-inflamatórios poderiam explicar a melhora da sobrevivência e da regeneração hepática observadas nos animais esplenectomizados.

A hepatectomia de mais de 85% do fígado determina aumento da congestão venosa e o aparecimento de necrose, ambas mais proeminentes nas regiões centrolobulares (Emond *et*

al., 1989; Roger *et al.*, 1995; Eguchi *et al.*, 1996; Nakamura *et al.*, 1997; Panis *et al.*, 1997; Chang *et al.*, 2004; Martins & Neuhaus, 2007). Em nosso estudo, a congestão dos lobos remanescentes pode ser observada mesmo durante o procedimento cirúrgico. Imediatamente após a ligadura dos pedículos dos lobos que seriam retirados ocorria aumento do volume e o intumescimento dos lobos remanescentes. O peso dos lobos remanescentes verificados às 6 e às 12 horas após a hepatectomia foram, respectivamente, $2,7\pm 0,6$ e $2,6\pm 0,5$ vezes maiores que o peso estimado dos lobos caudados (dados não mostrados). Nas primeiras 12 horas após a hepatectomia, a congestão sinusoidal foi o achado histológico hepático mais significativo. Também foram identificados focos de necrose com infiltrado neutrocitário, dilatação sinusoidal e necrose hepatocitária isolada. A partir das 24 horas a presença de congestão foi progressivamente menos intensa e a esteatose hepatocitária passou a ser a característica histológica mais marcante (Figura 11), particularmente às 48 horas após a hepatectomia. Um aspecto interessante observado foi a modificação do padrão da esteatose com o tempo decorrido após a hepatectomia. Nas primeiras 24 e 48 horas, a esteatose microgoticular predominava, enquanto que às 72 horas o padrão dominante foi o de esteatose macrogoticular. Esses achados podem ser a representação da dinâmica resposta adaptativa do fígado à situação de insuficiência.

O acúmulo de lipídios é das características histológicas mais marcantes verificadas após a hepatectomia parcial (Murray *et al.*, 1981; Emond *et al.*, 1989; Eguchi *et al.*, 1996; Newberry *et al.*, 2008). Durante o processo regenerativo os hepatócitos apresentam alterações citoplasmáticas que envolvem o acúmulo transitório de gordura (esteatose microgoticular) entre 24 a 72 horas após a hepatectomia parcial (Murray *et al.*, 1981; Tijburg *et al.*, 1991; Michalopoulos & DeFrances, 1997; Nakamura *et al.*, 1997; Shteyer *et al.*, 2004; Newberry *et al.*, 2008).

O acúmulo de gotículas lipídicas no citoplasma pode ser observado em até 4 horas após a cirurgia, mas ocorre principalmente após as 12 horas. Às 24 horas, o volume de lipídios é quase 20 vezes maior que no fígado normal, ocupando mais de 7% do citoplasma celular (Murray *et al.*, 1981). A indução de genes chaves da adipogênese ocorre antes do pico de acumulação de lipídios, sugerindo que a esteatose hepatocitária ocorra por aumento programado de ácidos graxos sintetizados pelo próprio fígado (Farrell, 2004; Shteyer *et al.*, 2004). O fígado em regeneração produz sinais para a liberação dos ácidos graxos acumulados no tecido adiposo periférico e que serão utilizados na lipogênese hepática (Schofield *et al.*, 1987; Tijburg *et al.*, 1991; Newberry *et al.*, 2008). Mesmo em cultura, a proliferação de

hepatócitos primários está associada ao acentuado acúmulo intracelular de lipídios (Michalopoulos *et al.*, 1982; Shteyer *et al.*, 2004).

Os mecanismos moleculares regulatórios e o significado funcional da esteatose hepatocitária transitória não são totalmente conhecidos (Shteyer *et al.*, 2004; Newberry *et al.*, 2008). Tem sido sugerido que o acúmulo de gordura no citoplasma dos hepatócitos possui uma regulação específica e que deve ser essencial ao processo regenerativo (Shteyer *et al.*, 2004). A esteatose microgoticular representaria uma resposta metabólica adaptativa do fígado em regeneração, como uma forma de reserva de energia ou de constituintes da membrana celular prontamente disponíveis aos novos hepatócitos (Farrell, 2004; Shteyer *et al.*, 2004; Ferri *et al.*, 2005).

A existência de substrato energético suficiente para atender às exigências metabólicas da rápida proliferação celular é essencial para o sucesso da regeneração hepática (Newberry *et al.*, 2008). Após 24 horas da hepatectomia, os estoques de glicogênio estão esgotados e os hepatócitos são obrigados a utilizar a glicólise anaeróbica para a geração de energia, particularmente na área periportal (Ferri *et al.*, 2005). Esta condição metabólica pode induzir aumento nos autofagossomas e nos lisossomos dos hepatócitos da região periportal, por onde inicia a regeneração hepatocitária e, portanto onde a demanda de energia e de substratos para processos biossintéticos é maior após a hepatectomia (Ferri *et al.*, 2005).

Em nosso material, a análise histológica sugere que a esteatose foi mais intensa no grupo que recebeu as cápsulas vazias nas amostras de tecido hepático obtidas às 48 e às 72 horas após a hepatectomia (Figura 11). A redução da esteatose talvez seja resultado do efeito terapêutico das células da medula óssea e envolveria a diminuição do estresse metabólico com menor consumo energético e de glicose (Tabela 7 e Figura 7).

7.3.2. Avaliação da regeneração hepática

Durante a regeneração hepática após hepatectomia parcial ocorre alteração transitória da arquitetura lobular (Wack *et al.*, 2001; Ninomiya *et al.*, 2010). Inicialmente há proliferação hepatocitária, sem modificação significativa na matriz extracelular (Martinez-Hernandez & Amenta, 1995). Em torno de 24 horas após a hepatectomia parcial são observadas as primeiras mitoses hepatocitárias. As células não parenquimatosas iniciam sua proliferação mais tardiamente com pico de síntese de DNA após as 48 horas (Endo *et al.*, 2004). Cerca de 4 dias após a hepatectomia, as células estreladas iniciam a produção da matriz para a restauração da estrutura tecidual normal e ao mesmo tempo ocorre a replicação das células endoteliais sinusoidais (Michalopoulos, 2007; Ninomiya *et al.*, 2010).

A arquitetura sinusoidal apresenta pouca alteração após hepatectomia de 70%. A ampliação da ressecção para 90% provoca marcado desarranjo arquitetural e desaparecimento dos espaços sinusoidais durante o processo de regeneração (Chang *et al.*, 2004). A reorganização lobular e o restabelecimento do aspecto histológico normal ocorrem lentamente por várias semanas após a hepatectomia (Martinez-Hernandez & Amenta, 1995; Michalopoulos, 2007).

A reconstituição da massa hepática nos primeiros 3 dias após hepatectomia de 90% ocorre mais lentamente, quando comparado com ressecções de 60 ou 70% (Mimuro *et al.*, 2002; Chang *et al.*, 2004; Vanheule *et al.*, 2011). Contudo, ao final da primeira semana, a recuperação é semelhante à hepatectomia de 70%, atingindo entre 60 a 70% da massa hepática original (Mimuro *et al.*, 2002; Madrahimov *et al.*, 2006; Miura *et al.*, 2011). Em nosso estudo, o aumento do peso dos lobos remanescentes tornou-se mais significativo a partir das 48 horas após a hepatectomia (Tabela 9 e Figura 9).

A atividade mitótica dos hepatócitos diminui com a ampliação da hepatectomia (Yoshida *et al.*, 2007). Após hepatectomia de 70% podem ser observados hepatócitos em mitoses entre 24 e 72 horas, com o pico do número de mitoses às 36 horas. Há aumento progressivo da massa dos lobos remanescentes já a partir das 24 horas (Kato *et al.*, 1995; Mimuro *et al.*, 2002; Chang *et al.*, 2004; Vanheule *et al.*, 2011). As mitoses ocorrem mais tardiamente após a hepatectomia de 90%, sendo identificadas em número mínimo às 24 horas (Kato *et al.*, 1995; Mimuro *et al.*, 2002; Vanheule *et al.*, 2011). Por outro lado, o número de mitoses permanece elevado ainda às 72 horas após a cirurgia (Chang *et al.*, 2004). No presente estudo, as mitoses foram praticamente ausentes às 6 e às 12 horas e em pequeno número às 24 horas após a hepatectomia. Número significativo de hepatócitos em mitoses foi observado após 48 e 72 horas (Tabela 11 e Figura 12).

O atraso do início do processo regenerativo após hepatectomia de 90% pode estar relacionado à redução na síntese protéica, à deficiência metabólica dos lobos remanescentes pelas toxinas endógenas, à redução da glicogenólise e à diminuição das funções do sistema retículo-endotelial (Gaub & Iversen, 1984; Kubota *et al.*, 1997; Mimuro *et al.*, 2002).

Recentemente, foi demonstrado que a expressão de mRNA de PIGF (*Placental Growth Factor*) no tecido hepático dos lobos remanescentes de hepatectomia de 90% era significativamente menor que os valores encontrados uma hora após a ressecção de 70 ou de 80% da massa hepática (Vanheule *et al.*, 2011). O PIGF estimula a proliferação das células do endotélio sinusoidal e a liberação de fatores mitogênicos e anti-apoptóticos. A menor ativação da via do PIGF após a hepatectomia de 90% poderia ser determinante do atraso na

proliferação celular e no restabelecimento da massa hepática e da maior mortalidade desse modelo (Vanheule *et al.*, 2011).

Por outro lado, a expressão de proteína de fase aguda se eleva imediatamente após hepatectomia de 90%, sugerindo que, como uma estratégia de sobrevivência, ocorra uma priorização na regulação da resposta adaptativa para a síntese de proteína de fase aguda em detrimento dos genes envolvidos na regeneração (Jensen, 2001). Os níveis de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-6 e o TNF-alfa, estão marcadamente mais elevados após a hepatectomia de 90% e poderiam determinar o retardamento no processo regenerativo (Kamimukai *et al.*, 2001; Chang *et al.*, 2004). Os maiores níveis de IL-6 observados em nosso estudo (Tabela 12 e Figura 13) e nos modelos de insuficiência hepática aguda podem indicar o maior estresse metabólico da ampliação da massa ressecada (Chang *et al.*, 2004).

A ordem dos eventos regenerativos celulares determina a formação temporária de aglomerados avasculares de 10 a 14 hepatócitos. Esses aglomerados de hepatócitos se formam principalmente nas áreas periportais, por onde começa a proliferação hepatocitária. O restabelecimento da arquitetura vascular acompanha a reestruturação da matriz extracelular hepática a partir do 4º dia após a hepatectomia parcial. Os aglomerados de hepatócitos são invadidos pelas células sinusoidais, separando os hepatócitos em placas e restabelecendo a conexão entre os hepatócitos e as células endoteliais (Martinez-Hernandez & Amenta, 1995; Wack *et al.*, 2001; Taub, 2004; Michalopoulos, 2007; Ninomiya *et al.*, 2010).

Paradoxalmente foi sugerido que a proliferação hepatocitária inicial excessiva poderia ser prejudicial à função hepática (Endo *et al.*, 2004; Endo *et al.*, 2006; Arakawa *et al.*, 2009; Ninomiya *et al.*, 2010). A capacidade funcional dos hepatócitos aglomerados estaria reduzida pelo desequilíbrio do aporte vascular (Ninomiya *et al.*, 2010). A própria formação dos aglomerados poderia determinar compressão sinusoidal e redução do aporte sanguíneo (Ross *et al.*, 2001; Wack *et al.*, 2001; Ninomiya *et al.*, 2010). Uma resposta regenerativa mais cadenciada, através supressão da via de sinalização MEK/ERK, produziria menor formação de aglomerados hepatocitários e resultaria em maior sobrevida em modelo de hepatectomia de 90%. A supressão da explosão inicial da resposta proliferativa hepatocitária determinaria um processo regenerativo mais equilibrado entre os hepatócitos e as células endoteliais, com aumento da capacidade funcional do tecido hepático remanescente (Ninomiya *et al.*, 2010).

7.3.3. Efeitos da terapia celular

A terapia com células da medula óssea tem sido proposta como uma alternativa terapêutica para as doenças hepáticas crônicas, inclusive com a realização de ensaios clínicos

com seres humanos. O papel do transplante de células da medula óssea no tratamento da insuficiência hepática ou lesão aguda se mantém no campo da experimentação animal com poucos estudos publicados. A heterogeneidade dos artigos existentes dificulta a comparação dos resultados e uma avaliação consistente dos efeitos da terapia celular. De forma genérica esses estudos detalhados na Tabela 1 sugerem que o transplante de células da medula óssea pode determinar melhora da função do fígado e da sobrevivência dos animais em insuficiência hepática aguda.

Apoptose

Em um cenário de lesão tecidual aguda, um dos efeitos esperados das células-tronco é a redução da extensão da morte celular (Meirelles Lda *et al.*, 2009). Isso foi observado em experimentos de co-cultura (Rehman *et al.*, 2004) e em modelos animais de lesão tecidual de órgãos, como o pulmão (Block *et al.*, 2009), o cérebro (Kurozumi *et al.*, 2005), e os rins (Togel *et al.*, 2007; Wise & Ricardo, 2012). A apoptose dos hepatócitos é considerada uma importantes causa de falência hepática após hepatectomia extensa. Ela é induzida por endotoxemia através de fatores como TNF-alfa (Leist *et al.*, 1995), TGF-beta, superóxidos (Hasegawa *et al.*, 1999), caspases e Fas (Kamimukai *et al.*, 2001; Morita *et al.*, 2002; Yoshida *et al.*, 2007).

Em modelo murino de insuficiência hepática induzida por toxina, a terapia com células-tronco mesenquimais isoladas da medula óssea de humanos, reduziu a mortalidade e o número de hepatócitos apoptóticos (Parekkadan *et al.*, 2007). Possivelmente, a inibição da morte celular programada ocorra via produção pelas células da medula óssea de fatores como SDF-1, IGF-1, VEGF e TGF-beta (Rehman *et al.*, 2004; Togel *et al.*, 2007; van Poll *et al.*, 2008; Block *et al.*, 2009).

Dos estudos de terapia com células da medula óssea em modelos de insuficiência hepática aguda analisados (Tabela 1), somente Baldo e colaboradores estudaram a apoptose hepatocitária. O índice apoptótico, avaliado em tecido corado por HE obtido 72 horas após indução de lesão hepática por CCl₄, do grupo tratado com as células mononucleares da medula óssea não foi diferente do grupo controle (Baldo *et al.*, 2010). Em nosso estudo observamos pequeno número de hepatócitos apoptóticos (<5 em 10 campos de grande aumento) nas amostras de tecido hepático coradas com HE coletadas em diferentes momentos após hepatectomia de 90%, em todos os grupos (dados não mostrados). Talvez a utilização de um método mais sensível identificasse mais claramente os hepatócitos apoptóticos e explicasse o pequeno número identificado em nossas amostras. Yoshida e

colaboradores empregaram dois diferentes métodos de marcação celular de apoptose em amostras de tecido hepático colhidas nos 3 primeiros dias após hepatectomia de 90%. No dia 1, o índice de hepatócitos apoptóticos foi de 20% com o método do ISOL (*in situ oligo ligation*) e de 40% com TUNEL (*TdTmediated dUTP-biotin nick end labeling*). Às 48 e às 72 horas, a diferença dos métodos foi maior, em torno de 5% de hepatócitos apoptóticos marcados com ISOL e de 30% com TUNEL (Yoshida *et al.*, 2007).

Fusão e transdiferenciação celular

A fusão das células-tronco com hepatócitos ou a sua transdiferenciação em hepatócitos foram sugeridas como possíveis mecanismos de ação das células da medula óssea no aumento do número de hepatócitos durante a regeneração do fígado (Terada *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2003; Masson *et al.*, 2004; Quintana-Bustamante *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2009). Em diferentes tipos de modelos experimentais de lesão hepática foi demonstrado que as células-tronco hematopoiéticas podem repovoar o fígado lesado (Wang *et al.*, 2002; Dahlke *et al.*, 2003; Fausto & Campbell, 2003; Kanazawa & Verma, 2003). A transdiferenciação das células da medula óssea em células do tecido hepático foi demonstrada *in vitro* (Jang *et al.*, 2004; Pan *et al.*, 2008; Aurich *et al.*, 2009) e *in vivo* (Lagasse *et al.*, 2000). Contudo, esses eventos ocorrem lentamente e em uma frequência muito baixa (Thorgeirsson & Grisham, 2006). Mesmo após lesão hepática grave, a proporção de células da medula óssea diferenciadas em hepatócitos é muito pequena, variando de 0,008% a 0,8% da massa hepatocitária total (Mallet *et al.*, 2002; Fausto, 2004).

Em um modelo murino de lesão hepática aguda por CCl₄ associada à inibição da proliferação hepatocitária com retrorsina foi observada migração maciça de células hematopoiéticas da medula óssea (Dahlke *et al.*, 2003). A presença dessas células ocorreu independentemente da inibição da proliferação hepatocitária pela retrorsina. O infiltrado inflamatório com diversos tipos de células da medula óssea pode ser observado principalmente no primeiro dia após a indução da lesão hepática. No terceiro e no sétimo dia a quantidade de células inflamatórias decrescia e aos 14 dias retornava aos valores encontrados no pré-tratamento. Apesar da afluência maciça de células hematopoiéticas ao fígado lesado, não foi verificado benefício funcional. A presença de hepatócitos derivados das células transplantadas raramente foi observada e somente na fase tardia do período de acompanhamento. Os autores concluem que o processo de transdiferenciação de células da medula óssea em hepatócitos é lento e que somente ocorreria sob condições específicas (Dahlke *et al.*, 2003).

Em modelos murinos de hepatectomia parcial não há evidências de que células da medula óssea possam gerar hepatócitos durante a regeneração hepática (Fausto & Riehle, 2005). Fujii e colaboradores observaram que essas células participam do processo regenerativo do fígado, principalmente na regeneração das células endoteliais dos sinusóides (Fujii *et al.*, 2002). A transdiferenciação em hepatócitos de algumas células da medula óssea imobilizadas em microcápsulas alginato de sódio implantadas na cavidade peritoneal de ratos submetidos à hepatectomia de 90% foi relatada por Liu e colaboradores (2006). A modificação fenotípica foi observada tardiamente, no 14º dia após o procedimento, e demonstrou a permeabilidade da microcápsulas e a suscetibilidade das células encapsuladas aos diversos estímulos sistêmicos gerados pela situação de insuficiência hepática aguda (Liu & Chang, 2006). Em nosso estudo, a capacidade de transdiferenciação das células da medula óssea não foi avaliada.

Proteção hepática

O efeito hepatoprotetor associado à migração de células mononucleares da medula óssea foi demonstrado em camundongos com lesão hepática por CCl₄ verificado por menores níveis de ALT e AST e maior expressão de albumina nos animais tratados (Jin *et al.*, 2009; Jin *et al.*, 2010; Jin *et al.*, 2011). A comparação entre células-tronco mesenquimais e hematopoiéticas isoladas e em conjunto (fração mononuclear) demonstrou que as células-tronco mesenquimais isoladas apresentaram maior capacidade de migração que as dos outros 2 grupos, sugerindo que essa subpopulação de células tenha um papel importante na regeneração hepatocitária (Cho *et al.*, 2009).

Estímulo à regeneração hepática

A melhora da regeneração tecidual foi sugerida como outro efeito terapêutico das células-tronco. Esse efeito foi demonstrado em lesão experimental hepática e envolveria a estimulação dos programas endógenos de reparo tecidual através da secreção de moléculas bioativas (Caplan & Dennis, 2006; Parekkadan *et al.*, 2007; Kuo *et al.*, 2008; van Poll *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2009; Lin *et al.*, 2011).

Em nosso estudo, tanto o peso dos lobos remanescentes (Tabela 9 e Figura 9) como a razão do peso dos lobos remanescentes em relação ao peso corporal (Tabela 10 e Figura 10) dos animais sacrificados no terceiro dia foi significativamente maior no grupo que não recebeu células.

Entre os estudos que avaliaram o efeito da terapia celular na regeneração hepatocitária medida através do peso dos lobos remanescentes, Dahlke e colaboradores (2003) não observaram diferença no peso do fígado no 14º dia após a infusão de 1×10^8 células da medula óssea em ratos em falência hepática induzida por injeção intraperitoneal de CCl_4 e que receberam pré-tratamento com retrorsina (Dahlke *et al.*, 2003). O mesmo resultado foi observado em modelo de lesão hepática aguda com hepatectomia de 70% em ratos pré-tratados com retrorsina avaliados ao final de 28 dias de acompanhamento entre os animais tratados com infusão de células da medula óssea obtidas de doadores congênicos (Zhang *et al.*, 2009). Em modelo de hepatectomia de 90%, ao final de 14 dias, aparentemente o peso dos lobos remanescente nos grupos controles eram menores que nos animais tratados com células da medula óssea ou hepatócitos, contudo o pequeno número de animais sobrevivente não permitiu uma análise estatística (Liu & Chang, 2006). Em nosso estudo, tanto o peso dos lobos remanescentes (Tabela 9 e Figura 9) como a razão do peso dos lobos remanescentes em relação ao peso corporal (Tabela 10 e Figura 10) dos animais sacrificados no terceiro dia foi significativamente maior no grupo que não recebeu células. As diferenças de modelo e de período de avaliação da massa hepática não permitem uma comparação direta dos artigos acima descritos com os nossos resultados. A recuperação da massa hepática ocorre principalmente na primeira semana e a condição de insuficiência hepática após hepatectomia geralmente se encerra entre 72 e 96 horas (Mimuro *et al.*, 2002; Madrahimov *et al.*, 2006; Miura *et al.*, 2011).

Os nossos resultados sugerem que o simples aumento da massa dos lobos remanescentes pode não significar o restabelecimento da capacidade funcional hepática e da manutenção das funções vitais do fígado. Em alguns estudos foi observado que uma excessiva proliferação hepatocitária inicial poderia ser prejudicial à função hepática e à sobrevivência dos animais após hepatectomia extensa (Endo *et al.*, 2004; Endo *et al.*, 2006; Ninomiya *et al.*, 2010). A formação temporária de aglomerados de 10 a 14 hepatócitos sem o aporte sanguíneo adequado reduziria a capacidade funcional desses hepatócitos. Os próprios aglomerados poderiam provocar compressão sinusoidal e redução do aporte sanguíneo (Martinez-Hernandez & Amenta, 1995; Ross *et al.*, 2001; Wack *et al.*, 2001; Ninomiya *et al.*, 2010). Uma resposta regenerativa mais cadenciada produziria menor formação de aglomerados hepatocitários e resultaria em maior sobrevida. Embora não tenhamos comparado a formação de aglomerados hepatocitários entre os grupos, o transplante de células da medula óssea poderia auxiliar na redução da explosão proliferativa hepatocitária inicial e explicar o menor ganho de peso dos lobos remanescentes observado às

72 horas após a hepatectomia (Tabela 9, Tabela 10, Figura 9 e Figura 10). Um processo regenerativo mais equilibrado entre os hepatócitos e as células endoteliais, com aumento da capacidade funcional do tecido hepático remanescente poderia justificar a maior sobrevivência observada nos animais tratados com células da medula óssea (Figura 6).

Entre os poucos estudos que avaliaram o efeito da terapia com células da medula óssea sobre a atividade mitótica após a lesão ou a falência hepática aguda, Belardinelli e colaboradores (2008) não observaram diferença no índice mitótico hepatocitário 72 horas após lesão hepática aguda induzida por paracetamol entre os ratos que receberam células mononucleares da medula óssea e os controles (Belardinelli et al., 2008). Zhang e colaboradores (2009) também não identificaram maior índice de células marcadas por bromodeoxiuridina (BrdU) entre os animais que receberam infusão venosa de células da medula óssea 24 horas após hepatectomia de 70% em ratos pré-tratados com retrorsina (Zhang et al., 2009). Por outro lado, no estudo de Baldo e colaboradores (2010) o índice mitótico, avaliado 72 horas após a indução de lesão hepática por CCl₄, foi maior no grupo de animais tratado com células mononucleares da medula óssea. Os autores sugerem um possível efeito parácrino das células da medula óssea através da secreção de citocinas que estimulariam a proliferação hepatocitária (Baldo et al., 2010). Em nosso estudo, o número de hepatócitos em mitoses não foi diferente entre os regimes terapêuticos nos diversos momentos de avaliação (Tabela 11 e Figura 12). Novamente, as diferenças metodológicas dificultam a comparação dos resultados, mas aparentemente as células da medula óssea ou os seus fatores não produziram efeitos benéficos através do aumento da atividade mitótica hepatocitária.

Um aspecto interessante observado no presente estudo foi a existência de dissonância entre a massa dos lobos remanescentes e o número de mitoses observadas às 72 horas após a hepatectomia de 90%. Particularmente, o grupo que recebeu cápsulas sem células apresentou massa hepática significativamente maior que os grupos de animais tratados com células. Entretanto, no mesmo momento e nos momentos anteriores não foram observadas diferenças nos números de hepatócitos em mitoses. A hipertrofia hepatocitária, o acúmulo de gordura citoplasmática (Kato et al., 1995; Yang et al., 2010; Kwon et al., 2011) e a maior presença de outros tipos celulares poderiam explicar o maior peso dos lobos remanescentes observado nos animais não tratados. O efeito anti-inflamatório local das células da medula óssea poderia reduzir a presença de células inflamatórias e a congestão venosa (Dahlke et al., 2003; Jung et al., 2006; Zhang et al., 2009). A modulação da resposta inflamatória sistêmica pela terapia celular talvez tenha diminuído a demanda energética corporal, resultando em

menor consumo de glicose (Tabela 7 e Figura 7) e de glicogênio e em menor formação de esteatose macrogoticular hepatocitária (Figura 11).

Efeito sobre a resposta imune

O efeito imunomodulador das células da medula óssea tem sido observado em modelos de insuficiência hepática aguda. Van Poll e colaboradores (2008) relataram aumento da sobrevida, melhora na regeneração hepática e nos marcadores bioquímicos em animais com lesão hepática aguda induzida por D-galactosamina e tratados com infusão intravenosa de concentrado de meio condicionado de células-tronco mesenquimais humanas. Houve redução nas concentrações sanguíneas de citocinas pró-inflamatórias e menor infiltração de leucócitos no tecido hepático, além de redução na apoptose e de aumento na regeneração hepatocitária. Esses resultados sugerem que as células-tronco mesenquimais apresentam, além do efeito local no fígado lesionado, ação anti-inflamatória sistêmica e que poderiam contribuir na redução da SIRS e no aumento da sobrevida em um quadro de insuficiência hepática aguda (van Poll *et al.*, 2008).

O efeito das células da medula óssea à distância, via circulação sanguínea (mecanismo endócrino), sem a necessidade de sua presença no microambiente hepático lesado foi observado nos estudos de Liu e colaboradores. O implante na cavidade peritoneal ou dentro do baço de células da medula óssea imobilizadas em microcápsulas de alginato de sódio aumentou a sobrevida de ratos submetidos à hepatectomia de 90%, enquanto que o transplante de células da medula óssea livres no peritônio não reduziu a mortalidade (Liu & Chang, 2006; Liu & Chang, 2009). Os autores relataram níveis séricos de HGF mais elevados nos dias 2 e 3 após a hepatectomia de 90% nos animais que receberam as células da medula óssea encapsuladas e sugeriram que o HGF poderia ser secretado pelas células da medula óssea imobilizadas, absorvido pelo peritônio e levado pela circulação portal até os lobos remanescentes, onde poderia acelerar a regeneração hepática. Como no nosso estudo, redução na mortalidade observada nas primeiras 48 horas não pode ser explicada pelo aumento da massa hepatocitária ou pela diferenciação das células da medula óssea, pois ambos os processos não ocorrem imediatamente. Por outro lado, um efeito anti-inflamatório local e sistêmico das moléculas solúveis produzidas pelas células encapsuladas poderia justificar esses resultados (Liu & Chang, 2006).

Interleucina-6

Em seres humanos, os níveis de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-6 e o TNF-alfa, estão relacionados à extensão da lesão hepática (Mao *et al.*, 2011) e ao desenvolvimento de resposta inflamatória sistêmica, choque circulatório, necessidade de medicação vasopressora, edema cerebral e morte (Wigmore *et al.*, 1998; Nagaki *et al.*, 2000; Streetz *et al.*, 2000; Antoniades *et al.*, 2006; Berry *et al.*, 2010; Chastre *et al.*, 2010).

A IL-6 é uma citocina pleomórfica secretada pelas células T, B, endoteliais, epiteliais, fibroblastos, monócitos e macrófagos (Mianji *et al.*, 1996; Drucker *et al.*, 2010). No fígado é secretada pelos macrófagos residentes no tecido hepático, denominados de células de Kupffer (Drucker *et al.*, 2010) e é uma citocina efetora chave em vários processos relacionados à fisiologia hepática, que incluem resposta de fase aguda, hepatoproteção e mitogênese (Taub, 2004). A liberação de IL-6 constitui um passo crucial na regeneração hepática. Cerca de 36% dos genes expressos imediatamente após a hepatectomia podem ser dependentes da IL-6 (Li *et al.*, 2001; Su *et al.*, 2002; Taub, 2004; White *et al.*, 2005). Sob estímulo do TNF-alfa, as células de Kupffer produzem IL-6, que por efeito parácrino ativa os hepatócitos, tornando-os sensíveis à ação do HGF (Drucker *et al.*, 2010).

Nos modelos animais de hepatectomia parcial, a ampliação da extensão da massa hepática ressecada de 70 para 90% produz elevação significativa dos níveis de IL-6 e de TNF-alfa (Panis *et al.*, 1997; Kamohara *et al.*, 2000; Chang *et al.*, 2004). Panis e colaboradores (1997) identificaram níveis séricos de TNF-alfa, significativamente maiores nas primeiras 2 horas e após as 24 horas em ratos submetidos à hepatectomia de 85%, quando comparados aos animais com retirada de 70% da massa hepática (Panis *et al.*, 1997). Chang e colaboradores (2004) relataram um significativo aumento da IL-6 em ratos submetidos à hepatectomia de 90% quando comparado à hepatectomia de 70%, particularmente nas primeiras 6 e 12 horas após a cirurgia, com retorno aos níveis normais às 72 horas (Chang *et al.*, 2004). Em nosso estudo os níveis sanguíneos de IL-6 subiram vertiginosamente nas primeiras horas após a hepatectomia independentemente do regime terapêutico (Tabela 12 e Figura 13). Nos 3 grupos o zênite foi alcançado às 6 horas após a hepatectomia, com valores 50 vezes maiores aos níveis das amostras coletadas antes da cirurgia. Apesar de permanecerem elevados (± 20 vezes os níveis basais), os valores de IL-6 apresentaram queda progressiva até as 72 horas.

Aparentemente os primeiros sinais de regeneração permanecem intactos após a hepatectomia extensa, mas provavelmente ocorra uma desregulação das citocinas pró-inflamatórias associada à lesão dos lobos hepáticos remanescentes nas etapas subsequentes da restauração da massa hepática (Panis *et al.*, 1997). Apesar dos elevados níveis séricos de

IL-6, a análise da expressão tecidual hepática 12 horas após hepatectomia extensa demonstrou a falta de ativação da STAT3 e a supressão da translocação da STAT3 para dentro do núcleo celular (Kamohara *et al.*, 2000). Possivelmente, os níveis elevados de IL-6 tenham origem extra-hepática e possam ser representativos da gravidade do estresse sistêmico agudo secundário à hepatectomia de 90% (Kamohara *et al.*, 2000; Chang *et al.*, 2004). O aumento da endotoxemia secundária à congestão portal produzida pela súbita redução da massa hepática pode estimular a produção de IL-6 por células extra-hepáticas (leucócitos, células endoteliais, células epiteliais) (Mianji *et al.*, 1996; Hu *et al.*, 1998; Kamohara *et al.*, 2000). Essas observações indicam que diversas alterações humorais, celulares e moleculares contribuem para a perda da capacidade de proliferação hepatocitária na insuficiência hepática aguda causada por uma perda maciça de hepatócitos (Kamohara *et al.*, 2000).

As células-tronco mesenquimais produzem uma mistura complexa de citocinas, fatores de crescimento e quimiocinas. A redução local na regulação de citocinas pró-inflamatórias e o aumento da regulação de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10, após transplante de células-tronco mesenquimais foram descritos em modelos de lesão renal e pulmonar (Ortiz *et al.*, 2007; Togel *et al.*, 2007). Ornellas e colaboradores (2011) observaram que a infusão endovenosa de células mononucleares da medula óssea resultou em menor expressão gênica de IL-6 e maior de IL-10 no tecido pulmonar. Os autores sugerem que os efeitos benéficos da terapia celular sobre a sobrevida e sobre o infiltrado inflamatório pulmonar ocorrem através da modulação da resposta inflamatória (Ornellas *et al.*, 2011). Em um estudo realizado no Centro de Pesquisa Experimental do HCPA, Tavares e colaboradores (2010) observaram redução da expressão de TNF-alfa e de IL-6 após a infusão de células da medula óssea em modelo murino de infarto do miocárdio. Os resultados indicaram que a terapia celular interfere no processo inflamatório que se segue ao infarto (Tavares *et al.*, 2010).

Em nosso estudo, a terapia com células da medula óssea não modificou os níveis de IL-6 (Tabela 1 e Figura 13) em relação ao grupo controle, sugerindo que o efeito benéfico da terapia celular não envolva diretamente a IL-6 sanguínea. Não foram encontrados estudos que avaliassem os efeitos do transplante de células da medula óssea sobre a resposta inflamatória na insuficiência hepática aguda por hepatectomia extensa.

Redução nos níveis de IL-6 relacionada à terapia celular foi relatada em outros modelos de lesão hepática. Os efeitos imunomoduladores das células-tronco mesenquimais foram descritos por Yagi e colaboradores (2009), que as utilizaram em combinação com

hepatócitos em dispositivo de suporte hepático. Essa associação determinou menores níveis de citocinas inflamatórias (IL-6, TNF-alfa e IL-1), de amônia e de aminotransferases em ratos com lesão hepática induzida por D-galactosamina. Os autores sugerem que a maior sobrevida foi o resultado da combinação do suporte funcional dos hepatócitos com o efeito anti-inflamatório das células-tronco, revertendo a tempestade de citocinas e a síndrome da resposta inflamatória sistêmica (Yagi *et al.*, 2009). Em estudo semelhante, Van Poll e colaboradores (2008) observaram que a infusão intravenosa de meio condicionado de células-tronco mesenquimais no mesmo modelo aumentou a sobrevida, reduziu os níveis de IL-6 e TNF-alfa e elevou os valores séricos de IL-10. A produção de citocinas inflamatórias poderia explicar a rapidez do efeito observado (van Poll *et al.*, 2008; Gilchrist & Plevris, 2010).

TGF-beta

A inibição do processo regenerativo hepático é regulada por moléculas com o TGF-beta possivelmente através da indução de apoptose hepatocitária (Michalopoulos & DeFrances, 1997; Morita *et al.*, 2002). No fígado, a síntese de TGF-beta pelas células estreladas começa 2 a 3 horas após hepatectomia parcial, permanecendo elevada por até 72 horas (Jakowlew *et al.*, 1991; Ikeda *et al.*, 1998). Contudo, nas primeiras horas ocorre também redução da expressão dos receptores do TGF-beta, o que torna os hepatócitos resistentes aos seus efeitos inibitórios (Jakowlew *et al.*, 1991; Michalopoulos & DeFrances, 1997). O restabelecimento de sua ação ao final do processo de regeneração auxilia na finalização da onda proliferativa inicial com o retorno dos hepatócitos ao seu estado quiescente (Michalopoulos & DeFrances, 1997; Campbell *et al.*, 2001) e na organização da matriz extra-celular (Russell *et al.*, 1988; Eguchi *et al.*, 1997).

Yoshimoto e colaboradores (2005) relataram que a expressão tecidual hepática de TGF-beta era maior no grupo de ratos submetidos à hepatectomia de 90% e que haviam recebido LPS. Esses animais apresentaram menor sobrevida e maior número de hepatócitos em apoptose sugerindo que a estimulação da síntese de TGF-beta por LPS tem um papel importante no mecanismo da insuficiência hepática induzida por infecção após hepatectomia, especialmente por inibição da regeneração e por indução da apoptose hepatocitária (Yoshimoto *et al.*, 2005).

Em pacientes transplantados e que receberam enxerto de fígado pequeno para o seu tamanho a taxa de regeneração e os níveis de HGF e de TGF-beta são maiores, sugerindo

que após a aceleração da resposta regenerativa pelo HGF, a subsequente elevação do TGF-beta regule a proliferação hepatocitária e o tamanho do fígado (Ninomiya *et al.*, 2003).

O TGF-beta não foi estudado em nenhum dos artigos de terapia com células da medula óssea na insuficiência hepática aguda experimental (Tabela 1). Em nosso estudo os níveis de TGF-beta apresentaram elevação de cerca de 1,5 a 2 vezes os valores basais nas primeiras 6 horas, persistindo com leve elevação até 24 horas após a hepatectomia (Tabela 13 e Figura 14). Não houve diferença nos valores de TGF-beta entre os grupos terapêuticos nos diferentes momentos de avaliação, exceto às 12 horas. Nesse momento, os níveis séricos de TGF-beta foram mais altos no grupo que não recebeu células. A pequena variação do TGF-beta entre os grupos foi compatível com a ausência de diferença no número de hepatócitos em mitoses e com o pequeno número de apoptoses observado (Tabela 11 e Figura 12).

A liberação de TGF-beta pelas células da medula óssea, além da inibição da proliferação hepatocitária, poderia produzir efeito imunossupressor no microambiente tecidual (Giuliani *et al.*, 2011; Singer & Caplan, 2011). Recentemente, Ornellas e colaboradores (2011) relataram que a infusão endovenosa de células mononucleares da medula óssea determinava menor expressão gênica de TGF-beta no tecido pulmonar e redução na apoptose celular no pulmão, fígado e rins no primeiro dia após a indução de sépsis em camundongos. Os autores sugeriram que os efeitos benéficos da terapia celular observados sobre a sobrevida e o infiltrado inflamatório pulmonar ocorreriam através da modulação da resposta inflamatória (Ornellas *et al.*, 2011).

PDGF-BB

As plaquetas são essenciais para a resposta imune inata e no combate à infecção. Elas modulam a reação inflamatória através da interação com os leucócitos e com as células endoteliais. Estudos recentes têm enfatizado também o seu papel fundamental na recuperação do fígado lesionado (Matsuo *et al.*, 2008; Nurden, 2011; Ripoche, 2011). Após ativação as plaquetas liberam um arsenal de mediadores pró-inflamatórios, pró-coagulantes e fatores de crescimento, como tromboxano A₂, leucotrienos, serotonina, HGF, VEGF e PDGF sendo esses últimos envolvidos no processo regenerativo hepático (Vollmar & Menger, 2009; Nurden, 2011).

A trombocitopenia e a inibição da ativação plaquetária prejudicam a proliferação hepatocitária após hepatectomia experimental extensa (Lesurtel *et al.*, 2006) e após lesão hepática isquêmica (Nocito *et al.*, 2007; Ripoche, 2011). A indução de trombocitose e a

administração de plasma rico em plaquetas promovem a regeneração hepática e aumentam a sobrevida após hepatectomia extensa (Murata *et al.*, 2007; Myronovych *et al.*, 2008; Shimabukuro *et al.*, 2009; Matsuo *et al.*, 2011). Em seres humanos, a plaquetopenia é considerada um fator de risco para o atraso na recuperação da função hepática e para o aumento dos óbitos após ressecção hepática parcial ou transplante (Alkozai *et al.*, 2010; Matsuo *et al.*, 2011; Ripoché, 2011). Pacientes em insuficiência hepática aguda apresentam contagem de plaquetas e níveis séricos de trombopoietina diminuídos. Valores mais baixos de trombopoietina foram associados à maior mortalidade e podem estar relacionados à disfunção do fígado e à plaquetopenia (Okumoto *et al.*, 2007; Takayama *et al.*, 2011).

Os mediadores derivados de plaquetas, como o HGF, o TGF-beta, a serotonina e o PDGF-BB podem agir direta ou indiretamente sobre as células hepáticas contribuindo para a regeneração e para a manutenção das funções do fígado, prevenindo a insuficiência hepática aguda. As plaquetas atuam inibindo a apoptose dos hepatócitos, estimulando a progressão do ciclo celular e as vias metabólicas (Murata *et al.*, 2007; Matsuo *et al.*, 2008; Myronovych *et al.*, 2008; Shimabukuro *et al.*, 2009; Matsuo *et al.*, 2011). Possivelmente, o efeito estimulante na regeneração do tecido hepático ocorre via a ativação da via PI3K/AKT no fígado lesado (Murata *et al.*, 2007). Além disso, as plaquetas também fornecem enzimas para a remodelação da matriz extracelular, essenciais para a regeneração hepática (Martinez-Hernandez & Amenta, 1995; Ripoché, 2011).

Não encontramos nenhum estudo relacionado à terapia celular na insuficiência hepática que tenha avaliado o papel do PDGF-BB (Tabela 1). Em nossos resultados não foi observado efeito das plaquetas contidas nas cápsulas do grupo que recebeu a totalidade das células da medula óssea sobre os níveis de PDGF-BB (Tabela 14 e Figura 15). A falta do contato das plaquetas isoladas nas microcápsulas com o tecido lesado pode ter impedido a sua ativação e a liberação dos fatores de crescimento como o PDGF-BB. O contato direto entre as plaquetas e os hepatócitos parece ser essencial para desencadear a liberação dos fatores solúveis que são necessários para a regeneração do fígado (Matsuo *et al.*, 2008). Em todos os grupos, houve um leve aumento do PDGF-BB sérico nas primeiras 12 horas em relação aos valores basais (Tabela 14 e Figura 15). Às 48 horas os animais que receberam cápsulas vazias apresentaram valores de PDGF-BB menores que os tratados com células da medula óssea, particularmente em relação aos que receberam a fração mononuclear. A queda do PDGF-BB pode ser representativa da pior evolução entre os animais não tratados. Recentemente, foi demonstrado em seres humanos que níveis sanguíneos de PDGF-BB mais baixos estavam diretamente relacionados com pior desfecho na presença de insuficiência

hepática aguda. Segundo os autores, a diminuição do PDGF-BB e do VEGF poderia retardar a regeneração do fígado e resultar em aumento do risco de falência de múltiplos órgãos, de infecção e de óbito (Takayama *et al.*, 2011).

8. CONCLUSÕES

8. CONCLUSÕES

A análise dos resultados, à luz de nossos objetivos, nos permite concluir que:

1. A hepatectomia de 90% de ratos Wistar sob regime anestésico com isoflurano e suplementação de glicose oral e intraperitoneal se constitui em modelo cirúrgico de insuficiência hepática aguda com janela terapêutica adequada ao estudo da terapia celular;
2. A terapia com células da medula óssea, total e fração mononuclear, imobilizadas em microcápsulas de alginato de sódio e administrada no peritônio aumentou a sobrevivência de ratos Wistar em insuficiência hepática aguda por hepatectomia de 90%. Não houve diferenças entre o tipo de células da medula óssea utilizadas;
3. No mesmo modelo de insuficiência hepática aguda, a terapia com células HepG2, não modificou a mortalidade;
4. A terapia celular não modificou os níveis de glicose e de lactato sanguíneos nas primeiras horas após a hepatectomia de 90%;
5. A terapia com células da medula óssea, total e fração mononuclear reduziu o ganho de massa dos lobos remanescentes, mas não modificou a regeneração hepatocitária durante as primeiras 72 horas após hepatectomia de 90%;
6. A terapia com células da medula óssea, total e fração mononuclear não modificou os níveis séricos de IL-6, de TGF-beta e de PDGF-BB nas primeiras 72 horas após hepatectomia de 90%.

9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A presente tese é a compilação dos resultados de um projeto que representa a intersecção das linhas de pesquisa do Centro de Terapia Gênica e do Laboratório Experimental de Hepatologia e Gastroenterologia, ambos integrantes do Centro de Pesquisa Experimental do HCPA. É uma das resultantes do esforço físico e intelectual das duas equipes, e de outros colaboradores. Os dados aqui apresentados representam apenas parte das atividades desenvolvidas. Frente à complexidade do tema proposto, algumas perguntas foram respondidas, porém novas questões foram formuladas. Esperamos que, direta ou indiretamente, outros frutos venham a ser colhidos.

Inúmeras dificuldades foram enfrentadas durante o desenvolvimento do projeto de pesquisa. Algumas exigiram criatividade e outras, mudança de rota. Ao projeto original foram impostas limitações. Por outro lado, novas questões foram acrescentadas. Originalmente, o estudo do processo regenerativo hepático incluía a comparação da massa dos lobos remanescentes e dos achados histológicos, particularmente da mensuração da replicação dos hepatócitos. Infelizmente, as tentativas de avaliação das células em mitose com técnicas mais apuradas, como a incorporação do BrdU e da marcação do PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*) por imuno-histoquímica, foram frustradas, de forma que a análise histológica ficou limitada à contagem do hepatócitos por técnica microscópica direta em coloração HE. Questões relacionadas ao processo de importação limitaram a análise dos níveis sanguíneos das diversas citocinas e dos fatores de crescimento envolvidos no processo de regeneração e inflamação previstas no projeto original e poderão ser realizadas futuramente com as amostras congeladas. A avaliação da expressão gênica não foi apresentada nessa tese e será analisada separadamente.

A insuficiência hepática aguda, pano de fundo e motivador dessa tese, constitui por si um desafio. A perda súbita das funções do fígado nos revela a complexidade da incrível estratégia da natureza para a preservação da vida. Na busca do restabelecimento do equilíbrio, a impressionante capacidade adaptativa de todo organismo exige uma resposta rápida e orquestrada de eventos múltiplos, simultâneos e precisos. Qualquer falha nesse processo faz girar a Roda da Fortuna resultando em vida ou morte.

A ciência, dádiva de Prometeu aos seres humanos, como um poder quase divino, se recusa aceitar o fortuito e busca, através do saber, as chaves de mitos e enigmas. Nas últimas décadas detalhes da regeneração do fígado foram revelados e a ampliação da compreensão da fisiologia e da patologia hepática permitiu o aprimoramento assistencial e a redução da

mortalidade. Entretanto, a presença de paciente em insuficiência hepática aguda traz à lembrança os nossos limites e impõe a necessidade da busca incessante do conhecimento.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 2005; 105(4): 1815-22.
- Alison MR, Islam S, Lim S. Stem cells in liver regeneration, fibrosis and cancer: the good, the bad and the ugly. *J Pathol* 2009; 217(2): 282-98.
- Alison MR, Poulson R, Jeffery R, Dhillon AP, Quaglia A, Jacob J, *et al.* Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells. *Nature* 2000; 406(6793): 257.
- Alkozai EM, Nijsten MW, de Jong KP, de Boer MT, Peeters PM, Slooff MJ, *et al.* Immediate postoperative low platelet count is associated with delayed liver function recovery after partial liver resection. *Ann Surg* 2010; 251(2): 300-6.
- Aller MA, Lorente L, Prieto I, Moquillaza LM, Arias J. Hepatectomies in the rat: A look at the caudate process through microsurgery. *Dig Liver Dis* 2009; 41(10): 695-9.
- Almeida-Porada G, Zanjani ED, Porada CD. Bone marrow stem cells and liver regeneration. *Exp Hematol* 2010; 38(7): 574-80.
- am Esch JS, 2nd, Knoefel WT, Klein M, Ghodsizad A, Fuerst G, Poll LW, *et al.* Portal application of autologous CD133+ bone marrow cells to the liver: a novel concept to support hepatic regeneration. *Stem Cells* 2005; 23(4): 463-70.
- Antoniades CG, Berry PA, Davies ET, Hussain M, Bernal W, Vergani D, *et al.* Reduced monocyte HLA-DR expression: a novel biomarker of disease severity and outcome in acetaminophen-induced acute liver failure. *Hepatology* 2006; 44(1): 34-43.
- Antoniades CG, Berry PA, Wendon JA, Vergani D. The importance of immune dysfunction in determining outcome in acute liver failure. *J Hepatol* 2008; 49(5): 845-61.
- Aoki K, Hakamada K, Umehara Y, Seino K, Itabashi Y, Sasaki M. Intraperitoneal transplantation of microencapsulated xenogeneic hepatocytes in totally hepatectomized rats. *Transplant Proc* 2000; 32(5): 1118-20.
- Aoki T, Jin Z, Nishino N, Kato H, Shimizu Y, Niiya T, *et al.* Intrasplenic transplantation of encapsulated hepatocytes decreases mortality and improves liver functions in fulminant hepatic failure from 90% partial hepatectomy in rats. *Transplantation* 2005; 79(7): 783-90.
- Arakawa Y, Shimada M, Uchiyama H, Ikegami T, Yoshizumi T, Imura S, *et al.* Beneficial effects of splenectomy on massive hepatectomy model in rats. *Hepatol Res* 2009; 39(4): 391-7.

- Argast GM, Campbell JS, Brooling JT, Fausto N. Epidermal growth factor receptor transactivation mediates tumor necrosis factor-induced hepatocyte replication. *J Biol Chem* 2004; 279(33): 34530-6.
- Asadullah K, Sterry W, Volk HD. Interleukin-10 therapy--review of a new approach. *Pharmacol Rev* 2003; 55(2): 241-69.
- Aurich H, Sgodda M, Kaltwasser P, Vetter M, Weise A, Liehr T, *et al.* Hepatocyte differentiation of mesenchymal stem cells from human adipose tissue in vitro promotes hepatic integration in vivo. *Gut* 2009; 58(4): 570-81.
- Austin TW, Lagasse E. Hepatic regeneration from hematopoietic stem cells. *Mech Dev* 2003; 120(1): 131-5.
- Baccarani U, De Stasio G, Adani GL, Donini A, Sainz-Barriga M, Lorenzin D, *et al.* Implication of stem cell factor in human liver regeneration after transplantation and resection. *Growth Factors* 2006; 24(2): 107-10.
- Baldo G, Giugliani R, Uribe C, Belardinelli MC, Duarte ME, Meurer L, *et al.* Bone Marrow Mononuclear Cell Transplantation Improves Survival and Induces Hepatocyte Proliferation in Rats after CCl(4) Acute Liver Damage. *Dig Dis Sci* 2010; 55(12): 3384-92.
- Baldo G, Quoos Mayer F, Burin M, Carrillo-Farga J, Matte U, Giugliani R. Recombinant Encapsulated Cells Overexpressing Alpha-L-Iduronidase Correct Enzyme Deficiency in Human Mucopolysaccharidosis Type I Cells. *Cells Tissues Organs* 2012; 195(3): 323-29.
- Baliga P, Alvarez S, Lindblad A, Zeng L. Posttransplant survival in pediatric fulminant hepatic failure: the SPLIT experience. *Liver Transpl* 2004; 10(11): 1364-71.
- Barminko J, Kim JH, Otsuka S, Gray A, Schloss R, Grumet M, *et al.* Encapsulated mesenchymal stromal cells for in vivo transplantation. *Biotechnol Bioeng* 2011; 108(11): 2747-58.
- Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest* 2005; 115(2): 209-18.
- Belanger M, Butterworth RF. Acute liver failure: a critical appraisal of available animal models. *Metab Brain Dis* 2005; 20(4): 409-23.
- Belardinelli MC, Pereira F, Baldo G, Vicente Tavares AM, Kieling CO, da Silveira TR, *et al.* Adult derived mononuclear bone marrow cells improve survival in a model of acetaminophen-induced acute liver failure in rats. *Toxicology* 2008; 247(1): 1-5.
- Bemeur C, Qu H, Desjardins P, Butterworth RF. IL-1 or TNF receptor gene deletion delays onset of encephalopathy and attenuates brain edema in experimental acute liver failure. *Neurochem Int* 2010; 56(2): 213-5.

- Berry PA, Antoniadou CG, Hussain MJ, McPhail MJ, Bernal W, Vergani D, *et al.* Admission levels and early changes in serum interleukin-10 are predictive of poor outcome in acute liver failure and decompensated cirrhosis. *Liver Int* 2010; 30(5): 733-40.
- Bilir BM, Guinette D, Karrer F, Kumpe DA, Krysl J, Stephens J, *et al.* Hepatocyte transplantation in acute liver failure. *Liver Transpl* 2000; 6(1): 32-40.
- Block GJ, Ohkouchi S, Fung F, Frenkel J, Gregory C, Pochampally R, *et al.* Multipotent stromal cells are activated to reduce apoptosis in part by upregulation and secretion of stanniocalcin-1. *Stem Cells* 2009; 27(3): 670-81.
- Bovill JG. Inhalation anaesthesia: from diethyl ether to xenon. *Handb Exp Pharmacol* 2008; 182(2): 121-42.
- Brunson DB. Pharmacology of Inhalation Anesthetics. In: Brown MJ, Danneman PJ, Karas AZ. *Anesthesia and Analgesia in Laboratory Animals*. 2nd ed. London: Academic Press; 2008. p. 83-95.
- Campbell JS, Prichard L, Schaper F, Schmitz J, Stephenson-Famy A, Rosenfeld ME, *et al.* Expression of suppressors of cytokine signaling during liver regeneration. *J Clin Invest* 2001; 107(10): 1285-92.
- Campbell JS, Riehle KJ, Brooling JT, Bauer RL, Mitchell C, Fausto N. Proinflammatory cytokine production in liver regeneration is Myd88-dependent, but independent of Cd14, Tlr2, and Tlr4. *J Immunol* 2006; 176(4): 2522-8.
- Canbay A, Tacke F, Hadem J, Trautwein C, Gerken G, Manns MP. Acute liver failure: a life-threatening disease. *Dtsch Arztebl Int* 2011; 108(42): 714-20.
- Cantz T, Manns MP, Ott M. Stem cells in liver regeneration and therapy. *Cell Tissue Res* 2008; 331(1): 271-82.
- Caplan AI, Dennis JE. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem* 2006; 98(5): 1076-84.
- Caruana JA, Whalen DA, Jr., Anthony WP, Sunby CR, Ciechoski MP. Paradoxical effects of glucose feeding on liver regeneration and survival after partial hepatectomy. *Endocr Res* 1986; 12(2): 147-56.
- Chang TH, Hakamada K, Toyoki Y, Tsuchida S, Sasaki M. Expression of MRP2 and MRP3 during liver regeneration after 90% partial hepatectomy in rats. *Transplantation* 2004; 77(1): 22-7.
- Chastre A, Jiang W, Desjardins P, Butterworth RF. Ammonia and proinflammatory cytokines modify expression of genes coding for astrocytic proteins implicated in brain edema in acute liver failure. *Metab Brain Dis* 2010; 25(1): 17-21.

- Cho KA, Ju SY, Cho SJ, Jung YJ, Woo SY, Seoh JY, *et al.* Mesenchymal stem cells showed the highest potential for the regeneration of injured liver tissue compared with other subpopulations of the bone marrow. *Cell Biol Int* 2009; 33(7): 772-7.
- Cochran JB, Losek JD. Acute liver failure in children. *Pediatr Emerg Care* 2007; 23(2): 129-35.
- Currier AR, Sabla G, Locaputo S, Melin-Aldana H, Degen JL, Bezerra JA. Plasminogen directs the pleiotropic effects of uPA in liver injury and repair. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003; 284(3): G508-15.
- Dahlke MH, Popp FC, Bahlmann FH, Aselmann H, Jager MD, Neipp M, *et al.* Liver regeneration in a retrorsine/CCl4-induced acute liver failure model: do bone marrow-derived cells contribute? *J Hepatol* 2003; 39(3): 365-73.
- Dalakas E, Newsome PN, Boyle S, Brown R, Pryde A, McCall S, *et al.* Bone Marrow Stem Cells Contribute to Alcohol Liver Fibrosis in Humans. *Stem Cells Dev* 2010; 19(9): 1417-25.
- Dalakas E, Newsome PN, Harrison DJ, Plevris JN. Hematopoietic stem cell trafficking in liver injury. *Faseb J* 2005; 19(10): 1225-31.
- Daveau M, Benard M, Scotte M, Schouft MT, Hiron M, Francois A, *et al.* Expression of a functional C5a receptor in regenerating hepatocytes and its involvement in a proliferative signaling pathway in rat. *J Immunol* 2004; 173(5): 3418-24.
- De Silvestro G, Vicarioto M, Donadel C, Menegazzo M, Marson P, Corsini A. Mobilization of peripheral blood hematopoietic stem cells following liver resection surgery. *Hepatology* 2004; 51(57): 805-10.
- Demetriou AA, Reisner A, Sanchez J, Levenson SM, Moscioni AD, Chowdhury JR. Transplantation of microcarrier-attached hepatocytes into 90% partially hepatectomized rats. *Hepatology* 1988; 8(5): 1006-9.
- Deng M, Huang H, Jin H, Dirsch O, Dahmen U. The anti-proliferative side effects of AEE788, a tyrosine kinase inhibitor blocking both EGF- and VEGF-receptor, are liver-size-dependent after partial hepatectomy in rats. *Invest New Drugs* 2011; 29(4): 593-606.
- Dhawan A, Mitry RR, Hughes RD. Hepatocyte transplantation for metabolic disorders, experience at King's College hospital and review of literature. *Acta Gastroenterol Belg* 2005; 68(4): 457-60.
- Di Campli C, Piscaglia AC, Giuliante F, Rutella S, Bonanno G, Zocco MA, *et al.* No evidence of hematopoietic stem cell mobilization in patients submitted to hepatectomy or in patients with acute on chronic liver failure. *Transplant Proc* 2005; 37(6): 2563-6.

- Drucker C, Gewiese J, Malchow S, Scheller J, Rose-John S. Impact of interleukin-6 classic- and trans-signaling on liver damage and regeneration. *J Autoimmun* 2010; 34(1): 29-37.
- Duncan AW, Dorrell C, Grompe M. Stem cells and liver regeneration. *Gastroenterology* 2009; 137(2): 466-81.
- Eguchi S, Kamlot A, Ljubimova J, Hewitt WR, Lebow LT, Demetriou AA, *et al.* Fulminant hepatic failure in rats: survival and effect on blood chemistry and liver regeneration. *Hepatology* 1996; 24(6): 1452-9.
- Eguchi S, Lilja H, Hewitt WR, Middleton Y, Demetriou AA, Rozga J. Loss and recovery of liver regeneration in rats with fulminant hepatic failure. *J Surg Res* 1997; 72(2): 112-22.
- Ellor S, Shupe T, Petersen B. Stem cell therapy for inherited metabolic disorders of the liver. *Exp Hematol* 2008; 36(6): 716-25.
- Emond J, Capron-Laudereau M, Meriggi F, Bernuau J, Reynes M, Houssin D. Extent of hepatectomy in the rat. Evaluation of basal conditions and effect of therapy. *Eur Surg Res* 1989; 21(5): 251-9.
- Endo D, Kogure K, Hasegawa Y, Maku-uchi M, Kojima I. Activin A augments vascular endothelial growth factor activity in promoting branching tubulogenesis in hepatic sinusoidal endothelial cells. *J Hepatol* 2004; 40(3): 399-404.
- Endo D, Maku-Uchi M, Kojima I. Activin or follistatin: which is more beneficial to support liver regeneration after massive hepatectomy? *Endocr J* 2006; 53(1): 73-8.
- Enns GM, Millan MT. Cell-based therapies for metabolic liver disease. *Mol Genet Metab* 2008; 95(1-2): 3-10.
- Farmer DG, Venick RS, McDiarmid SV, Duffy JP, Kattan O, Hong JC, *et al.* Fulminant hepatic failure in children: superior and durable outcomes with liver transplantation over 25 years at a single center. *Ann Surg* 2009; 250(3): 484-93.
- Farrell GC. Probing Prometheus: fat fueling the fire? *Hepatology* 2004; 40(6): 1252-5.
- Fausto N. Liver regeneration: from laboratory to clinic. *Liver Transpl* 2001; 7(10): 835-44.
- Fausto N. Liver regeneration and repair: hepatocytes, progenitor cells, and stem cells. *Hepatology* 2004; 39(6): 1477-87.
- Fausto N, Campbell JS. The role of hepatocytes and oval cells in liver regeneration and repopulation. *Mech Dev* 2003; 120(1): 117-30.
- Fausto N, Campbell JS, Riehle KJ. Liver regeneration. *Hepatology* 2006; 43(2 Suppl 1): S45-53.
- Fausto N, Riehle KJ. Mechanisms of liver regeneration and their clinical implications. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2005; 12(3): 181-9.

- Ferreira CT, Vieira SM, Kieling CO, Silveira TR. Hepatitis A acute liver failure: follow-up of paediatric patients in southern Brazil. *J Viral Hepat* 2008; 15 Suppl 2: 66-8.
- Ferri D, Moro L, Mastrodonato M, Capuano F, Marra E, Liquori GE, *et al.* Ultrastructural zonal heterogeneity of hepatocytes and mitochondria within the hepatic acinus during liver regeneration after partial hepatectomy. *Biol Cell* 2005; 97(4): 277-88.
- Filippini F, Mosca F. Animal models of fulminant hepatic failure: need to test liver support devices. *Dig Liver Dis* 2001; 33(7): 607-13.
- Fitzpatrick E, Mitry RR, Dhawan A. Human hepatocyte transplantation: state of the art. *J Intern Med* 2009; 266(4): 339-57.
- Fujii H, Hirose T, Oe S, Yasuchika K, Azuma H, Fujikawa T, *et al.* Contribution of bone marrow cells to liver regeneration after partial hepatectomy in mice. *J Hepatol* 2002; 36(5): 653-9.
- Fukuchi T, Hirose H, Onitsuka A, Hayashi M, Senga S, Imai N, *et al.* Effects of portal-systemic shunt following 90% partial hepatectomy in rats. *J Surg Res* 2000; 89(2): 126-31.
- Gaertner DJ, Hallman TM, Hankenson FC, Batchelder MA. Anesthesia and Analgesia for Laboratory Rodents. In: Fish RE, Brown MJ, Danneman PJ, Karas AZ. *Anesthesia and Analgesia in Laboratory Animals*. 2nd ed. London: Academic Press; 2008. p. 239-97.
- Gaia S, Smedile A, Omede P, Olivero A, Sanavio F, Balzola F, *et al.* Feasibility and safety of G-CSF administration to induce bone marrow-derived cells mobilization in patients with end stage liver disease. *J Hepatol* 2006; 45(1): 13-9.
- Gasbarrini A, Rapaccini GL, Rutella S, Zocco MA, Tittoto P, Leone G, *et al.* Rescue therapy by portal infusion of autologous stem cells in a case of drug-induced hepatitis. *Dig Liver Dis* 2007; 39(9): 878-82.
- Gaub J, Iversen J. Rat liver regeneration after 90% partial hepatectomy. *Hepatology* 1984; 4(5): 902-4.
- Gehling UM, Willems M, Dandri M, Petersen J, Berna M, Thill M, *et al.* Partial hepatectomy induces mobilization of a unique population of haematopoietic progenitor cells in human healthy liver donors. *J Hepatol* 2005; 43(5): 845-53.
- Gilchrist ES, Plevris JN. Bone marrow-derived stem cells in liver repair: 10 years down the line. *Liver Transpl* 2010; 16(2): 118-29.
- Giuliani M, Fleury M, Vernochet A, Ketrroussi F, Clay D, Azzarone B, *et al.* Long-lasting inhibitory effects of fetal liver mesenchymal stem cells on T-lymphocyte proliferation. *PLoS One* 2011; 6(5): e19988.

- Gordon MY, Levicar N, Pai M, Bachellier P, Dimarakis I, Al-Allaf F, *et al.* Characterization and clinical application of human CD34+ stem/progenitor cell populations mobilized into the blood by granulocyte colony-stimulating factor. *Stem Cells* 2006; 24(7): 1822-30.
- Grad-Itach E, Fuchs AG, Lev H, Kotok T, Shemesh R, Shouval D, *et al.* Liver micro-organs transcribe albumin and clotting factors and increase survival of 92% hepatectomized rats. *J Hepatol* 2003; 39(4): 552-8.
- Greenbaum LE, Cressman DE, Haber BA, Taub R. Coexistence of C/EBP alpha, beta, growth-induced proteins and DNA synthesis in hepatocytes during liver regeneration. Implications for maintenance of the differentiated state during liver growth. *J Clin Invest* 1995; 96(3): 1351-65.
- Habibullah CM, Syed IH, Qamar A, Taher-Uz Z. Human fetal hepatocyte transplantation in patients with fulminant hepatic failure. *Transplantation* 1994; 58(8): 951-2.
- Hamazaki K, Doi Y, Koide N. Microencapsulated multicellular spheroid of rat hepatocytes transplanted intraperitoneally after 90% hepatectomy. *Hepatogastroenterology* 2002; 49(48): 1514-6.
- Hasegawa S, Kubota T, Fukuyama N, Kurosawa H, Sekido H, Togo S, *et al.* Apoptosis of hepatocytes is a main cause of inducing lethal hepatic failure after excessive hepatectomy in rats. *Transplant Proc* 1999; 31(1-2): 558-9.
- Hatch HM, Zheng D, Jorgensen ML, Petersen BE. SDF-1alpha/CXCR4: a mechanism for hepatic oval cell activation and bone marrow stem cell recruitment to the injured liver of rats. *Cloning Stem Cells* 2002; 4(4): 339-51.
- Hayashi H, Shimizu K, Tani T, Takamura H, Takeshita M, Nakamura K, *et al.* Effect of porto-systemic shunting on NOS expression after extended hepatectomy in rats. *Hepatol Res* 2009; 39(1): 78-85.
- He S, Atkinson C, Qiao F, Chen X, Tomlinson S. Ketamine-xylazine-acepromazine compared with isoflurane for anesthesia during liver transplantation in rodents. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 2010; 49(1): 45-51.
- He Y, Zhou J, Dou KF, Chen Y. A rat model for acute hepatic failure. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2003; 2(3): 423-5.
- Herencia C, Rodriguez-Ariza A, Canalejo A, Naranjo A, Briceno FJ, Lopez-Cillero P, *et al.* Differential Bone Marrow Hematopoietic Stem Cells Mobilization in Hepatectomized Patients. *J Gastrointest Surg* 2011; 15(8): 1459-67.
- Hernandez RM, Orive G, Murua A, Pedraz JL. Microcapsules and microcarriers for in situ cell delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2010; 62(7-8): 711-30.

- Horslen SP, Fox IJ. Hepatocyte transplantation. *Transplantation* 2004; 77(10): 1481-6.
- Houlihan DD, Newsome PN. Critical review of clinical trials of bone marrow stem cells in liver disease. *Gastroenterology* 2008; 135(2): 438-50.
- Hsu WH, Bellin SI, Dellmann HD, Hanson CE. Xylazine-ketamine-induced anesthesia in rats and its antagonism by yohimbine. *J Am Vet Med Assoc* 1986; 189(9): 1040-3.
- Hu HM, Baer M, Williams SC, Johnson PF, Schwartz RC. Redundancy of C/EBP alpha, -beta, and -delta in supporting the lipopolysaccharide-induced transcription of IL-6 and monocyte chemoattractant protein-1. *J Immunol* 1998; 160(5): 2334-42.
- Ikedo H, Nagoshi S, Ohno A, Yanase M, Maekawa H, Fujiwara K. Activated rat stellate cells express c-met and respond to hepatocyte growth factor to enhance transforming growth factor beta1 expression and DNA synthesis. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 250(3): 769-75.
- Ikegami T, Taketomi A, Soejima Y, Yoshizumi T, Sanefuji K, Kayashima H, *et al.* Living donor liver transplantation for acute liver failure: a 10-year experience in a single center. *J Am Coll Surg* 2008; 206(3): 412-8.
- Ismail A, Fouad O, Abdelnasser A, Chowdhury A, Selim A. Stem cell therapy improves the outcome of liver resection in cirrhotics. *J Gastrointest Cancer* 2010; 41(1): 17-23.
- Ito K, Ozasa H, Horikawa S. Effects of prior splenectomy on remnant liver after partial hepatectomy with Pringle maneuver in rats. *Liver Int* 2005; 25(2): 438-44.
- Jakowlew SB, Mead JE, Danielpour D, Wu J, Roberts AB, Fausto N. Transforming growth factor-beta (TGF-beta) isoforms in rat liver regeneration: messenger RNA expression and activation of latent TGF-beta. *Cell Regul* 1991; 2(7): 535-48.
- Jalan R, Pollok A, Shah SH, Madhavan K, Simpson KJ. Liver derived pro-inflammatory cytokines may be important in producing intracranial hypertension in acute liver failure. *J Hepatol* 2002; 37(4): 536-8.
- Jang YY, Collector MI, Baylin SB, Diehl AM, Sharkis SJ. Hematopoietic stem cells convert into liver cells within days without fusion. *Nat Cell Biol* 2004; 6(6): 532-9.
- Jensen SA. Liver gene regulation in rats following both 70 or 90% hepatectomy and endotoxin treatment. *J Gastroenterol Hepatol* 2001; 16(5): 525-30.
- Jin SZ, Meng XW, Han MZ, Sun X, Sun LY, Liu BR. Stromal cell derived factor-1 enhances bone marrow mononuclear cell migration in mice with acute liver failure. *World J Gastroenterol* 2009; 15(21): 2657-64.

- Jin SZ, Meng XW, Sun X, Han MZ, Liu BR, Wang XH, *et al.* Hepatocyte growth factor promotes liver regeneration induced by transfusion of bone marrow mononuclear cells in a murine acute liver failure model. *J Hepatobiliary Pancreat Sci* 2011; 18(3): 397-405.
- Jin SZ, Meng XW, Sun X, Han MZ, Liu BR, Wang XH, *et al.* Granulocyte colony-stimulating factor enhances bone marrow mononuclear cell homing to the liver in a mouse model of acute hepatic injury. *Dig Dis Sci* 2010; 55(10): 2805-13.
- Jung YJ, Ryu KH, Cho SJ, Woo SY, Seoh JY, Chun CH, *et al.* Syngenic bone marrow cells restore hepatic function in carbon tetrachloride-induced mouse liver injury. *Stem Cells Dev* 2006; 15(5): 687-95.
- Kamimukai N, Togo S, Hasegawa S, Kubota T, Kurosawa H, Li XK, *et al.* Expression of Bcl-2 family reduces apoptotic hepatocytes after excessive hepatectomy. *Eur Surg Res* 2001; 33(1): 8-15.
- Kamohara Y, Sugiyama N, Mizuguchi T, Inderbitzin D, Lilja H, Middleton Y, *et al.* Inhibition of signal transducer and activator transcription factor 3 in rats with acute hepatic failure. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 273(1): 129-35.
- Kanazawa Y, Verma IM. Little evidence of bone marrow-derived hepatocytes in the replacement of injured liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100 Suppl 1: 11850-3.
- Karp SJ. Clinical implications of advances in the basic science of liver repair and regeneration. *Am J Transplant* 2009; 9(9): 1973-80.
- Kato K, Onodera K, Kato J, Kasai S, Mito M. The immuno-stimulant OK-432 enhances liver regeneration after 70% hepatectomy. *J Hepatol* 1995; 23(1): 87-94.
- Kawai N, Keep RF, Betz AL. Hyperglycemia and the vascular effects of cerebral ischemia. *Stroke* 1997; 28(1): 149-54.
- Kelly DA. Managing liver failure. *Postgrad Med J* 2002; 78(925): 660-7.
- Khan AA, Parveen N, Mahaboob VS, Rajendraprasad A, Ravindrakrishna HR, Venkateswarlu J, *et al.* Treatment of Crigler-Najjar Syndrome type 1 by hepatic progenitor cell transplantation: a simple procedure for management of hyperbilirubinemia. *Transplant Proc* 2008; 40(4): 1148-50.
- Khan AA, Parveen N, Mahaboob VS, Rajendraprasad A, Ravindrakrishna HR, Venkateswarlu J, *et al.* Safety and efficacy of autologous bone marrow stem cell transplantation through hepatic artery for the treatment of chronic liver failure: a preliminary study. *Transplant Proc* 2008; 40(4): 1140-4.
- Kieling CO. Insuficiência hepática aguda. In: Silva LR, Carvalho E, Ferreira CT. *Hepatologia em pediatria*. 1st ed. Carueri - SP: Editora Manole; 2012. p. 479-508.

- Kisseleva T, Gigante E, Brenner DA. Recent advances in liver stem cell therapy. *Curr Opin Gastroenterol* 2010; 26(4): 395-402.
- Kobayashi N, Fujiwara T, Westerman KA, Inoue Y, Sakaguchi M, Noguchi H, *et al.* Prevention of acute liver failure in rats with reversibly immortalized human hepatocytes. *Science* 2000; 287(5456): 1258-62.
- Kobayashi N, Miyazaki M, Fukaya K, Noguchi H, Tanaka N, Namba M. Intrasplenic transplantation of immortalized human fetal hepatocytes prolongs the survival of 90% hepatectomized rats. *Transplant Proc* 2000; 32(7): 2365-7.
- Kollet O, Shivtiel S, Chen YQ, Suriawinata J, Thung SN, Dabeva MD, *et al.* HGF, SDF-1, and MMP-9 are involved in stress-induced human CD34+ stem cell recruitment to the liver. *J Clin Invest* 2003; 112(2): 160-9.
- Kono H, Fujii H, Hirai Y, Tsuchiya M, Amemiya H, Asakawa M, *et al.* The Kupffer cell protects against acute lung injury in a rat peritonitis model: role of IL-10. *J Leukoc Biol* 2006; 79(4): 809-17.
- Korbling M, Katz RL, Khanna A, Ruifrok AC, Rondon G, Albitar M, *et al.* Hepatocytes and epithelial cells of donor origin in recipients of peripheral-blood stem cells. *N Engl J Med* 2002; 346(10): 738-46.
- Kubota T, Takabe K, Yang M, Sekido H, Endo I, Ichikawa Y. Minimum sizes for remnant and transplanted livers in rats. *J Hep Bil Pancr Surg* 1997; 4(4): 398-404.
- Kuo TK, Hung SP, Chuang CH, Chen CT, Shih YR, Fang SC, *et al.* Stem cell therapy for liver disease: parameters governing the success of using bone marrow mesenchymal stem cells. *Gastroenterology* 2008; 134(7): 2111-21, 2121 e1-3.
- Kurozumi K, Nakamura K, Tamiya T, Kawano Y, Ishii K, Kobune M, *et al.* Mesenchymal stem cells that produce neurotrophic factors reduce ischemic damage in the rat middle cerebral artery occlusion model. *Mol Ther* 2005; 11(1): 96-104.
- Kwon HJ, Won YS, Yoon YD, Yoon WK, Nam KH, Choi IP, *et al.* Vitamin D3 up-regulated protein 1 deficiency accelerates liver regeneration after partial hepatectomy in mice. *J Hepatol* 2011; 54(6): 1168-76.
- Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, Osborne L, *et al.* Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med* 2000; 6(11): 1229-34.
- Lagranha VL, Baldo G, de Carvalho TG, Burin M, Saraiva-Pereira ML, Matte U, *et al.* In vitro correction of ARSA deficiency in human skin fibroblasts from metachromatic

- leukodystrophy patients after treatment with microencapsulated recombinant cells. *Metab Brain Dis* 2008; 23(4): 469-84.
- Lee WM. Liver failure and liver support. *Semin Liver Dis* 2008; 28(2): 135-6.
- Lee WM, Squires RH, Jr., Nyberg SL, Doo E, Hoofnagle JH. Acute liver failure: Summary of a workshop. *Hepatology* 2008; 47(4): 1401-15.
- Lee WS, McKiernan P, Kelly DA. Etiology, outcome and prognostic indicators of childhood fulminant hepatic failure in the United kingdom. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2005; 40(5): 575-81.
- Leelaudomlipi S, Sugawara Y, Kaneko J, Matsui Y, Ohkubo T, Makuuchi M. Volumetric analysis of liver segments in 155 living donors. *Liver Transpl* 2002; 8(7): 612-4.
- Leist M, Gantner F, Bohlinger I, Tiegs G, Germann PG, Wendel A. Tumor necrosis factor-induced hepatocyte apoptosis precedes liver failure in experimental murine shock models. *Am J Pathol* 1995; 146(5): 1220-34.
- Lemoli RM, Catani L, Talarico S, Loggi E, Gramenzi A, Baccarani U, *et al.* Mobilization of bone marrow-derived hematopoietic and endothelial stem cells after orthotopic liver transplantation and liver resection. *Stem Cells* 2006; 24(12): 2817-25.
- Lesurtel M, Graf R, Aleil B, Walther DJ, Tian Y, Jochum W, *et al.* Platelet-derived serotonin mediates liver regeneration. *Science* 2006; 312(5770): 104-7.
- Leu JI, Crissey MA, Leu JP, Ciliberto G, Taub R. Interleukin-6-induced STAT3 and AP-1 amplify hepatocyte nuclear factor 1-mediated transactivation of hepatic genes, an adaptive response to liver injury. *Mol Cell Biol* 2001; 21(2): 414-24.
- Levicar N, Pai M, Habib NA, Tait P, Jiao LR, Marley SB, *et al.* Long-term clinical results of autologous infusion of mobilized adult bone marrow derived CD34+ cells in patients with chronic liver disease. *Cell Prolif* 2008; 41 Suppl 1: 115-25.
- Li W, Liang X, Leu JI, Kovalovich K, Ciliberto G, Taub R. Global changes in interleukin-6-dependent gene expression patterns in mouse livers after partial hepatectomy. *Hepatology* 2001; 33(6): 1377-86.
- Lin H, Xu R, Zhang Z, Chen L, Shi M, Wang FS. Implications of the immunoregulatory functions of mesenchymal stem cells in the treatment of human liver diseases. *Cell Mol Immunol* 2011; 8(1): 19-22.
- Lin N, Lin J, Bo L, Weidong P, Chen S, Xu R. Differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells into hepatocyte-like cells in an alginate scaffold. *Cell Prolif* 2010; 43(5): 427-34.

- Liu F, Pan X, Chen G, Jiang D, Cong X, Fei R, *et al.* Hematopoietic stem cells mobilized by granulocyte colony-stimulating factor partly contribute to liver graft regeneration after partial orthotopic liver transplantation. *Liver Transpl* 2006; 12(7): 1129-37.
- Liu Q. Role of cytokines in the pathophysiology of acute-on-chronic liver failure. *Blood Purif* 2009; 28(4): 331-41.
- Liu ZC, Chang TM. Transplantation of bioencapsulated bone marrow stem cells improves hepatic regeneration and survival of 90% hepatectomized rats: a preliminary report. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 2005; 33(4): 405-10.
- Liu ZC, Chang TM. Transdifferentiation of bioencapsulated bone marrow cells into hepatocyte-like cells in the 90% hepatectomized rat model. *Liver Transpl* 2006; 12(4): 566-72.
- Liu ZC, Chang TM. Preliminary study on intrasplenic implantation of artificial cell bioencapsulated stem cells to increase the survival of 90% hepatectomized rats. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 2009; 37(1): 53-5.
- Lo CM, Liu CL, Fan ST. Portal hyperperfusion injury as the cause of primary nonfunction in a small-for-size liver graft-successful treatment with splenic artery ligation. *Liver Transpl* 2003; 9(6): 626-8.
- Louis H, Le Moine O, Peny MO, Gulbis B, Nisol F, Goldman M, *et al.* Hepatoprotective role of interleukin 10 in galactosamine/lipopolysaccharide mouse liver injury. *Gastroenterology* 1997; 112(3): 935-42.
- Lyra AC, Soares MB, da Silva LF, Braga EL, Oliveira SA, Fortes MF, *et al.* Infusion of autologous bone marrow mononuclear cells through hepatic artery results in a short-term improvement of liver function in patients with chronic liver disease: a pilot randomized controlled study. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2010; 22(1): 33-42.
- Lyra AC, Soares MB, da Silva LF, Fortes MF, Silva AG, Mota AC, *et al.* Feasibility and safety of autologous bone marrow mononuclear cell transplantation in patients with advanced chronic liver disease. *World J Gastroenterol* 2007; 13(7): 1067-73.
- Lysy PA, Campard D, Smets F, Najimi M, Sokal EM. Stem cells for liver tissue repair: current knowledge and perspectives. *World J Gastroenterol* 2008; 14(6): 864-75.
- Madrahimov N, Dirsch O, Broelsch C, Dahmen U. Marginal hepatectomy in the rat: from anatomy to surgery. *Ann Surg* 2006; 244(1): 89-98.
- Mahadeb P, Gras J, Sokal E, Otte JB, Lerut J, Detaille T, *et al.* Liver transplantation in children with fulminant hepatic failure: The UCL experience. *Pediatr Transplant* 2009; 13(4): 414-20.

- Mai G, Nguyen TH, Morel P, Mei J, Andres A, Bosco D, *et al.* Treatment of fulminant liver failure by transplantation of microencapsulated primary or immortalized xenogeneic hepatocytes. *Xenotransplantation* 2005; 12(6): 457-64.
- Makino H, Togo S, Kubota T, Morioka D, Morita T, Kobayashi T, *et al.* A good model of hepatic failure after excessive hepatectomy in mice. *J Surg Res* 2005; 127(2): 171-6.
- Makowka L, Falk RE, Rotstein LE, Falk JA, Nossal N, Langer B, *et al.* Cellular transplantation in the treatment of experimental hepatic failure. *Science* 1980; 210(4472): 901-3.
- Mallet VO, Mitchell C, Mezey E, Fabre M, Guidotti JE, Renia L, *et al.* Bone marrow transplantation in mice leads to a minor population of hepatocytes that can be selectively amplified in vivo. *Hepatology* 2002; 35(4): 799-804.
- Mao WL, Chen Y, Chen YM, Li LJ. Changes of Serum Cytokine Levels in Patients With Acute on Chronic Liver Failure Treated by Plasma Exchange. *J Clin Gastroenterol* 2011; 45(6): 551-5.
- Maria-Engler SS, Mares-Guia M, Correa ML, Oliveira EM, Aita CA, Krogh K, *et al.* Microencapsulation and tissue engineering as an alternative treatment of diabetes. *Braz J Med Biol Res* 2001; 34(6): 691-7.
- Martinez-Hernandez A, Amenta PS. The extracellular matrix in hepatic regeneration. *Faseb J* 1995; 9(14): 1401-10.
- Martins PN, Neuhaus P. Surgical anatomy of the liver, hepatic vasculature and bile ducts in the rat. *Liver Int* 2007; 27(3): 384-92.
- Martins PN, Theruvath TP, Neuhaus P. Rodent models of partial hepatectomies. *Liver Int* 2008; 28(1): 3-11.
- Masson S, Harrison DJ, Plevris JN, Newsome PN. Potential of hematopoietic stem cell therapy in hepatology: a critical review. *Stem Cells* 2004; 22(6): 897-907.
- Matsuo R, Nakano Y, Ohkohchi N. Platelet administration via the portal vein promotes liver regeneration in rats after 70% hepatectomy. *Ann Surg* 2011; 253(4): 759-63.
- Matsuo R, Ohkohchi N, Murata S, Ikeda O, Nakano Y, Watanabe M, *et al.* Platelets Strongly Induce Hepatocyte Proliferation with IGF-1 and HGF In Vitro. *J Surg Res* 2008; 145(2): 279-86.
- Matte U, Lagranha VL, de Carvalho TG, Mayer FQ, Giugliani R. Cell microencapsulation: a potential tool for the treatment of neuronopathic lysosomal storage diseases. *J Inherit Metab Dis* 2011; 34(5): 983-90.

- Mayer FQ, Baldo G, de Carvalho TG, Lagranha VL, Giugliani R, Matte U. Effects of cryopreservation and hypothermic storage on cell viability and enzyme activity in recombinant encapsulated cells overexpressing alpha-L-iduronidase. *Artif Organs* 2010; 34(5): 434-9.
- Mead JE, Fausto N. Transforming growth factor alpha may be a physiological regulator of liver regeneration by means of an autocrine mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86(5): 1558-62.
- Meirelles Lda S, Fontes AM, Covas DT, Caplan AI. Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. *Cytokine Growth Factor Rev* 2009; 20(5-6): 419-27.
- Menegazzo M, Bagatella P, Marson P, Donadel C, De Silvestro G, Corsini A. Reduced mobilisation of hematopoietic stem cells after hepatic resection for malignant liver disease. *Pathol Oncol Res* 2008; 14(4): 381-5.
- Meyburg J, Hoerster F, Weitz J, Hoffmann GF, Schmidt J. Use of the middle colic vein for liver cell transplantation in infants and small children. *Transplant Proc* 2008; 40(4): 936-7.
- Meyer RE, Fish RE. Pharmacology of Injectable Anesthetics, Sedatives, and Tranquilizers. In: Fish RE, Brown MJ, Danneman PJ, Karas AZ. *Anesthesia and Analgesia in Laboratory Animals*. 2nd ed. London: Academic Press; 2008. p. 27-82.
- Mianji S, Hamasaki Y, Yamamoto S, Miyazaki S. Inhibition by dexamethasone of the lipopolysaccharide-induced increase in IL-6 mRNA abundance and IL-6 production in human polymorphonuclear leukocytes. *Int J Immunopharmacol* 1996; 18(5): 339-46.
- Michalopoulos G, Cianciulli HD, Novotny AR, Kligerman AD, Strom SC, Jirtle RL. Liver regeneration studies with rat hepatocytes in primary culture. *Cancer Res* 1982; 42(11): 4673-82.
- Michalopoulos GK. Liver regeneration. *J Cell Physiol* 2007; 213(2): 286-300.
- Michalopoulos GK. Liver regeneration after partial hepatectomy: critical analysis of mechanistic dilemmas. *Am J Pathol* 2010; 176(1): 2-13.
- Michalopoulos GK, Bowen WC, Mule K, Stolz DB. Histological organization in hepatocyte organoid cultures. *Am J Pathol* 2001; 159(5): 1877-87.
- Michalopoulos GK, DeFrances MC. Liver regeneration. *Science* 1997; 276(5309): 60-6.
- Miloh T, Kerkar N, Parkar S, Emre S, Annunziato R, Mendez C, *et al*. Improved outcomes in pediatric liver transplantation for acute liver failure. *Pediatr Transplant* 2010; 14(7): 863-9.

- Mimuro A, Aoki T, Tsuchida A, Miyashita T, Koyanagi Y, Enosawa S. Effect of ethanalamine on liver regeneration after 90% hepatectomy in rats. *Transplant Proc* 2002; 34(7): 2664-7.
- Mitchell C, Nivison M, Jackson LF, Fox R, Lee DC, Campbell JS, *et al.* Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor links hepatocyte priming with cell cycle progression during liver regeneration. *J Biol Chem* 2005; 280(4): 2562-8.
- Mito M, Kusano M, Kawaura Y. Hepatocyte transplantation in man. *Transplant Proc* 1992; 24(6): 3052-3.
- Mitry RR, Dhawan A, Hughes RD, Bansal S, Lehec S, Terry C, *et al.* One liver, three recipients: segment IV from split-liver procedures as a source of hepatocytes for cell transplantation. *Transplantation* 2004; 77(10): 1614-6.
- Miura T, Kimura N, Yamada T, Shimizu T, Nanashima N, Yamana D, *et al.* Sustained repression and translocation of Ntcp and expression of Mrp4 for cholestasis after rat 90% partial hepatectomy. *J Hepatol* 2011; 55(2): 407-14.
- Mohamadnejad M, Alimoghaddam K, Mohyeddin-Bonab M, Bagheri M, Bashtar M, Ghanaati H, *et al.* Phase 1 trial of autologous bone marrow mesenchymal stem cell transplantation in patients with decompensated liver cirrhosis. *Arch Iran Med* 2007; 10(4): 459-66.
- Mohamadnejad M, Namiri M, Bagheri M, Hashemi SM, Ghanaati H, Zare Mehrjardi N, *et al.* Phase 1 human trial of autologous bone marrow-hematopoietic stem cell transplantation in patients with decompensated cirrhosis. *World J Gastroenterol* 2007; 13(24): 3359-63.
- Morioka D, Watanabe K, Makino H, Saito S, Ueda M, Kubota T, *et al.* Safety limit of the extent of hepatectomy for rats with moderately fatty liver: experimental study concerning living liver donor safety. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 21(2): 367-73.
- Morita T, Togo S, Kubota T, Kamimukai N, Nishizuka I, Kobayashi T, *et al.* Mechanism of postoperative liver failure after excessive hepatectomy investigated using a cDNA microarray. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2002; 9(3): 352-9.
- Muraca M. Evolving concepts in cell therapy of liver disease and current clinical perspectives. *Dig Liver Dis* 2011; 43(3): 180-7.
- Murata S, Ohkohchi N, Matsuo R, Ikeda O, Myronovych A, Hoshi R. Platelets promote liver regeneration in early period after hepatectomy in mice. *World J Surg* 2007; 31(4): 808-16.
- Murray AB, Strecker W, Silz S. Ultrastructural changes in rat hepatocytes after partial hepatectomy, and comparison with biochemical results. *J Cell Sci* 1981; 50: 433-48.

- Murua A, Portero A, Orive G, Hernandez RM, de Castro M, Pedraz JL. Cell microencapsulation technology: towards clinical application. *J Control Release* 2008; 132(2): 76-83.
- Myronovych A, Murata S, Chiba M, Matsuo R, Ikeda O, Watanabe M, *et al.* Role of platelets on liver regeneration after 90% hepatectomy in mice. *J Hepatol* 2008; 49(3): 363-72.
- Nagaki M, Iwai H, Naiki T, Ohnishi H, Muto Y, Moriwaki H. High levels of serum interleukin-10 and tumor necrosis factor-alpha are associated with fatality in fulminant hepatitis. *J Infect Dis* 2000; 182(4): 1103-8.
- Nagaki M, Tanaka M, Sugiyama A, Ohnishi H, Moriwaki H. Interleukin-10 inhibits hepatic injury and tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma mRNA expression induced by staphylococcal enterotoxin B or lipopolysaccharide in galactosamine-sensitized mice. *J Hepatol* 1999; 31(5): 815-24.
- Nakamura J, Okamoto T, Schumacher IK, Tabei I, Chowdhury NR, Chowdhury JR, *et al.* Treatment of surgically induced acute liver failure by transplantation of conditionally immortalized hepatocytes. *Transplantation* 1997; 63(11): 1541-7.
- Nelsen CJ, Rickheim DG, Tucker MM, Hansen LK, Albrecht JH. Evidence that cyclin D1 mediates both growth and proliferation downstream of TOR in hepatocytes. *J Biol Chem* 2003; 278(6): 3656-63.
- Newberry EP, Kennedy SM, Xie Y, Luo J, Stanley SE, Semenkovich CF, *et al.* Altered hepatic triglyceride content after partial hepatectomy without impaired liver regeneration in multiple murine genetic models. *Hepatology* 2008; 48(4): 1097-105.
- Newsome PN, Plevris JN, Nelson LJ, Hayes PC. Animal models of fulminant hepatic failure: a critical evaluation. *Liver Transpl* 2000; 6(1): 21-31.
- Nikeghbalian S, Pournasr B, Aghdami N, Rasekhi A, Geramizadeh B, Hosseini Asl SM, *et al.* Autologous transplantation of bone marrow-derived mononuclear and CD133(+) cells in patients with decompensated cirrhosis. *Arch Iran Med* 2011; 14(1): 12-7.
- Ninomiya M, Harada N, Shiotani S, Hiroshige S, Minagawa R, Soejima Y, *et al.* Hepatocyte growth factor and transforming growth factor beta1 contribute to regeneration of small-for-size liver graft immediately after transplantation. *Transpl Int* 2003; 16(11): 814-9.
- Ninomiya M, Shirabe K, Terashi T, Ijichi H, Yonemura Y, Harada N, *et al.* Deceleration of regenerative response improves the outcome of rat with massive hepatectomy. *Am J Transplant* 2010; 10(7): 1580-7.

- Nocito A, Georgiev P, Dahm F, Jochum W, Bader M, Graf R, *et al.* Platelets and platelet-derived serotonin promote tissue repair after normothermic hepatic ischemia in mice. *Hepatology* 2007; 45(2): 369-76.
- Nurden AT. Platelets, inflammation and tissue regeneration. *Thromb Haemost* 2011; 105 Suppl 1: S13-33.
- Oertel M, Shafritz DA. Stem cells, cell transplantation and liver repopulation. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1782(2): 61-74.
- Oh SH, Witek RP, Bae SH, Zheng D, Jung Y, Piscaglia AC, *et al.* Bone marrow-derived hepatic oval cells differentiate into hepatocytes in 2-acetylaminofluorene/partial hepatectomy-induced liver regeneration. *Gastroenterology* 2007; 132(3): 1077-87.
- Okumoto K, Saito T, Onodera M, Sakamoto A, Tanaka M, Hattori E, *et al.* Serum levels of stem cell factor and thrombopoietin are markedly decreased in fulminant hepatic failure patients with a poor prognosis. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22(8): 1265-70.
- Oliveira JG, Moraes LR, Gonçalves LG, Johann LM, Kieling CO, Vieira SMG, *et al.* Centésimo transplante hepático pediátrico no HCPA. *Revista HCPA* 2006; 26(Supl.1): 162-3.
- Orive G, Hernandez RM, Rodriguez Gascon A, Calafiore R, Chang TM, de Vos P, *et al.* History, challenges and perspectives of cell microencapsulation. *Trends Biotechnol* 2004; 22(2): 87-92.
- Ornellas DS, Maron-Gutierrez T, Ornellas FM, Cruz FF, Oliveira GP, Lucas IH, *et al.* Early and late effects of bone marrow-derived mononuclear cell therapy on lung and distal organs in experimental sepsis. *Respir Physiol Neurobiol* 2011; 178(2): 304-14.
- Ortiz LA, Dutreil M, Fattman C, Pandey AC, Torres G, Go K, *et al.* Interleukin 1 receptor antagonist mediates the antiinflammatory and antifibrotic effect of mesenchymal stem cells during lung injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104(26): 11002-7.
- Overturf K, al-Dhalimy M, Ou CN, Finegold M, Grompe M. Serial transplantation reveals the stem-cell-like regenerative potential of adult mouse hepatocytes. *Am J Pathol* 1997; 151(5): 1273-80.
- Pan RL, Chen Y, Xiang LX, Shao JZ, Dong XJ, Zhang GR. Fetal liver-conditioned medium induces hepatic specification from mouse bone marrow mesenchymal stromal cells: a novel strategy for hepatic transdifferentiation. *Cytotherapy* 2008; 10(7): 668-75.
- Panis Y, McMullan DM, Emond JC. Progressive necrosis after hepatectomy and the pathophysiology of liver failure after massive resection. *Surgery* 1997; 121(2): 142-9.

- Parekkadan B, van Poll D, Megeed Z, Kobayashi N, Tilles AW, Berthiaume F, *et al.*
Immunomodulation of activated hepatic stellate cells by mesenchymal stem cells.
Biochem Biophys Res Commun 2007; 363(2): 247-52.
- Parekkadan B, van Poll D, Suganuma K, Carter EA, Berthiaume F, Tilles AW, *et al.*
Mesenchymal stem cell-derived molecules reverse fulminant hepatic failure. *PLoS One*
2007; 2(9): e941.
- Pediaditakis P, Lopez-Talavera JC, Petersen B, Monga SP, Michalopoulos GK. The
processing and utilization of hepatocyte growth factor/scatter factor following partial
hepatectomy in the rat. *Hepatology* 2001; 34(4 Pt 1): 688-93.
- Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, Mars WM, Sullivan AK, Murase N, *et al.* Bone
marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 1999; 284(5417): 1168-70.
- Piscaglia AC, Novi M, Campanale M, Gasbarrini A. Stem cell-based therapy in
gastroenterology and hepatology. *Minim Invasive Ther Allied Technol* 2008; 17(2): 100-
18.
- Polson J, Lee WM. AASLD position paper: the management of acute liver failure.
Hepatology 2005; 41(5): 1179-97.
- Quintana-Bustamante O, Alvarez-Barrientos A, Kofman AV, Fabregat I, Bueren JA, Theise
ND, *et al.* Hematopoietic mobilization in mice increases the presence of bone marrow-
derived hepatocytes via in vivo cell fusion. *Hepatology* 2006; 43(1): 108-16.
- Rahman TM, Diakanov I, Selden C, Hodgson H. Co-transplantation of encapsulated HepG2
and rat Sertoli cells improves outcome in a thioacetamide induced rat model of acute
hepatic failure. *Transpl Int* 2005; 18(8): 1001-9.
- Rahman TM, Hodgson HJ. Animal models of acute hepatic failure. *Int J Exp Pathol* 2000;
81(2): 145-57.
- Rehman J, Traktuev D, Li J, Merfeld-Clauss S, Temm-Grove CJ, Bovenkerk JE, *et al.*
Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells.
Circulation 2004; 109(10): 1292-8.
- Remie R. Anaesthesia in Laboratory Animals. In: Andersen ML, Tufik S. *Animal Models as
Tools in Ethical Biomedical Research*. 1st ed. São Paulo: Universidade Federal de São
Paulo; 2010. p. 417-32.
- Reyes Toso CF, Linares LM, Rodriguez RR. Blood sugar concentrations during ketamine or
pentobarbitone anesthesia in rats with or without alpha and beta adrenergic blockade.
Medicina (B Aires) 1995; 55(4): 311-6.

- Rhee C, Narsinh K, Venick RS, Molina RA, Nga V, Engelhardt R, *et al.* Predictors of clinical outcome in children undergoing orthotopic liver transplantation for acute and chronic liver disease. *Liver Transpl* 2006; 12(9): 1347-56.
- Richardson CA, Flecknell PA. Anaesthesia and post-operative analgesia following experimental surgery in laboratory rodents: are we making progress? *Altern Lab Anim* 2005; 33(2): 119-27.
- Riehle KJ, Campbell JS, McMahan RS, Johnson MM, Beyer RP, Bammler TK, *et al.* Regulation of liver regeneration and hepatocarcinogenesis by suppressor of cytokine signaling 3. *J Exp Med* 2008; 205(1): 91-103.
- Ripoche J. Blood platelets and inflammation: Their relationship with liver and digestive diseases. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2011; 35(5): 353-7.
- Roger V, Balladur P, Honiger J, Baudrimont M, Delelo R, Calmus Y, *et al.* A good model of experimental acute hepatic failure: 95% hepatectomy; treatment by transplantation of hepatocytes. *Transplant Proc* 1995; 27(4): 2504-5.
- Ross MA, Sander CM, Kleeb TB, Watkins SC, Stolz DB. Spatiotemporal expression of angiogenesis growth factor receptors during the revascularization of regenerating rat liver. *Hepatology* 2001; 34(6): 1135-48.
- Russell WE, Coffey RJ, Jr., Ouellette AJ, Moses HL. Type beta transforming growth factor reversibly inhibits the early proliferative response to partial hepatectomy in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85(14): 5126-30.
- Russo FP, Parola M. Stem and progenitor cells in liver regeneration and repair. *Cytotherapy* 2011; 13(2): 135-44.
- Rutherford A, Chung RT. Acute liver failure: mechanisms of hepatocyte injury and regeneration. *Semin Liver Dis* 2008; 28(2): 167-74.
- Sakamoto T, Liu Z, Murase N, Ezure T, Yokomuro S, Poli V, *et al.* Mitosis and apoptosis in the liver of interleukin-6-deficient mice after partial hepatectomy. *Hepatology* 1999; 29(2): 403-11.
- Sarac TP, Sax HC, Doerr R, Yuksel U, Pulli R, Caruana J. Preoperative fasting improves survival after 90% hepatectomy. *Arch Surg* 1994; 129(7): 729-33.
- Sass DA, Shakil AO. Fulminant hepatic failure. *Liver Transpl* 2005; 11(6): 594-605.
- Sato S, Suzuki K, Takikawa Y, Endo R, Omata M. Clinical epidemiology of fulminant hepatitis in Japan before the substantial introduction of liver transplantation: an analysis of 1309 cases in a 15-year national survey. *Hepatol Res* 2004; 30(3): 155-161.

- Sato Y, Koyama S, Tsukada K, Hatakeyama K. Acute portal hypertension reflecting shear stress as a trigger of liver regeneration following partial hepatectomy. *Surg Today* 1997; 27(6): 518-26.
- Sato Y, Tsukada K, Hatakeyama K. Role of shear stress and immune responses in liver regeneration after a partial hepatectomy. *Surg Today* 1999; 29(1): 1-9.
- Schneider A, Attaran M, Meier PN, Strassburg C, Manns MP, Ott M, *et al.* Hepatocyte transplantation in an acute liver failure due to mushroom poisoning. *Transplantation* 2006; 82(8): 1115-6.
- Schofield PS, Sugden MC, Corstorphine CG, Zammit VA. Altered interactions between lipogenesis and fatty acid oxidation in regenerating rat liver. *Biochem J* 1987; 241(2): 469-74.
- Schwartz RE, Reyes M, Koodie L, Jiang Y, Blackstad M, Lund T, *et al.* Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J Clin Invest* 2002; 109(10): 1291-302.
- Sgroi A, Mai G, Morel P, Baertschiger RM, Gonelle-Gispert C, Serre-Beinier V, *et al.* Transplantation of encapsulated hepatocytes during acute liver failure improves survival without stimulating native liver regeneration. *Cell Transplant* 2011.
- Shanmukhappa K, Matte U, Degen JL, Bezerra JA. Plasmin-mediated proteolysis is required for hepatocyte growth factor activation during liver repair. *J Biol Chem* 2009; 284(19): 12917-23.
- Shibutani M. Anesthesia, Artificial Ventilation and Perfusion Fixation. In: Krinke GJ. *The Laboratory Rat*. 1st ed. London: Academic Press; 2000. p. 511-21.
- Shimabukuro R, Kawanaka H, Tomikawa M, Akahoshi T, Konishi K, Yoshida D, *et al.* Effect of thrombopoietin on platelet counts and liver regeneration after partial hepatectomy in a rat model. *Surg Today* 2009; 39(12): 1054-9.
- Shimizu M, Hara A, Okuno M, Matsuno H, Okada K, Ueshima S, *et al.* Mechanism of retarded liver regeneration in plasminogen activator-deficient mice: impaired activation of hepatocyte growth factor after Fas-mediated massive hepatic apoptosis. *Hepatology* 2001; 33(3): 569-76.
- Shteyer E, Liao Y, Muglia LJ, Hruz PW, Rudnick DA. Disruption of hepatic adipogenesis is associated with impaired liver regeneration in mice. *Hepatology* 2004; 40(6): 1322-32.
- Simpson DP. Prolonged (12 hours) intravenous anesthesia in the rat. *Lab Anim Sci* 1997; 47(5): 519-23.

- Simpson NE, Grant SC, Gustavsson L, Peltonen VM, Blackband SJ, Constantinidis I. Biochemical consequences of alginate encapsulation: a NMR study of insulin-secreting cells. *Biomaterials* 2006; 27(12): 2577-86.
- Singer NG, Caplan AI. Mesenchymal stem cells: mechanisms of inflammation. *Annu Rev Pathol* 2011; 6: 457-78.
- Soriano HE, Superina R, Ferry GD, Wang LJ, Alonso E, Almond S. Hepatocyte transplantation (HTx) in children with liver failure. *Hepatology* 2001; 34(Suppl 2): 205A.
- Soto-Gutierrez A, Navarro-Alvarez N, Yagi H, Yarmush ML. Stem cells for liver repopulation. *Curr Opin Organ Transplant* 2009; 14(6): 667-73.
- Stokes EL, Flecknell PA, Richardson CA. Reported analgesic and anaesthetic administration to rodents undergoing experimental surgical procedures. *Lab Anim* 2009; 43(2): 149-54.
- Strauss A, Grabhorn E, Sornsakrin M, Briem-Richter A, Fischer L, Nashan B, *et al.* Liver transplantation for fulminant hepatic failure in infancy: a single center experience. *Pediatr Transplant* 2009; 13(7): 838-42.
- Streetz K, Leifeld L, Grundmann D, Ramakers J, Eckert K, Spengler U, *et al.* Tumor necrosis factor alpha in the pathogenesis of human and murine fulminant hepatic failure. *Gastroenterology* 2000; 119(2): 446-60.
- Strey CW, Markiewski M, Mastellos D, Tudoran R, Spruce LA, Greenbaum LE, *et al.* The proinflammatory mediators C3a and C5a are essential for liver regeneration. *J Exp Med* 2003; 198(6): 913-23.
- Strom SC, Fisher RA, Rubinstein WS, Barranger JA, Towbin RB, Charron M, *et al.* Transplantation of human hepatocytes. *Transplant Proc* 1997; 29(4): 2103-6.
- Su AI, Guidotti LG, Pezacki JP, Chisari FV, Schultz PG. Gene expression during the priming phase of liver regeneration after partial hepatectomy in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99(17): 11181-6.
- Sudo K, Yamada Y, Saito K, Shimizu S, Ohashi H, Kato T, *et al.* TNF-alpha and IL-6 signals from the bone marrow derived cells are necessary for normal murine liver regeneration. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1782(11): 671-9.
- Swenson ES, Kuwahara R, Krause DS, Theise ND. Physiological variations of stem cell factor and stromal-derived factor-1 in murine models of liver injury and regeneration. *Liver Int* 2008; 28(3): 308-18.
- Takayama H, Miyake Y, Nouse K, Ikeda F, Shiraha H, Takaki A, *et al.* Serum levels of platelet-derived growth factor-BB and vascular endothelial growth factor as prognostic

- factors for patients with fulminant hepatic failure. *J Gastroenterol Hepatol* 2011; 26(1): 116-21.
- Takikawa Y, Suzuki K. Clinical epidemiology of fulminant hepatitis in Japan. *Hepatol Res* 2008; 38(s1The 6 Japan Society of Hepatology Single Topic Conference: Liver Failure: Recent Progress and Pathogenesis to Management. 28-29 September 2007, Iwate, Japan): S14-S18.
- Taub R. Liver regeneration: from myth to mechanism. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004; 5(10): 836-47.
- Tavares AM, da Rosa Araujo AS, Baldo G, Matte U, Khaper N, Bello-Klein A, *et al.* Bone marrow derived cells decrease inflammation but not oxidative stress in an experimental model of acute myocardial infarction. *Life Sci* 2010; 87(23-26): 699-706.
- Terada N, Hamazaki T, Oka M, Hoki M, Mastalerz DM, Nakano Y, *et al.* Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* 2002; 416(6880): 542-5.
- Terblanche J, Hickman R. Animal models of fulminant hepatic failure. *Dig Dis Sci* 1991; 36(6): 770-4.
- Theise ND, Badve S, Saxena R, Henegariu O, Sell S, Crawford JM, *et al.* Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation-induced myeloablation. *Hepatology* 2000; 31(1): 235-40.
- Theise ND, Nimmakayalu M, Gardner R, Illei PB, Morgan G, Teperman L, *et al.* Liver from bone marrow in humans. *Hepatology* 2000; 32(1): 11-6.
- Thorgeirsson SS. Hepatic stem cells in liver regeneration. *Faseb J* 1996; 10(11): 1249-56.
- Thorgeirsson SS, Grisham JW. Hematopoietic cells as hepatocyte stem cells: a critical review of the evidence. *Hepatology* 2006; 43(1): 2-8.
- Tijburg LB, Nyathi CB, Meijer GW, Geelen MJ. Biosynthesis and secretion of triacylglycerol in rat liver after partial hepatectomy. *Biochem J* 1991; 277(Pt 3): 723-8.
- Tilg H, Kaser A, Moschen AR. How to modulate inflammatory cytokines in liver diseases. *Liver Int* 2006; 26(9): 1029-39.
- Togel F, Weiss K, Yang Y, Hu Z, Zhang P, Westenfelder C. Vasculotropic, paracrine actions of infused mesenchymal stem cells are important to the recovery from acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007; 292(5): F1626-35.
- Tokai H, Kawashita Y, Ito Y, Yamanouchi K, Takatsuki M, Eguchi S, *et al.* Efficacy and limitation of bone marrow transplantation in the treatment of acute and subacute liver failure in rats. *Hepatol Res* 2009; 39(11): 1137-43.

- Tokunaga T, Ikegami T, Yoshizumi T, Imura S, Morine Y, Shinohara H, *et al.* Beneficial effects of fluvastatin on liver microcirculation and regeneration after massive hepatectomy in rats. *Dig Dis Sci* 2008; 53(11): 2989-94.
- Tomchuck SL, Zvezdaryk KJ, Coffelt SB, Waterman RS, Danka ES, Scandurro AB. Toll-like receptors on human mesenchymal stem cells drive their migration and immunomodulating responses. *Stem Cells* 2008; 26(1): 99-107.
- Tomikawa M, Hashizume M, Highashi H, Ohta M, Sugimachi K. The role of the spleen, platelets, and plasma hepatocyte growth factor activity on hepatic regeneration in rats. *J Am Coll Surg* 1996; 182(1): 12-6.
- Uludag H, De Vos P, Tresco PA. Technology of mammalian cell encapsulation. *Adv Drug Deliv Rev* 2000; 42(1-2): 29-64.
- van Poll D, Parekkadan B, Borel Rinkes IHM, Tilles AW, Yarmush ML. Mesenchymal stem cell therapy for protection and repair of injured vital organs. *Cellular and Molecular Bioengineering* 2008; 1(1): 42-50.
- van Poll D, Parekkadan B, Cho CH, Berthiaume F, Nahmias Y, Tilles AW, *et al.* Mesenchymal stem cell-derived molecules directly modulate hepatocellular death and regeneration in vitro and in vivo. *Hepatology* 2008; 47(5): 1634-43.
- Vanheule E, Fan YD, Van Huysse J, Meester D, Olievier K, Praet M, *et al.* Expression of placental growth factor in regenerating livers after partial hepatectomy in the rat. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2011; 23(1): 66-75.
- Viebahn CS, Yeoh GC. What fires prometheus? The link between inflammation and regeneration following chronic liver injury. *Int J Biochem Cell Biol* 2008; 40(5): 855-73.
- Vollmar B, Menger MD. The hepatic microcirculation: mechanistic contributions and therapeutic targets in liver injury and repair. *Physiol Rev* 2009; 89(4): 1269-339.
- Vosough M, Moslem M, Pournasr B, Baharvand H. Cell-based therapeutics for liver disorders. *Br Med Bull* 2011; 100(1): 157-72.
- Wack KE, Ross MA, Zegarra V, Sysko LR, Watkins SC, Stolz DB. Sinusoidal ultrastructure evaluated during the revascularization of regenerating rat liver. *Hepatology* 2001; 33(2): 363-78.
- Wang X, Montini E, Al-Dhalimy M, Lagasse E, Finegold M, Grompe M. Kinetics of liver repopulation after bone marrow transplantation. *Am J Pathol* 2002; 161(2): 565-74.
- Wang X, Wang W, Bengmark S, Andersson R. Alterations of lipid contents in blood, hepatocytes, and enterocytes in the early stage of acute liver failure induced by 90% hepatectomy in the rat. *J Surg Res* 1995; 59(3): 326-36.

- Wang X, Willenbring H, Akkari Y, Torimaru Y, Foster M, Al-Dhalimy M, *et al.* Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. *Nature* 2003; 422(6934): 897-901.
- Wang X, Zhao X, Andersson R. The effects of transplantation of hepatocytes cultured with insulin on acute liver failure induced by 90% hepatectomy in the rat. *Eur J Surg* 1995; 161(7): 475-81.
- Wang XD, Ar'Rajab A, Ahren B, Andersson R, Bengmark S. Improvement of the effects of intrasplenic transplantation of hepatocytes after 90% hepatectomy in the rat by cotransplantation with pancreatic islets. *Transplantation* 1991; 52(3): 462-6.
- Webber EM, Bruix J, Pierce RH, Fausto N. Tumor necrosis factor primes hepatocytes for DNA replication in the rat. *Hepatology* 1998; 28(5): 1226-34.
- Weinbren K, Dowling F. Hypoglycaemia and the delayed proliferative response after subtotal hepatectomy. *Br J Exp Pathol* 1972; 53(1): 78-84.
- White P, Brestelli JE, Kaestner KH, Greenbaum LE. Identification of transcriptional networks during liver regeneration. *J Biol Chem* 2005; 280(5): 3715-22.
- Wigmore SJ, Walsh TS, Lee A, Ross JA. Pro-inflammatory cytokine release and mediation of the acute phase protein response in fulminant hepatic failure. *Intensive Care Med* 1998; 24(3): 224-9.
- Wise AF, Ricardo SD. Mesenchymal Stem Cells in Kidney Inflammation and Repair. *Nephrology (Carlton)* 2012; 17(1): 1-10.
- Wong H, Chang TM. Bioartificial liver: implanted artificial cells microencapsulated living hepatocytes increases survival of liver failure rats. *Int J Artif Organs* 1986; 9(5): 335-6.
- Wuestefeld T, Klein C, Streetz KL, Betz U, Lauber J, Buer J, *et al.* Interleukin-6/glycoprotein 130-dependent pathways are protective during liver regeneration. *J Biol Chem* 2003; 278(13): 11281-8.
- Yagi H, Parekkadan B, Suganuma K, Soto-Gutierrez A, Tompkins RG, Tilles AW, *et al.* Long-term superior performance of a stem cell/hepatocyte device for the treatment of acute liver failure. *Tissue Eng Part A* 2009; 15(11): 3377-88.
- Yamada Y, Kirillova I, Peschon JJ, Fausto N. Initiation of liver growth by tumor necrosis factor: deficient liver regeneration in mice lacking type I tumor necrosis factor receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94(4): 1441-6.
- Yang X, Guo M, Wan YJ. Deregulation of growth factor, circadian clock, and cell cycle signaling in regenerating hepatocyte RXRalpha-deficient mouse livers. *Am J Pathol* 2010; 176(2): 733-43.

- Yannaki E, Athanasiou E, Xagorari A, Constantinou V, Batsis I, Kaloyannidis P, *et al.* G-CSF-primed hematopoietic stem cells or G-CSF per se accelerate recovery and improve survival after liver injury, predominantly by promoting endogenous repair programs. *Exp Hematol* 2005; 33(1): 108-19.
- Yeh FL, Lin WL, Shen HD. Changes in circulating levels of an anti-inflammatory cytokine interleukin 10 in burned patients. *Burns* 2000; 26(5): 454-9.
- Yoshida N, Iwata H, Yamada T, Sekino T, Matsuo H, Shirahashi K, *et al.* Improvement of the survival rate after rat massive hepatectomy due to the reduction of apoptosis by caspase inhibitor. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22(11): 2015-21.
- Yoshimoto N, Togo S, Kubota T, Kamimukai N, Saito S, Nagano Y, *et al.* Role of transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) in endotoxin-induced hepatic failure after extensive hepatectomy in rats. *J Endotoxin Res* 2005; 11(1): 33-9.
- Yumoto E, Higashi T, Nouse K, Nakatsukasa H, Fujiwara K, Hanafusa T, *et al.* Serum gamma-interferon-inducing factor (IL-18) and IL-10 levels in patients with acute hepatitis and fulminant hepatic failure. *J Gastroenterol Hepatol* 2002; 17(3): 285-94.
- Zhang B, Inagaki M, Jiang B, Miyakoshi M, Arikura J, Ogawa K, *et al.* Effects of bone marrow and hepatocyte transplantation on liver injury. *J Surg Res* 2009; 157(1): 71-80.
- Zhang H, Liu Z, Li R, Wang D, Liu W, Li J, *et al.* Transplantation of embryonic small hepatocytes induces regeneration of injured liver in adult rat. *Transplant Proc* 2009; 41(9): 3887-92.
- Zhang XK, Gauthier T, Burczynski FJ, Wang GQ, Gong YW, Minuk GY. Changes in liver membrane potentials after partial hepatectomy in rats. *Hepatology* 1996; 23(3): 549-51.
- Zieve L, Anderson WR, Lindblad S. Course of hepatic regeneration after 80% to 90% resection of normal rat liver. Comparison with two-lobe and one-lobe hepatectomy. *J Lab Clin Med* 1985; 105(3): 331-6.
- Zimmermann H, Zimmermann D, Reuss R, Feilen PJ, Manz B, Katsen A, *et al.* Towards a medically approved technology for alginate-based microcapsules allowing long-term immunoisolated transplantation. *J Mater Sci Mater Med* 2005; 16(6): 491-501.
- Zocco MA, Piscaglia AC, Giuliani F, Arena V, Novi M, Rinninella E, *et al.* CD133+ stem cell mobilization after partial hepatectomy depends on resection extent and underlying disease. *Dig Liver Dis* 2011; 43(2): 147-54.

ANEXOS

Anexo 1

Ficha de hepatectomia

Identificação: _____ - Marca: \ /

Sexo: () Macho () Fêmea

Dia 0 – 0 horas Data: ___/___/___ Peso: _____ g

Equipe: () Carlos () Rafael () Ariane () Flávio () _____

Anestesia: ___:___ h

Xilazina: _____ mL (mL/g) ½: _____ mL 1/3: _____ mL Dose extra: _____

Ketamina: _____ mL (mL/g) ½: _____ mL 1/3: _____ mL Dose extra: _____

Coleta de sangue: ___:___ h () ocular - _____ mL – identificação do frasco: _____

___:___ h () ocular () cauda Lactato: _____ mmol/L – Glicose: _____ mg/dL

Mesa: ___:___ h Temperatura: _____ C O2: _____ L/min

Abertura da cavidade: ___:___ horas

Incisão: () mediana () outra: _____

Ligadura do hilo: ___:___ h Fio: _____ lobo - papel

Ligadura da VH LE: ___:___ h Fio: _____ Peso: _____ - _____ = _____ g _____ % peso corporal

Ligadura da VH LM: ___:___ h Fio: _____ Peso: _____ - _____ = _____ g _____ % peso corporal

Ligadura do LD SS: ___:___ h Fio: _____ Peso: _____ - _____ = _____ g _____ % peso corporal

Total de fios utilizados: _____ un Total: _____ g _____ % peso corporal

Revisão da cavidade / Intercorrências: _____

Implante de cápsulas:

() Tx - _____ mL – concentração: _____ céls/mL – N céls: _____ N caps: _____ N céls/cap: _____

() SHAM - _____ mL - N caps: _____

() Modelo

Sutura do peritônio: ___:___ h Fio: _____

Sutura da parede: ___:___ h Fio: _____ Total de fios utilizados: _____ un

Término cirurgia: ___:___ h Tempo de cirurgia: _____ minutos Vivo: () S/N

Recuperação: ___:___ h () incubadora - Temperatura: _____ C O2: _____ L/min

Acordou: ___:___ h

Avaliações:

1 h PO ___:___ h Vivo: () S/N _____

() ocular () cauda – Lactato: _____ mmol/L – Glicose: _____ mg/dL

6 h PO ___:___ h Vivo: () S/N _____

() ocular () cauda – Lactato: _____ mmol/L – Glicose: _____ mg/dL

___ h PO ___:___ h Vivo: () S/N _____

() ocular () cauda – Lactato: _____ mmol/L – Glicose: _____ mg/dL

Dia 1 – 24 horas Data: ___/___/___ Peso: _____ g

Equipe: () Carlos () Rafael () Ariane () Flávio () _____

___:___ h: Vivo: () S/N _____

Anestesia: ___:___ horas

Xilazina: _____ mL (mL/g) ½: _____ mL 1/3: _____ mL Dose extra: _____

Ketamina: _____ mL (mL/g) ½: _____ mL 1/3: _____ mL Dose extra: _____

Coleta de sangue: ___:___ h () ocular - _____ mL – identificação do frasco: _____

___:___ h () ocular () cauda Lactato: _____ mmol/L – Glicose: _____ mg/dL

___:___ h: Vivo: () S/N _____

Identificação: _____

Dia 2 – 48 horas Data: ___/___/___ Peso: _____ g

Equipe: () Carlos () Rafael () Ariane () Flávio () _____

____:____ h: Vivo: () S/N _____

Anestesia: ____:____ h

Xilazina: _____ mL (_____ mL/g) ½: _____ mL 1/3: _____ mL Dose extra: _____

Ketamina: _____ mL (_____ mL/g) ½: _____ mL 1/3: _____ mL Dose extra: _____

Coleta de sangue: ____:____ h () ocular - _____ mL – identificação do frasco: _____

____:____ h () ocular () cauda Lactato: _____ mmol/L – Glicose: _____ mg/dL

____:____ h: Vivo: () S/N _____

Dia 3 – 72 horas Data: ___/___/___ Peso: _____ g

Equipe: () Carlos () Rafael () Ariane () Flávio () _____

____:____ h: Vivo: () S/N _____

Anestesia: ____:____ horas

Xilazina: _____ mL (_____ mL/g) ½: _____ mL 1/3: _____ mL Dose extra: _____

Ketamina: _____ mL (_____ mL/g) ½: _____ mL 1/3: _____ mL Dose extra: _____

Coleta de sangue: ____:____ h () ocular - _____ mL – identificação do frasco: _____

____:____ h () ocular () cauda Lactato: _____ mmol/L – Glicose: _____ mg/dL

Sacrifício: ____:____ horas

Laparotomia: () Sacrifício () Necropsia – óbito: ___/___/___ ____:____ horas

Suturas: _____

Ascite: () S/N _____

LD SI: Peso: _____ - _____ = _____ g _____% peso corporal – Aspecto: _____

Nitrogênio () S/N – identificação: _____

Formol () S/N – identificação: _____

LsOs: Peso: _____ - _____ = _____ g _____% peso corporal – Aspecto: _____

Nitrogênio () S/N – identificação: _____

Formol () S/N – identificação: _____

Cápsulas:

Nitrogênio () S/N – identificação: _____

Formol () S/N – identificação: _____

Cultura () S/N – identificação: _____

Anexo 2

Ficha de hepatectomia 90%

Identificação: _____ - Marca: \ /

Sexo: () Macho () Fêmea

Dia 0 – 0 horas Data: ___/___/___ Peso: _____ g Equipe: () Carlos () Rafael () Ariane () _____

Anestesia: ___:___ h Isofurano: indução ___% manutenção ___% O2: _____ litros

Coleta de sangue: ___:___ h () ocular - _____ mL – identificação do frasco: _____

___:___ h () ocular () cauda Lactato: _____ mmol/L – Glicose: _____ mg/dL

Mesa: ___:___ h Temperatura: _____ C O2: _____ L/min Bupivacaína: () S/N _____

Abertura da cavidade: ___:___ horas Incisão: () mediana () outra: _____

Ligadura do hilo: ___:___ h Fio V4.0: () S/N _____ lobo - papel

Ligadura da VH LE: ___:___ h Fio V4.0: () S/N _____ Peso: _____ - _____ = _____ g _____% peso corporal

Ligadura da VH LM: ___:___ h Fio V4.0: () S/N _____ Peso: _____ - _____ = _____ g _____% peso corporal

Ligadura do LD: ___:___ h Fio V4.0: () S/N _____ Peso: _____ - _____ = _____ g _____% peso corporal

Total de fios utilizados: _____ un Total: _____ g _____% peso corporal

Revisão da cavidade / Intercorrências: _____

() Tx: ___:___ h Cápsulas: _____ mL Veículo: PBS: _____ mL Seringa urológica: () S/N _____

N céls: _____ concentração: _____ céls/mL N caps: _____ N céls/cap: _____

() SHAM: ___:___ h Cápsulas: _____ mL Veículo: PBS: _____ mL Seringa urológica: () S/N _____

() Modelo 92% + água com 20% de glicose

Glicose IP 100 mg () S/N _____ ___:___ h

Sutura do peritônio: ___:___ h Fio MN4.0: () S/N _____

Sutura da parede: ___:___ h Fio MN4.0: () S/N _____ Total de fios utilizados: _____ un

Término cirurgia: ___:___ h Tempo de cirurgia: _____ minutos Vivo: () S/N _____

Recuperação: ___:___ h () incubadora - Temperatura: _____ C O2: _____ L/min

Acordou: ___:___ h

6 h PO ___:___ h Vivo: () S/N _____ ___:___ h - SG 5% IP 2 mL () S/N _____

() ocular () cauda – Lactato: _____ mmol/L – Glicose: _____ mg/dL

Dia 1 – 24 horas Data: ___/___/___ Peso: _____ g Equipe: () Carlos () Rafael () _____

___:___ h: Vivo: () S/N _____ T retal: _____ °C

Anestesia: ___:___ h Isofurano: indução ___% manutenção ___% O2: _____ litros

Coleta de sangue: ___:___ h () ocular - _____ mL – identificação do frasco: _____

___:___ h () ocular () cauda Lactato: _____ mmol/L – Glicose: _____ mg/dL

___:___ h SG 5% IP 2 mL () S/N _____

Dia 2 – 48 horas Data: ___/___/___ Peso: _____ g Equipe: () Carlos () Rafael () _____

___:___ h: Vivo: () S/N _____ T retal: _____ °C

Anestesia: ___:___ h Isofurano: indução ___% manutenção ___% O2: _____ litros

Coleta de sangue: ___:___ h () ocular - _____ mL – identificação do frasco: _____

___:___ h () ocular () cauda Lactato: _____ mmol/L – Glicose: _____ mg/dL

___:___ h SG 5% IP 2 mL () S/N _____

Dia 3 – 72 horas Data: ___/___/___ Peso: _____ g Equipe: () Carlos () Rafael () _____

___:___ h: Vivo: () S/N _____ T retal: _____ °C

Anestesia: ___:___ h Isofurano: indução ___% manutenção ___% O2: _____ litros

Coleta de sangue: ___:___ h () ocular - _____ mL – identificação do frasco: _____

___:___ h () ocular () cauda Lactato: _____ mmol/L – Glicose: _____ mg/dL

____:____ h SG 5% IP 2 mL () S/N _____

Identificação: _____

Dia 4 – 96 horas Data: ____/____/____ Peso: _____ g Equipe: () Carlos () Rafael () _____
____:____ h: Vivo: () S/N _____ T retal: _____ °C

Anestesia: ____:____ h Isofurano: indução ____% manutenção ____% O2: _____ litros

Coleta de sangue: ____:____ h () ocular - _____ mL – identificação do frasco: _____

____:____ h () ocular () cauda Lactato: _____ mmol/L – Glicose: _____ mg/dL

____:____ h SG 5% IP 2 mL () S/N _____

Dia 5 – 120 horas Data: ____/____/____ Peso: _____ g Equipe: () Carlos () Rafael () _____
____:____ h: Vivo: () S/N _____ T retal: _____ °C

Anestesia: ____:____ h Isofurano: indução ____% manutenção ____% O2: _____ litros

Coleta de sangue: ____:____ h () ocular - _____ mL – identificação do frasco: _____

____:____ h () ocular () cauda Lactato: _____ mmol/L – Glicose: _____ mg/dL

____:____ h SG 5% IP 2 mL () S/N _____

Dia 6 – 144 horas Data: ____/____/____ Peso: _____ g Equipe: () Carlos () Rafael () _____
____:____ h: Vivo: () S/N _____ T retal: _____ °C

Anestesia: ____:____ h Isofurano: indução ____% manutenção ____% O2: _____ litros

Coleta de sangue: ____:____ h () ocular () cauda Lactato: _____ mmol/L – Glicose: _____ mg/dL

____:____ h SG 5% IP 2 mL () S/N _____

Dia 7 – 168 horas Data: ____/____/____ Peso: _____ g Equipe: () Carlos () Rafael () _____
____:____ h: Vivo: () S/N _____ T retal: _____ °C

Anestesia: ____:____ h Isofurano: indução ____% manutenção ____% O2: _____ litros

Coleta de sangue: ____:____ h () ocular () cauda Lactato: _____ mmol/L – Glicose: _____ mg/dL

____:____ h SG 5% IP 2 mL () S/N _____

Dia 8 – 192 horas Data: ____/____/____ Peso: _____ g Equipe: () Carlos () Rafael () _____
____:____ h: Vivo: () S/N _____ T retal: _____ °C

Dia 9 – 216 horas Data: ____/____/____ Peso: _____ g Equipe: () Carlos () Rafael () _____
____:____ h: Vivo: () S/N _____ T retal: _____ °C

Dia 10 – 240 horas Data: ____/____/____ Peso: _____ g Equipe: () Carlos () Rafael () _____
____:____ h: Vivo: () S/N _____ T retal: _____ °C

Anestesia: ____:____ h Isofurano: indução ____% manutenção ____% O2: _____ litros

Coleta de sangue: ____:____ h () ocular () cauda Lactato: _____ mmol/L – Glicose: _____ mg/dL

Sacrifício: ____:____ horas Laparotomia: () Sacrifício () Necropsia – óbito: ____/____/____ ____:____ horas

Suturas: _____ Ascite: () S/N _____

LsOs: Peso: ____ - ____ = ____ g ____% peso corporal – Aspecto: _____

Nitrogênio () S/N – identificação: _____ Formol () S/N – identificação: _____

Cápsulas: Nitrogênio () S/N – identificação: _____ Formol () S/N – identificação: _____

Cultura () S/N – identificação: _____

Anexo 3

Ficha de hepatectomia 90% + glicose: IP e na água (20%)

Identificação: _____ - Marca: \ / Sexo: () Macho () Fêmea Origem: _____ DN: __/__/__

Dia 0 – 0 horas Data: __/__/____ Peso: _____ g Equipe: () Carlos () Rafael () Ariane () _____

Anestesia: __:__ h Isofurano: indução ____% manutenção ____% O2: _____ litros

Coleta de sangue: __:__ h () ocular - _____ mL – identificação do frasco: _____

____:__ h () ocular () cauda Glicose: _____ mg/dL

Mesa: __:__ h Temperatura: _____ C O2: _____ L/min Bupivacaína: () S/N _____

Abertura da cavidade: __:__ horas Incisão: () mediana () outra: _____

Ligadura do hilo: __:__ h Fio V4.0: () S/N _____ lobo - papel

Ligadura da VH LE: __:__ h Fio V4.0: () S/N _____ Peso: _____ - _____ = _____ g _____% peso corporal

Ligadura da VH LM: __:__ h Fio V4.0: () S/N _____ Peso: _____ - _____ = _____ g _____% peso corporal

Ligadura do LD: __:__ h Fio V4.0: () S/N _____ Peso: _____ - _____ = _____ g _____% peso corporal

Total de fios utilizados: _____ un Total: _____ g _____% peso corporal

Revisão da cavidade / Intercorrências: _____

() MOT: __:__ h Cápsulas: _____ mL N céls: _____ Veículo: PBS: _____ mL

() FMMO: __:__ h Cápsulas: _____ mL N céls: _____ Veículo: PBS: _____ mL

() Controle: __:__ h Cápsulas: _____ mL Veículo: PBS: _____ mL

Glicose IP 100 mg () S/N _____ :__ h Dose: _____ mg Volume: _____ mL

Sutura do peritônio: __:__ h Fio MN4.0: () S/N _____

Sutura da parede: __:__ h Fio MN4.0: () S/N _____ Total de fios utilizados: _____ un

Término cirurgia: __:__ h Tempo de cirurgia: _____ minutos Vivo: () S/N

Recuperação: __:__ h () incubadora - Temperatura: _____ C O2: _____ L/min

Acordou: __:__ h

6 h PO __:__ h Vivo: () S/N _____ :__ h - SG 5% IP 2 mL () S/N _____

Coleta de sangue: __:__ h () ocular () cauda Glicose: _____ mg/dL

12 h PO __:__ h Vivo: () S/N _____ :__ h

Dia 1 – 24 horas Data: __/__/____ Peso: _____ g Equipe: () Carlos () Rafael () _____

____:__ h: Vivo: () S/N _____ T retal: _____ °C

Anestesia: __:__ h Isofurano: indução ____% manutenção ____% O2: _____ litros

Coleta de sangue: __:__ h () ocular () cauda Glicose: _____ mg/dL

____:__ h SG 5% IP 2 mL () S/N Dose: _____ mg Volume: _____ mL

Dia 2 – 48 horas Data: __/__/____ Peso: _____ g Equipe: () Carlos () Rafael () _____

____:__ h: Vivo: () S/N _____ T retal: _____ °C

Anestesia: __:__ h Isofurano: indução ____% manutenção ____% O2: _____ litros

Coleta de sangue: __:__ h () ocular () cauda Glicose: _____ mg/dL

____:__ h SG 5% IP 2 mL () S/N Dose: _____ mg Volume: _____ mL

Dia 3 – 72 horas Data: __/__/____ Peso: _____ g Equipe: () Carlos () Rafael () _____

____:__ h: Vivo: () S/N _____ T retal: _____ °C

Identificação: _____

Sacrifício Dia ___ - ___ **horas** Data: ___/___/___ **Peso:** _____ gBrdU: ___:___ h **Volume:** _____ mL IPAnestesia: ___:___ h **Isofurano:** indução ___% **manutenção** ___% O2: _____ litrosColeta de sangue: ___:___ h () ocular () cauda () cardíaca **Glicose:** _____ mg/dL

Sacrifício: ___:___ horas

Laparotomia: Suturas: _____ **Ascite:** () S/N _____**LsOs:** _____ - _____ = _____ g _____% peso corporal – **Aspecto:** _____**Nitrogênio** () S/N – identificação: _____ **Formol** () S/N – identificação: _____**Cápsulas:** **Nitrogênio** () S/N – identificação: _____ **Formol** () S/N – identificação: _____**Cultura** () S/N – identificação: _____**Baço:** _____ - _____ = _____ g _____% peso corporal**Nitrogênio** () S/N – identificação: _____ **Formol** () S/N – identificação: _____**Intestino:** **Formol** () S/N – identificação: _____

Anexo 4

The effects of anesthetic regimen in 90% hepatectomy in rats¹

Comparação dos efeitos do regime anestésico na hepatectomia de 90% em ratos.

Original article, Anesthesia

Authors

Carlos Oscar Kieling^I, Ariane Nadia Backes^{II}, Rafael Lucyk Maurer^{III}, Carolina Uribe Cruz^{IV},
Alessandro Bersch Osvaldt^V, Themis Reverbel da Silveira^{VI}, Ursula da Silveira Matte^{VII}

Affiliations

^I MsC, MD. Programa de Pós-Graduação: Ciências em Gastroenterologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul; Laboratório de Hepatologia e Gastroenterologia Experimental, Centro de Pesquisa Experimental, Hospital de Clínicas de Porto Alegre; Serviço de Pediatria, Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Main author. Conception, design, intellectual and scientific content of the study; acquisition, analysis and interpretation of data; manuscript writing

^{II} MsC, MD. Laboratório de Hepatologia e Gastroenterologia Experimental, Centro de Pesquisa Experimental, Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Acquisition and interpretation of data, involved in technical procedures.

^{III} BsC, MsC. Laboratório de Hepatologia e Gastroenterologia Experimental, Centro de Pesquisa Experimental, Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Acquisition and interpretation of data, involved in technical procedures.

^{IV} Centro de Terapia Gênica, Centro de Pesquisa Experimental, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul; Acquisition and interpretation of data, involved in technical procedures.

^V MD, PhD. Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul; Grupo de Vias Biliares e Pâncreas do Serviço de Cirurgia Digestiva do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Acquisition and interpretation of data, involved in technical procedures, manuscript writing

^{VI} MD, PhD. Programa de Pós-Graduação: Ciências em Gastroenterologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul; Laboratório de Hepatologia e Gastroenterologia Experimental, Centro de Pesquisa Experimental, Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Supervised all phases of the study, manuscript writing and critical revision.

^{VII} BsC, PhD. Centro de Terapia Gênica, Centro de Pesquisa Experimental, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Supervised all phases of the study, manuscript writing and critical revision.

¹Research performed at Centro de Pesquisa Experimental, Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

ABSTRACT

PURPOSE: To evaluate the influence of the anesthetic regimen on anesthetic recovery, survival, and blood glucose levels following a 90% partial hepatectomy in rats.

METHODS: Adult male Wistar rats were divided into two groups according to their anesthetic regimens: intraperitoneal ketamine and xylazine or inhaled isoflurane. In order to prevent hypoglycemia, glucose was administered intraperitoneally and glucose (20%) was added to the drinking water.

RESULTS: Anesthetic recovery time was longer in the ketamine and xylazine group. The survival rate after 72 hours was lower (log rank=0.0001) in the ketamine and xylazine group (0.0%) than in the isoflurane group (26.7%). The blood glucose after six hours was lower (P=0.017) in the ketamine and xylazine group (63 ± 31.7 mg/dL) than in the isoflurane group (98 ± 21.2 mg/dL). The prolonged anesthesia recovery time associated with ketamine and xylazine decreased the survival rate and blood glucose levels after 90% hepatectomy.

CONCLUSION: Isoflurane anesthesia reduced the recovery time and incidence of hypoglycemia and increased the survival rate in the early hours, providing a therapeutic window that is suitable for experimental studies.

Key words: Acute liver failure; Hepatectomy; Isoflurane; Ketamine; Xylazine; Ratos.

RESUMO

OBJETIVO: Avaliar a influência do regime anestésico sobre a recuperação anestésica, a sobrevida em 72 horas e a glicemia após hepatectomia parcial de 90% em ratos.

MÉTODOS: trinta ratos Wistar machos adultos foram divididos em dois grupos conforme o regime anestésico: combinação de ketamina e xilazina intraperitoneal ou isoflurano inalatório. Para prevenção de hipoglicemia foi administrada glicose intraperitoneal e adicionado glicose (20%) na água de beber.

RESULTADOS: A recuperação anestésica no grupo ketamina e xilazina foi mais prolongada. Durante primeira hora após hepatectomia, nenhum rato anestesiado com ketamina e xilazina despertou. Todos do grupo isoflurano estavam ativos minutos após final da cirurgia. A sobrevida em 72 horas foi menor (Log rank=0,0001) no grupo ketamina e xilazina (0,0%) que no grupo isoflurano (26,7%). Glicemia em 6 horas do grupo ketamina e xilazina (63±31,7 mg/dL) foi menor (P=0,017) que no grupo isoflurano (98, ±21,2 mg/dL). Prolongado tempo de recuperação anestésica com ketamina e xilazina diminuiu sobrevida e glicemia após hepatectomia 90%.

CONCLUSÃO: Anestesia com isoflurano reduziu tempo de recuperação e hipoglicemia, além de aumentar a sobrevida nas primeiras horas, possibilitando uma janela terapêutica adequada para estudos experimentais.

Descritores: Falência hepática aguda, hepatectomia, isoflurano, Quetamina, Xilazina, Ratos.

Introduction

Acute liver failure (ALF) is a rare clinical condition that develops unpredictably and is potentially fatal due to massive liver necrosis^{1,2}. Despite the advances in clinical management that have been developed in recent decades, the mortality of ALF patients who do not receive transplantation remains high, reaching 70%^{1,3}. One of the main factors that limit the success of ALF patient clinical treatment is an incomplete knowledge of its pathophysiology⁴.

Animal models are important tools for improving our understanding of the pathogenesis of ALF. The progression of the disease, management of complications and mechanisms involved in liver regeneration are also necessary for the development and evaluation of new therapeutic approaches⁵. The anatomical characteristics of the livers of rats and mice enable varying degrees of liver mass resection, depending on the combination of lobes that are removed⁶. The primary model that is used in studies of liver regeneration after resection includes 70% hepatectomy procedures, whereas 90% hepatectomy procedures constitute an experimental model of ALF⁶⁻⁸. The reduction in metabolic capacity following extensive hepatectomy can alter the metabolism of the anesthetics used, which has systemic repercussions and effects on the parameters that are being studied⁹. The aim of the study is to evaluate the effects of two anesthetic regimens on anesthesia recovery, survival rate and blood glucose levels in rats following 90% hepatectomy.

Methods

Animals

Thirty adult male Wistar rats were studied, housed in boxes and subjected to 12-hour light and dark cycles at a controlled temperature of 22°C. The animals were fed a standard diet and received water *ad libitum*. After surgery, they received glucose support via the administration of 20% glucose in their drinking water and standard laboratory chow *ad libitum*. The animals were weighed on a digital scale before the surgical procedure and daily thereafter in order to calculate the doses of ketamine, xylazine and glucose.

Anesthetic regimen

The rats (n=30) were divided into two groups according to their anesthetic regimens: 15 with a ketamine and xylazine combination (KX group) and 15 with isoflurane (ISO group). A combination of ketamine (Cetamin®, Sespo Ltda, Paulinia/SP; 50 mg/kg) and xylazine (Anasedan®, Rhobifarma Ltda, Cotia/SP; 20 mg/kg) was intraperitoneally administered to the KX group. Isoflurane (Forane®, Abbott SA, Buenos Aires; 3%) was inhaled via a calibrated vaporizer to ISO group.

Experimental protocol

After anesthetic induction, rats were placed on an operating table and warmed with a heating pad so as to maintain the animal's body temperature. Partial hepatectomy was performed by a single surgeon, as previously described^{10,11}. With the rat in a supine position, a midline abdominal incision was followed by xyphoid cartilage retraction in order to adequately expose the liver and completely liberate all of the liver ligaments so as to permit an accurate ligation of the pedicle of each lobe. A 90% hepatectomy included the removal of the left lateral (30%), median (40%) and right superior (20%) lobes⁸. Postoperatively, animals were allowed to recover from the anesthesia in cages inside an incubator with a 25°C ambient temperature for 24 hours. During the first hour after the surgery, each rat was closely observed and its recovery time recorded. One hour post operation, six hours post operation and daily thereafter, each animal was administered 2 mL of a glucose solution (50 mg glucose/100 g of body weight) via an intraperitoneal injection. Six hours and daily thereafter until three days after the hepatectomy, each animal's activity was observed, and a drop of blood was obtained from a tail vein for glucose quantification with a glucometer (Accu-Chek Active®, Roche CO, Germany).

The study was approved by Animals Ethics and Research Committee of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil.

Statistical analysis

All blood glucose values are presented as the mean \pm standard deviation (SD) for the selected time points in each group. Statistical differences were assessed using Student's t-test. The survival rate was analyzed via the Kaplan-Meier assay. The survival rates of the two groups were compared via the log-rank test. P-values of less than 0.05 were considered statistically significant.

Results

Thirty rats (average body weight, 342.8 ± 43.4 g) were divided into two groups and underwent 90% hepatectomies, with a mean surgical time of less than 21 minutes (13.7 ± 2.9 minutes).

One hour post surgery, all of the rats that had been anesthetized with ketamine and xylazine were still under anesthesia. In contrast, in the ISO group all of the animals were awake and active. The recovery time from the isoflurane anesthesia was 16.5 ± 8.1 minutes. Immediately after regaining consciousness, rats began to ingest the provided glucose-water and food. Six hours after the hepatectomy, of the 15 rats in the KX group, only four were alive, with one active, two hypoactive and one still under anesthesia. In the group of animals that underwent hepatectomies under isoflurane, 14 rats were alive and active after six hours.

The survival rate after 72 hours was different between the two groups, being significantly higher (log rank=0.0001) in the ISO group (Figure 1). In the KX group, mortalities after 1, 6, 24 and 48 hours were 20.0%, 73.3%, 93.3% and 100%, respectively (Table 1). Hepatectomy under isoflurane resulted in a significantly lower mortality after 6 (6.7%), 24 (40%), 48 (66.7%) and 72 hours (73.6%) (Table 1).

The blood glucose levels at six hours were significantly lower ($P=0.017$) in the KX group (63.0 ± 31.7 mg/dL) (Table 2). In the ISO group, the average blood glucose level was 98.6 ± 21.2 mg/dL. After 24 hours, only one rat from KX group was alive (6.7%), and its blood glucose was 48 mg/dL. In the animals that had been anesthetized with isoflurane, the mean blood glucose

levels were 65.3 ± 18.0 after 24 hours, 78.8 ± 16.3 after 48 hours and 71.5 ± 20.6 mg/dL after 72 hours (Table 2).

Discussion

The development of an experimental model for evaluating ALF therapies requires that at least two criteria be considered: high mortality prior to hepatocyte regeneration and an appropriate therapeutic window¹². The liver regeneration that occurs after hepatectomy rapidly replaces the hepatocytic mass removed, limiting ALF to three or four days^{10,13,14}. During this period, in animal models of ALF, there should be a large number of deaths, which is characteristic of ALF; however, the mortality rate in the early hours cannot be excessive, or else it shortens the therapeutic window¹². The anesthetic regimen and the prevention of severe hypoglycemia are among the primary determinants of early mortality in animals that have been subjected to partial hepatectomy.

Defining the anesthetic regimen for surgical procedures in animals can be a challenge. In experimental procedures that involve liver resection or transplantation, anesthesia will ideally have a minimal effect on liver function⁹. The combination of intraperitoneal ketamine and xylazine administration is the usual anesthesia for laboratory animals, producing an anesthetic effect for at least one hour¹⁵⁻¹⁷, followed by a two- to four-hour period of sleep¹⁸.

In several recent studies on liver regeneration using partial hepatectomy (70%) models, a combination of ketamine and xylazine was used as the anesthetic regimen²⁵⁻²⁷. The experience of our group (data not shown) has confirmed the possibility of using ketamine and xylazine as an anesthetic for performing partial (70% and 85%) hepatectomy in rats; however, increasing the liver resection to 90% renders this regimen inadequate. Ketamine and xylazine are extensively metabolized by liver mitochondrial enzymes, and their metabolites are excreted in the urine^{9,21}. In our study, the decrease in the remaining liver mass probably led to a reduction in the hepatic metabolic capacity for anesthetics and carbohydrates. The deepening of the anesthetic plane, causing cardiorespiratory depression and severe hypoglycemia, were possibly the determinants

of death within the first six hours in the group of rats that had been anesthetized with ketamine and xylazine. In contrast, the shorter recovery from anesthesia with isoflurane permitted the animals to awaken within minutes. In the evaluation during the first hour after surgery, all of the rats were awake and active.

Isoflurane is an inhalational halogenated methyl ethyl ether anesthetic with a high molecular stability. Thus, less than 0.2% of the inhaled dose is metabolized because it is almost completely eliminated in the exhaled air^{19, 20}. Its induction and recovery times are very fast, and its depth can be adjusted easily and quickly¹⁸. It is considered to be the ideal anesthetic for studies of metabolism and toxicity due to its minimal systemic metabolism, the small effect it has on liver enzymes and the reduced potential risk of liver and kidney damage that arise from its use¹⁸⁻²¹; however, isoflurane anesthesia has been used in a few studies of models of extended hepatectomy in murine rodents^{8, 22-24}. The disadvantages of isoflurane are related to the need for enhanced anesthetic monitoring, particularly during induction, by trained personnel and with specialized equipment, which results in increased research costs²¹.

The observed increased liver resection and reduced survival rate^{10,11,28} were accompanied by a reduction in blood glucose levels in the early hours¹⁰. The liver is the key organ in the production, storage and distribution of nutrients and energy. The loss of hepatocytic mass during ALF is accompanied by reductions in glycogen stores, the capacity for gluconeogenesis and the ability to maintain blood glucose during fasting²⁹. The increase in early mortality that is associated with larger resections can be partially reduced by avoiding severe early hypoglycemia by administering 20% glucose in the drinking water^{11,30,31}. In our study, the prolonged recovery time of ketamine and xylazine anesthesia rendered this procedure ineffective because only 20% of the animals had awakened from anesthesia six hours after the end of the procedure. In the group that had been anesthetized with isoflurane, the intake of water with glucose was possible immediately after the surgery, there was no hypoglycemia in the first hours after surgery and the survival rate after six hours was high (93.3%).

Supplementing glucose via drinking water may be insufficient for preventing severe hypoglycemia in hepatectomies of greater than 90% ¹¹. The strict monitoring of blood glucose and correcting hypoglycemia via the intraperitoneal administration of 5% glucose (in addition to adding it to the water) in rats with 90% resections can increase the survival rate to 80% ^{13,32}. In our study, the prophylactic administration of intraperitoneal glucose to rats that underwent 90% hepatectomy with ketamine and xylazine did not prevent hypoglycemia across the entire monitoring period and did not impede the progression to death in 73.3% of the animals.

Although ketamine and xylazine present technical and economic advantages in comparison to isoflurane ⁹ and are widely used in experiments with rodents ¹⁵⁻¹⁷, their pharmacological characteristics limit their use in models of 90% hepatectomy. Inhalation anesthesia, particularly isoflurane, demands minimal hepatic metabolism, enables better anesthetic control and should be the preferred anesthetic in murine models of ALF.

Conclusion

Isoflurane anesthesia reduced the recovery time and incidence of hypoglycemia and increased the survival rate in the early hours, providing a therapeutic window that is suitable for experimental studies.

Acknowledgments

Research supported by Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos – Hospital de Clínicas de Porto Alegre, CAPES, and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). C. Uribe and U. Matte are recipients of fellowships from CNPq.

References

1. Sass DA, Shakil AO. Fulminant hepatic failure. *Liver Transpl* 2005; 11: 594-605.
2. Rutherford A, Chung RT. Acute liver failure: mechanisms of hepatocyte injury and regeneration. *Semin Liver Dis* 2008; 28: 167-174.
3. Lee WS, McKiernan P, Kelly DA. Etiology, outcome and prognostic indicators of childhood fulminant hepatic failure in the United Kingdom. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2005; 40: 575-581.
4. Liu Q. Role of cytokines in the pathophysiology of acute-on-chronic liver failure. *Blood Purif* 2009; 28: 331-341.
5. Belanger M, Butterworth RF. Acute liver failure: a critical appraisal of available animal models. *Metab Brain Dis* 2005; 20: 409-423.
6. Aller MA, Lorente L, Prieto I, Moquillaza LM, Arias J. Hepatectomies in the rat: A look at the caudate process through microsurgery. *Dig Liver Dis* 2009; 41: 695-699.
7. Martins PN, Theruvath TP, Neuhaus P. Rodent models of partial hepatectomies. *Liver Int* 2008; 28: 3-11.
8. Madrahimov N, Dirsch O, Broelsch C, Dahmen U. Marginal hepatectomy in the rat: from anatomy to surgery. *Ann Surg* 2006; 244: 89-98.
9. He S, Atkinson C, Qiao F, Chen X, Tomlinson S. Ketamine-xylazine-acepromazine compared with isoflurane for anesthesia during liver transplantation in rodents. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 2010; 49: 45-51.
10. Panis Y, McMullan DM, Emond JC. Progressive necrosis after hepatectomy and the pathophysiology of liver failure after massive resection. *Surgery* 1997; 121: 142-149.
11. Emond J, Capron-Laudereau M, Meriggi F, Bernuau J, Reynes M, Houssin D. Extent of hepatectomy in the rat. Evaluation of basal conditions and effect of therapy. *Eur Surg Res* 1989; 21: 251-259.
12. Terblanche J, Hickman R. Animal models of fulminant hepatic failure. *Dig Dis Sci* 1991; 36: 770-774.
13. Roger V, Balladur P, Honiger J, Baudrimont M, Delelo R, Calmus Y, et al. A good model of experimental acute hepatic failure: 95% hepatectomy; treatment by transplantation of hepatocytes. *Transplant Proc* 1995; 27: 2504-2505.
14. Ninomiya M, Shirabe K, Terashi T, Ijichi H, Yonemura Y, Harada N, et al. Deceleration of regenerative response improves the outcome of rat with massive hepatectomy. *Am J Transplant* 2010; 10: 1580-1587.

15. Remie R. Anaesthesia in Laboratory Animals. In: Andersen ML, Tufik S (Editors), *Animal Models as Tools in Ethical Biomedical Research*. 1st edn. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo; 2010. p 417-432.
16. Stokes EL, Flecknell PA, Richardson CA. Reported analgesic and anaesthetic administration to rodents undergoing experimental surgical procedures. *Lab Anim* 2009; 43: 149-154.
17. Richardson CA, Flecknell PA. Anaesthesia and post-operative analgesia following experimental surgery in laboratory rodents: are we making progress? *Altern Lab Anim* 2005; 33: 119-127.
18. Flecknell PA. *Laboratoy Animal Anaesthesia*. 2nd edn. London: Academic Press; 1996.
19. Schüttler J, Schwilden H, Bovill JG. Inhalation Anaesthesia: From Diethyl Ether to Xenon. In: *Modern Anesthetics*: Springer Berlin Heidelberg; 2008. p 121-142.
20. Brunson DB. Pharmacology of Inhalation Anesthetics. In: Brown MJ, Danneman PJ, Karas AZ (Editors), *Anesthesia and Analgesia in Laboratory Animals*. 2nd edn. London: Academic Press; 2008. p 83-95.
21. Gaertner DJ, Hallman TM, Hankenson FC, Batchelder MA. Anesthesia and Analgesia for Laboratory Rodents. In: Fish RE, Brown MJ, Danneman PJ, Karas AZ (Editors), *Anesthesia and Analgesia in Laboratory Animals*. 2nd edn. London: Academic Press; 2008. p 239-297.
22. Sarac TP, Sax HC, Doerr R, Yuksel U, Pulli R, Caruana J. Preoperative fasting improves survival after 90% hepatectomy. *Arch Surg* 1994; 129: 729-733.
23. Deng M, Huang H, Jin H, Dirsch O, Dahmen U. The anti-proliferative side effects of AEE788, a tyrosine kinase inhibitor blocking both EGF- and VEGF-receptor, are liver-size-dependent after partial hepatectomy in rats. *Invest New Drugs* 2010 (in press).
24. Vanheule E, Fan YD, Van Huysse J, Meester D, Olievier K, Praet M, et al. Expression of placental growth factor in regenerating livers after partial hepatectomy in the rat. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2011; 23: 66-75.
25. Kirimlioglu H, Kirimlioglu V, Yilmaz S, Coban S, Turkmen E, Ara C. Liver pathology and cell proliferation after calcineurin inhibitors and antiproliferative drugs following partial hepatectomy in rats. *Transplant Proc* 2006; 38: 622-626.
26. Okay E, Karadenizli A, Muezzinoglu B, Zeybek U, Arzu Ergen H, Isbir T. N-acetylcysteine attenuates bacterial translocation after partial hepatectomy in rats. *J Surg Res* 2005; 127: 164-170.
27. Karaman A, Kirimlioglu H, Tas E, Karadag N, Gulsul C, Fadillioglu E, et al. Effect of leflunomide on liver regeneration after partial hepatectomy in rats. *Pediatr Surg Int* 2010; 26: 219-226.

28. Weinbren K, Dowling F. Hypoglycaemia and the delayed proliferative response after subtotal hepatectomy. *Br J Exp Pathol* 1972; 53: 78-84.
29. Cochran JB, Losek JD. Acute liver failure in children. *Pediatr Emerg Care* 2007; 23: 129-135.
30. Gaub J, Iversen J. Rat liver regeneration after 90% partial hepatectomy. *Hepatology* 1984; 4: 902-904.
31. Caruana JA, Whalen DA, Jr., Anthony WP, Sunby CR, Ciechoski MP. Paradoxical effects of glucose feeding on liver regeneration and survival after partial hepatectomy. *Endocr Res* 1986; 12: 147-156.
32. He Y, Zhou J, Dou KF, Chen Y. A rat model for acute hepatic failure. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2003; 2: 423-425.

Table 1. Survival after hepatectomy depending on the anesthetic regimen in 90% hepatectomized rats.

Time after PH	Ketamine and xylazine				P- value
	group		Isoflurane group		
	Hours	N (15)	%	N (15)	
1	12	80.0	15	100.0	0.0726
6	4	26.7	14	93.3	0.0002
24	1	6.7	9	60.0	0.0001
48	0	0.0	5	33.3	0.0001
72	0	0.0	4	26.7	0.0001

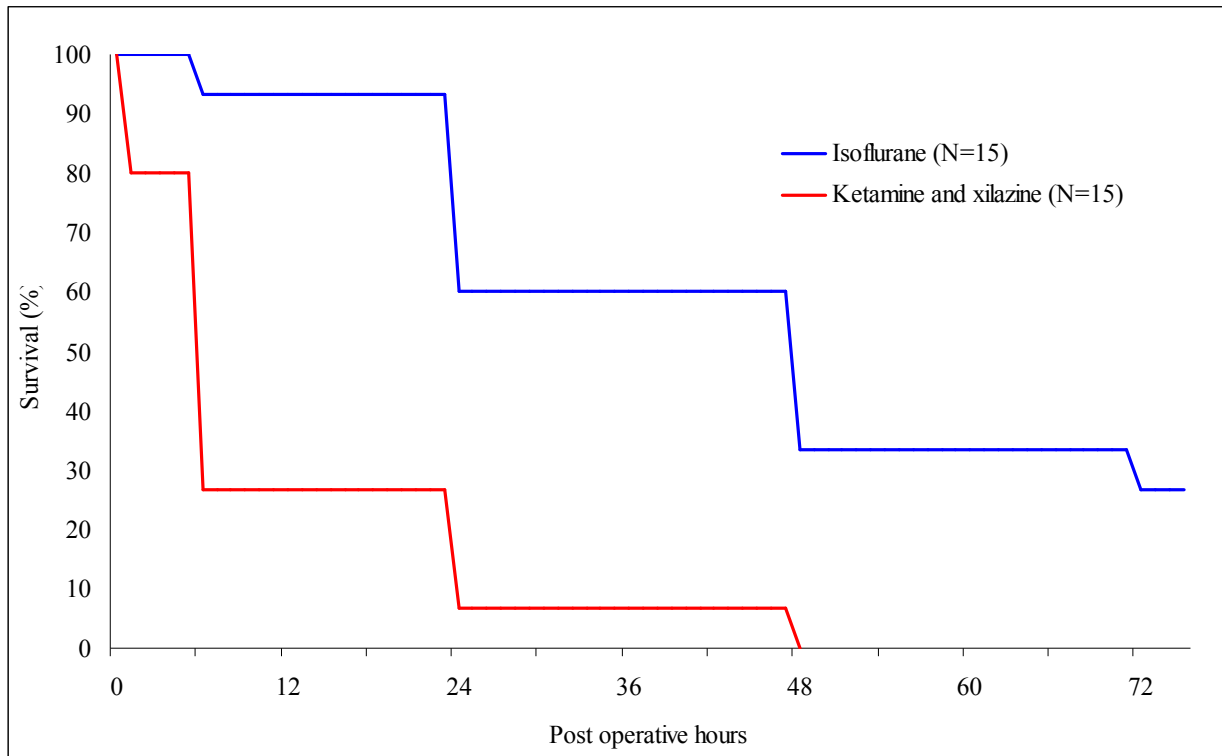
PH: partial hepatectomy.

Table 2. Changes in blood glucose (mg/dL) after a 90% hepatectomy in rats depending on the anesthetic regimen.

Time after PH	Ketamine and xylazine group		Isoflurane group		P-value
	Hours	N	Mean±SD	N	
6	4	63.0 ±31.7	14	98.6 ±21.2	0.017
24	1	48.0	9	65.3 ±18.0	
48	0	-	5	78.8 ±16.3	
72	0	-	4	71.5 ±20.6	

PH: partial hepatectomy; SD: standard deviation.

Figure 1. Spontaneous survival depending on the anesthetic regime in 90% hepatectomized rats. Log rank=0.0001.



Anexo 5

Dados brutos – Fase 1 – Hepatectomia de 85%

Identificação	Peso corporal (g)	Peso dos lobos retirados (g)	Razão peso dos lobos retirados/peso corporal (%)	Tempo de cirurgia (min)	Suplementação de glicose	Glicose antes da hepatectomia (mg/dL)	Lactato antes da hepatectomia (mmol/L)	Vivo 1 hora	Atividade 1 hora	Recuperação anestésica	Glicose 1 hora (mg/dL)	Lactato 1 hora (mmol/L)	Vivo 6 horas	Atividade 6 horas	Glicose 6 horas (mg/dL)	Lactato 6 horas (mmol/L)	Vivo 24 horas	Glicose 24 horas (mg/dL)	Lactato 24 horas (mmol/L)	Vivo 48 horas	Glicose 48 horas (mg/dL)	Lactato 48 horas (mmol/L)	Vivo 72 horas	Peso corporal 72 horas (g)	Glicose 72 horas (mg/dL)	Lactato 72 horas (mmol/L)
1	342	8,23	2,41	16	N	147	3,3	V	Sedado	N	153	2,3	V	Ativo	92	3,9	V	92	4,5	V	97	4,3	V	291	113	2,7
2	360	10,29	2,86	18	N	178	3,0	V	NR	NA	208	1,8	V	Hipoativo	62	6,5	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	NA
3	372	10,61	2,85	13	N	210	1,8	V	Sedado	N	217	2,1	V	Ativo	97	4,3	V	23	4,8	M	NA	NA	M	NA	NA	NA
4	311	9,04	2,91	14	N	201	3,2	V	Sedado	N	110	1,8	V	Ativo	36	6,5	V	20	4,9	M	NA	NA	M	NA	NA	NA
5	314	9,75	3,11	12	N	176	3,8	V	Sedado	N	204	1,8	V	Ativo	148	5,0	V	67	4,1	V	100	2,9	V	265	95	2,4
6	292	9,96	3,41	13	N	202	2,9	V	Sedado	N	144	3,0	V	Hipoativo	25	4,7	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	NA
7	285	9,91	3,48	14	N	226	2,8	V	NR	NA	222	1,6	V	Hipoativo	132	4,7	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	NA
8	375	9,87	2,63	14	S	201	2,6	V	Sedado	N	216	1,8	V	Ativo	136	3,9	V	108	3,1	V	88	3,3	V	328	104	6,2
9	385	9,07	2,36	14	S	193	1,0	V	Sedado	N	227	1,2	V	Ativo	140	4,7	V	94	3,1	V	108	3,4	V	321	109	3,0
10	372	10,46	2,81	13	S	268	2,4	V	Sedado	N	231	2,2	V	Ativo	255	5,9	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	NA
11	312	8,07	2,59	13	S	162	2,9	V	Sedado	N	134	3,3	M	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	NA
12	353	12,64	3,58	10	S	261	2,2	V	Hipoativo	S	268	2,1	V	Ativo	135	3,6	V	72	4,2	V	104	4,5	V	347	118	2,5
13	312	8,18	2,62	12	S	178	2,4	V	Sedado	N	195	2,3	V	Ativo	97	4,9	V	68	5,4	M	NA	NA	M	NA	NA	NA
14	348	11,24	3,23	11	S	267	1,1	V	Sedado	N	240	1,7	V	Hipoativo	240	1,7	V	77	4,7	V	152	3,2	V	329	88	3,1
15	375	NR	NA	12	S	188	2,3	V	Sedado	N	194	2,2	V	Hipoativo	101	8,0	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	NA
16	330	8,29	2,51	13	S	196	3,3	V	Sedado	N	221	3,6	V	Ativo	78	7,5	V	30	3,9	M	NA	NA	M	NA	NA	NA
17	409	11,14	2,72	13	N	142	3,1	V	Sedado	N	162	1,9	V	Ativo	91	4,1	V	69	4,3	V	98	3,8	V	336	99	3,3
18	317	7,30	2,30	11	S	169	3,4	V	NR	NA	200	2,6	V	Ativo	129	3,7	V	111	2,5	V	98	3,9	V	264	121	4,1
19	332	9,55	2,88	10	N	178	2,2	V	Sedado	N	201	2,5	V	Ativo	89	4,4	V	86	3,4	V	114	2,1	V	286	120	3,0
20	446	12,49	2,80	9	S	171	3,0	V	Sedado	N	170	2,3	V	Ativo	54	4,3	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	NA
21	409	10,19	2,49	10	N	164	2,6	V	Sedado	N	175	1,7	V	Hipoativo	81	4,3	V	87	3,0	V	116	2,0	V	353	121	2,5
22	281	8,83	3,14	12	N	223	2,1	V	Sedado	N	209	2,7	V	Hipoativo	48	2,7	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	NA
23	265	8,07	3,05	12	N	174	3,1	V	Sedado	N	209	2,5	V	Hipoativo	94	2,1	V	106	3,7	V	113	2,2	V	241	120	2,4
24	355	10,45	2,94	12	S	151	4,3	V	Sedado	N	153	2,2	V	Ativo	99	1,0	V	105	2,7	V	99	3,0	V	303	106	2,2

NA=não se aplica; NR=não realizado; M=morto; V=vivo. .

Dados brutos – Fase 1 – Hepatectomia de 85% (continuação)

Identificação	Tempo de sobrevida (h)	Peso dos lobos remanescentes (g)	Razão peso dos lobos remanescentes em relação ao peso corporal 72 horas (%)
1	95	9,31	3,20
2	23	NA	NA
3	47	NA	NA
4	47	NA	NA
5	95	6,64	2,51
6	23	NA	NA
7	23	NA	NA
8	95	6,21	1,89
9	95	9,37	2,92
10	23	NA	NA
11	5	NA	NA
12	95	9,76	2,81
13	47	NA	NA
14	95	8,24	2,50
15	23	NA	NA
16	47	NA	NA
17	95	9,31	2,77
18	95	7,45	2,82
19	95	8,74	3,06
20	23	NA	NA
21	95	10,65	3,02
22	23	NA	NA
23	95	9,28	3,85
24	95	10,11	3,34

NA=não se aplica; NR=não realizado; M=morto; V=vivo.

Dados brutos – Fase 1 – Hepatectomia de 90%

Identificação	Regime anestésico	Peso corporal antes da hepatectomia (g)	Tempo de cirurgia (min)	Peso dos lobos retirados (g)	Razão peso dos lobos retirados/peso corporal (%)	Glicose antes da hepatectomia (mg/dL)	Lactato antes da hepatectomia (mmol/L)	Vivo 1 hora	Atividade 1 hora	Recuperação anestésica	Tempo de recuperação anestésica (min)	Vivo 6 horas	Atividade 6 horas	Glicose 6 horas (mg/dL)	Lactato 6 horas (mmol/L)	Vivo 24 horas	Glicose 24 horas (mg/dL)	Lactato 24 horas (mmol/L)
1	Ketamina e xilazina	370	21	8,81	2,38	251	3,9	V	Sedado	N	NA	V	Ativo	65	4,1	M	NA	NA
2	Ketamina e xilazina	372	12	10,64	2,86	220	3,3	M	NA	N	NA	M	NA	NA	NA	M	NA	NA
3	Ketamina e xilazina	344	10	10,00	2,91	207	2,0	V	Sedado	N	NA	M	NA	NA	NA	M	NA	NA
4	Ketamina e xilazina	405	14	10,25	2,53	217	1,7	V	Sedado	N	NA	V	Sedado	106	2,4	V	48	3,3
5	Ketamina e xilazina	402	10	11,69	2,91	185	1,3	V	Sedado	N	NA	V	Hipoativo	49	8,1	M	NA	NA
6	Ketamina e xilazina	402	13	8,59	2,14	146	4,3	V	Sedado	N	NA	M	NA	NA	NA	M	NA	NA
7	Ketamina e xilazina	406	13	9,49	2,34	182	3,0	V	Sedado	N	NA	M	NA	NA	NA	M	NA	NA
8	Ketamina e xilazina	392	12	9,14	2,33	244	1,8	V	Sedado	N	NA	M	NA	NA	NA	M	NA	NA
9	Ketamina e xilazina	406	11	8,95	2,20	233	2,2	V	Sedado	N	NA	M	NA	NA	NA	M	NA	NA
10	Ketamina e xilazina	280	9	8,99	3,21	221	3,3	V	Sedado	N	NA	M	NA	NA	NA	M	NA	NA
11	Ketamina e xilazina	273	11	8,86	3,25	196	4,1	V	Sedado	N	NA	V	Hipoativo	32	3,3	M	NA	NA
12	Ketamina e xilazina	268	10	7,45	2,78	175	3,1	V	Sedado	N	NA	M	NA	NA	NA	M	NA	NA
13	Ketamina e xilazina	291	10	8,17	2,81	165	2,6	V	Sedado	N	NA	M	NA	NA	NA	M	NA	NA
14	Ketamina e xilazina	329	12	10,15	3,09	236	1,9	M	NA	N	NA	M	NA	NA	NA	M	NA	NA
15	Ketamina e xilazina	292	14	7,28	2,49	176	3,0	M	NA	N	NA	M	NA	NA	NA	M	NA	NA
16	Isoflurano	303	18	8,23	2,71	107	4,5	V	Ativo	S	16	V	Ativo	68	4,9	M	NA	NA
17	Isoflurano	345	14	8,57	2,48	164	3,2	V	Ativo	S	4	V	Ativo	110	3,9	M	NA	NA
18	Isoflurano	350	15	10,07	2,88	153	1,0	V	Ativo	S	32	V	Ativo	79	5,0	M	NA	NA
19	Isoflurano	298	12	8,36	2,81	123	3,6	V	Ativo	S	11	V	Ativo	117	3,8	V	75	3,7
20	Isoflurano	326	17	7,28	2,23	123	NR	V	Ativo	S	15	V	Ativo	112	NA	M	NA	NA
21	Isoflurano	367	15	7,24	1,97	108	NR	V	Ativo	S	15	V	Ativo	96	NA	V	69	NR
22	Isoflurano	341	13	6,52	1,91	112	NR	V	Ativo	S	13	V	Ativo	106	NA	V	101	NR
23	Isoflurano	328	18	7,42	2,26	157	NR	V	Ativo	S	30	V	Ativo	84	NA	V	57	NR
24	Isoflurano	321	18	9,44	2,94	128	NR	V	Ativo	S	25	M	NA	NA	NA	M	NA	NA
25	Isoflurano	304	15	6,56	2,16	115	4,3	V	Ativo	S	11	V	Ativo	72	2,9	V	59	14,2
26	Isoflurano	305	16	6,20	2,03	102	8,1	V	Ativo	S	24	V	Ativo	113	3,0	V	62	9,7
27	Isoflurano	346	17	6,59	1,91	103	5,1	V	Ativo	S	20	V	Ativo	115	2,2	V	35	7,9
28	Isoflurano	352	14	8,18	2,32	113	4,1	V	Ativo	S	12	V	Ativo	142	2,3	V	74	8,6
29	Isoflurano	364	15	8,49	2,34	132	6,1	V	Ativo	S	13	V	Ativo	78	5,2	V	56	6,9
30	Isoflurano	400	13	11,35	2,84	116	4,5	V	Ativo	S	7	V	Ativo	88	6,9	M	NA	NA

NA=não se aplica; NR=não realizado; M=morto; V=vivo.

Dados brutos – Fase 1 – Hepatectomia de 90% (continuação)

Identificação	Vivo 48 horas	Glicose 48 horas (mg/dL)	Lactato 48 horas (mmol/L)	Vivo 72 horas	Glicose 72 horas (mg/dL)	Vivo 96 horas	Glicose 96 horas (mg/dL)	Lactato 96 horas (mmol/L)	Vivo 120 horas	Glicose 120 horas (mg/dL)	Lactato 120 horas (mmol/L)	Vivo 144 horas	Glicose 144 horas (mg/dL)	Lactato 144 horas (mmol/L)	Vivo 168 horas	Glicose 168 horas (mg/dL)	Lactato 168 horas (mmol/L)	Vivo 192 horas	Vivo 216 horas	Vivo 240 horas	Peso corporal 240 horas (g)	Glicose 240 horas (mg/dL)	Lactato 240 horas (mmol/L)	Tempo de sobrevivência (h)	Peso dos lobos remanescentes (g)	lobos remanescentes em relação ao peso corporal 72
1	M	NA	NA	M	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	M	M	M	NA	NA	NA	23	NA	NA
2	M	NA	NA	M	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	M	M	M	NA	NA	NA	1	NA	NA
3	M	NA	NA	M	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	M	M	M	NA	NA	NA	5	NA	NA
4	M	NA	NA	M	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	M	M	M	NA	NA	NA	47	NA	NA
5	M	NA	NA	M	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	M	M	M	NA	NA	NA	23	NA	NA
6	M	NA	NA	M	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	M	M	M	NA	NA	NA	5	NA	NA
7	M	NA	NA	M	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	M	M	M	NA	NA	NA	5	NA	NA
8	M	NA	NA	M	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	M	M	M	NA	NA	NA	5	NA	NA
9	M	NA	NA	M	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	M	M	M	NA	NA	NA	5	NA	NA
10	M	NA	NA	M	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	M	M	M	NA	NA	NA	5	NA	NA
11	M	NA	NA	M	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	M	M	M	NA	NA	NA	23	NA	NA
12	M	NA	NA	M	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	M	M	M	NA	NA	NA	5	NA	NA
13	M	NA	NA	M	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	M	M	M	NA	NA	NA	5	NA	NA
14	M	NA	NA	M	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	M	M	M	NA	NA	NA	1	NA	NA
15	M	NA	NA	M	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	M	M	M	NA	NA	NA	1	NA	NA
16	M	NA	NA	M	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	M	M	M	NA	NA	NA	23	NA	NA
17	M	NA	NA	M	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	M	M	M	NA	NA	NA	23	NA	NA
18	M	NA	NA	M	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	M	M	M	NA	NA	NA	23	NA	NA
19	V	79	4,7	V	79	V	93	4,7	V	90	3,5	V	180	3,8	V	121	2,8	V	V	V	230	109	NA	240	4,45	1,94
20	M	NA	NA	M	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	M	M	M	NA	NA	NA	23	NA	NA
21	M	NA	NA	M	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	M	M	M	NA	NA	NA	47	NA	NA
22	V	53	NR	M	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	M	M	M	NA	NA	NA	71	NA	NA
23	M	NA	NA	M	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	M	M	M	NA	NA	NA	47	NA	NA
24	M	NA	NA	M	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	M	M	M	NA	NA	NA	5	NA	NA
25	M	NA	NA	M	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	M	M	M	NA	NA	NA	47	NA	NA
26	V	98	6,1	V	68	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	M	M	M	NA	NA	NA	95	NA	NA
27	M	NA	NA	M	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	M	M	M	NA	NA	NA	47	NA	NA
28	V	81	5,2	V	45	V	44	5,2	V	73	6,1	M	NA	NA	M	NA	NA	M	M	M	NA	NA	NA	143	NA	NA
29	V	83	5,8	V	94	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	M	M	M	NA	NA	NA	95	NA	NA
30	M	NA	NA	M	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	M	M	M	NA	NA	NA	23	NA	NA

NA=não se aplica; NR=não realizado; M=morto; V=vivo.

Dados brutos – Fase 1 – Hepatectomia de 90% (continuação)

Identificação	Vivo 240 horas	Peso corporal 240 horas (g)	Glicose 240 horas (mg/dL)	Lactato 240 horas (mmol/L)	Tempo de sobrevida (h)	Peso dos lobos remanescentes (g)	Razão peso dos lobos remanescentes /peso corporal 72 horas (%)
1	M	NA	NA	NA	23	NA	NA
2	M	NA	NA	NA	1	NA	NA
3	M	NA	NA	NA	5	NA	NA
4	M	NA	NA	NA	47	NA	NA
5	M	NA	NA	NA	23	NA	NA
6	M	NA	NA	NA	5	NA	NA
7	M	NA	NA	NA	5	NA	NA
8	M	NA	NA	NA	5	NA	NA
9	M	NA	NA	NA	5	NA	NA
10	M	NA	NA	NA	5	NA	NA
11	M	NA	NA	NA	23	NA	NA
12	M	NA	NA	NA	5	NA	NA
13	M	NA	NA	NA	5	NA	NA
14	M	NA	NA	NA	1	NA	NA
15	M	NA	NA	NA	1	NA	NA
16	M	NA	NA	NA	23	NA	NA
17	M	NA	NA	NA	23	NA	NA
18	M	NA	NA	NA	23	NA	NA
19	V	230	109	NA	240	4,45	1,94
20	M	NA	NA	NA	23	NA	NA
21	M	NA	NA	NA	47	NA	NA
22	M	NA	NA	NA	71	NA	NA
23	M	NA	NA	NA	47	NA	NA
24	M	NA	NA	NA	5	NA	NA
25	M	NA	NA	NA	47	NA	NA
26	M	NA	NA	NA	95	NA	NA
27	M	NA	NA	NA	47	NA	NA
28	M	NA	NA	NA	143	NA	NA
29	M	NA	NA	NA	95	NA	NA
30	M	NA	NA	NA	23	NA	NA

NA=não se aplica; NR=não realizado; M=morto; V=vivo.

Dados brutos – Fase 2

Identificação	Tipo de célula	Número de células por animal	Peso corporal antes da hepatectomia (g)	Tempo de cirurgia (min)	Peso dos lobos retirados (g)	Razão peso dos lobos retirados/peso corporal (%)	Glicose antes da hepatectomia (mg/dL)	Lactato antes da hepatectomia (mmol/L)	Vivo 1 hora	Vivo 6 horas	Glicose 6 horas (mg/dL)	Lactato 6 horas (mmol/L)	Vivo 24 horas	Glicose 24 horas (mg/dL)	Lactato 24 horas (mmol/L)	Vivo 48 horas	Glicose 48 horas (mg/dL)	Lactato 48 horas (mmol/L)	Vivo 72 horas	Glicose 72 horas (mg/dL)	Lactato 72 horas (mmol/L)
1	HepG2	5 x10 ⁷	196	16	4,78	2,43	112	7,0	V	V	104	2,7	V	142	5,6	V	113	5,2	V	89	5,5
2	HepG2	5 x10 ⁷	179	13	4,71	2,63	118	3,3	V	V	92	2,8	V	80	3,7	V	80	5,0	V	106	4,6
3	Sem células	0	303	18	8,23	2,71	107	4,5	V	V	68	4,9	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA
4	HepG2	5 x10 ⁷	358	16	10,14	2,84	168	2,9	V	V	145	4,1	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA
5	HepG2	5 x10 ⁷	346	16	8,68	2,51	125	2,1	V	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA
6	HepG2	5 x10 ⁷	320	16	8,13	2,54	112	4,5	V	V	89	3,0	V	42	6,4	M	NA	NA	M	NA	NA
7	HepG2	5 x10 ⁷	381	13	10,17	2,67	130	2,3	V	V	78	3,9	V	82	7,3	V	65	6,9	V	66	6,7
8	HepG2	5 x10 ⁷	322	13	9,26	2,88	143	3,1	V	V	59	3,9	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA
9	HepG2	5 x10 ⁷	353	12	10,31	2,92	118	4,9	V	V	89	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA
10	Sem células	0	345	14	8,57	2,48	164	3,2	V	V	110	3,9	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA
11	Sem células	0	350	15	10,07	2,88	153	1,0	V	V	79	5,0	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA
12	Sem células	0	298	12	8,36	2,81	123	3,6	V	V	117	3,8	V	75	3,7	V	79	4,7	V	79	4,3
13	Sem células	0	326	17	7,28	2,23	123	NR	V	V	112	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA
14	Sem células	0	367	15	7,24	1,97	108	NR	V	V	96	NA	V	69	NR	M	NA	NA	M	NA	NA
15	Sem células	0	341	13	6,52	1,91	112	NR	V	V	106	NA	V	101	NR	V	53	NR	M	NA	NA
16	Sem células	0	328	18	7,42	2,26	157	NR	V	V	84	NA	V	57	NR	M	NA	NA	M	NA	NA
17	Sem células	0	321	18	9,44	2,94	128	NR	V	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA
18	Sem células	0	304	15	6,56	2,16	115	4,3	V	V	72	2,9	V	59	14,2	M	NA	NA	M	NA	NA
19	Sem células	0	305	16	6,20	2,03	102	8,1	V	V	113	3,0	V	62	9,7	V	98	6,1	V	68	6,1
20	Sem células	0	346	17	6,59	1,91	103	5,1	V	V	115	2,2	V	35	7,9	M	NA	NA	M	NA	NA
21	Sem células	0	352	14	8,18	2,32	113	4,1	V	V	142	2,3	V	74	8,6	V	81	5,2	V	45	5,7
22	Fração mononuclear	1x 10 ⁶	222	14	6,79	3,06	119	3,9	V	V	85	3,4	V	43	9,1	M	NA	NA	M	NA	NA
23	Fração mononuclear	1x 10 ⁶	289	15	8,46	2,92	113	3,7	V	V	114	2,9	V	87	5,5	V	58	5,8	V	100	3,9
24	Fração mononuclear	1x 10 ⁶	232	16	7,20	3,10	103	3,7	V	V	83	2,0	V	72	6,2	V	31	10,9	M	NA	NA
25	Fração mononuclear	1x 10 ⁶	266	18	7,94	2,99	130	4,4	V	V	58	5,9	V	71	6,3	V	95	3,8	V	82	1,8
26	Fração mononuclear	1x 10 ⁶	266	13	8,79	3,30	105	4,8	V	V	57	5,3	V	N	N	M	NA	NA	M	NA	NA
27	Fração mononuclear	1x 10 ⁶	248	15	6,97	2,82	100	3,0	V	V	99	3,3	V	49	8,4	V	33	5,7	M	NA	NA
28	Fração mononuclear	1x 10 ⁶	261	14	6,94	2,66	104	4,3	V	V	68	3,0	V	72	5,6	V	79	4,8	V	99	3,6
29	Fração mononuclear	1x 10 ⁶	290	15	8,40	2,90	139	2,5	V	V	116	2,6	V	132	4,2	V	70	8,0	V	96	3,7
30	Fração mononuclear	1x 10 ⁶	308	18	9,95	3,23	109	3,7	V	V	94	2,8	V	54	6,0	V	81	4,2	V	96	4,9
31	Fração mononuclear	1x 10 ⁶	296	16	8,11	2,74	106	2,8	V	V	101	3,1	V	111	4,1	V	72	4,3	V	112	3,1
32	Fração mononuclear	1x 10 ⁶	336	13	9,17	2,73	153	3,4	V	V	114	4,1	V	164	4,9	V	130	4,5	V	139	3,9

NA=não se aplica; NR=não realizado; M=morto; V=vivo.

Dados brutos – Fase 2 (continuação)

Identificação	Tipo de célula	Número de células por animal	Peso corporal antes da hepatectomia (g)	Tempo de cirurgia (min)	Peso dos lobos retirados (g)	Razão peso dos lobos retirados/peso corporal (%)	Glicose antes da hepatectomia (mg/dL)	Lactato antes da hepatectomia (mmol/L)	Vivo 1 hora	Vivo 6 horas	Glicose 6 horas (mg/dL)	Lactato 6 horas (mmol/L)	Vivo 24 horas	Glicose 24 horas (mg/dL)	Lactato 24 horas (mmol/L)	Vivo 48 horas	Glicose 48 horas (mg/dL)	Lactato 48 horas (mmol/L)	Vivo 72 horas	Glicose 72 horas (mg/dL)	Lactato 72 horas (mmol/L)
33	Fração mononuclear	1x 10 ⁶	304	13	7,81	2,57	122	4,4	V	V	119	3,2	V	67	11,0	M	NA	NA	M	NA	NA
34	Fração mononuclear	1x 10 ⁶	323	12	9,49	2,94	129	4,3	V	V	104	4,1	V	115	5,2	V	80	6,7	V	126	4,1
35	Fração mononuclear	1x 10 ⁶	345	11	9,40	2,72	146	3,8	V	V	92	4,0	V	114	5,4	V	61	9,2	M	NA	NA
36	Sem células	0	364	15	8,49	2,34	132	6,1	V	V	78	5,2	V	56	6,9	V	83	5,8	V	94	4,5
37	Sem células	0	400	13	11,35	2,84	116	4,5	V	V	88	6,9	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA
38	Fração mononuclear	3x 10 ⁷	279	17	9,22	3,30	126	3,8	V	V	50	5,7	V	118	VER	M	NA	NA	M	NA	NA
39	Fração mononuclear	3x 10 ⁷	304	15	8,51	2,80	131	4,3	V	V	65	3,5	V	73	4,1	V	88	4,0	V	97	2,5
40	Fração mononuclear	3x 10 ⁷	283	15	8,30	2,93	130	4,1	V	V	72	3,4	V	119	4,1	V	93	3,4	V	87	2,2
41	Fração mononuclear	3x 10 ⁷	310	14	9,52	3,07	101	4,5	V	V	67	4,3	V	28	7,2	M	NA	NA	M	NA	NA
42	Fração mononuclear	3x 10 ⁷	316	13	10,08	3,19	117	5,0	V	V	109	2,2	V	103	4,5	V	65	5,4	V	81	2,7
43	Fração mononuclear	3x 10 ⁷	253	12	7,71	3,05	115	3,8	V	V	61	2,7	V	47	5,7	M	NA	NA	M	NA	NA
44	HepG2	5x10 ⁷	317	12	8,74	2,75	114	3,8	V	V	98	3,4	V	33	6,3	M	NA	NA	M	NA	NA
45	HepG2	5x10 ⁷	315	12	8,42	2,68	121	3,0	V	V	108	2,8	V	97	3,1	V	98	4,6	V	89	3,3
46	HepG2	5x10 ⁷	310	16	8,89	2,86	130	6,7	V	V	106	3,0	V	35	6,7	M	NA	NA	M	NA	NA
47	HepG2	5x10 ⁷	341	12	10,15	2,98	152	2,4	V	V	110	4,1	V	70	7,7	V	78	5,3	V	69	5,2
48	HepG2	5x10 ⁷	334	14	10,17	3,04	134	3,3	V	V	99	3,2	V	64	8,2	M	NA	NA	M	NA	NA
49	Fração mononuclear	3x 10 ⁷	362	10	11,27	3,11	128	4,3	V	V	207	4,7	V	103	5,9	V	67	6,3	V	75	5,2
50	Fração mononuclear	3x 10 ⁷	342	12	9,85	2,88	126	6,6	V	V	94	7,4	V	94	7,4	M	NA	NA	M	NA	NA
51	Fração mononuclear	3x 10 ⁷	333	10	10,79	3,24	126	3,7	V	V	186	2,9	V	117	4,9	V	79	5,0	V	105	4,4
52	Fração mononuclear	3x 10 ⁷	301	11	9,36	3,11	159	3,0	V	V	208	2,9	V	132	2,9	M	NA	NA	M	NA	NA
53	Fração mononuclear	3x 10 ⁷	332	10	10,76	3,24	167	3,7	V	V	137	4,0	V	187	4,6	V	94	4,6	V	96	4,1
54	Medula óssea total	3x 10 ⁷	220	17	7,11	3,23	134	2,9	V	V	51	4,5	V	125	6,7	V	93	4,3	V	101	NR
55	Medula óssea total	3x 10 ⁷	235	14	8,23	3,51	143	3,3	V	V	82	3,0	V	97	3,1	V	106	7,0	V	116	NR
56	Medula óssea total	3x 10 ⁷	217	15	7,83	3,61	141	1,8	V	V	111	3,6	V	58	7,7	V	104	5,6	V	67	NR
57	Medula óssea total	3x 10 ⁷	210	12	7,39	3,53	140	3,9	V	V	102	3,5	V	119	3,9	V	82	NR	V	87	NR
58	Medula óssea total	3x 10 ⁷	194	12	6,57	3,38	121	3,0	V	V	71	3,7	V	80	4,9	V	67	NR	V	103	NR
59	Medula óssea total	3x 10 ⁷	231	12	7,73	3,35	155	1,8	V	V	89	3,0	V	81	4,5	V	88	NR	V	89	NR
60	Medula óssea total	3x 10 ⁷	295	14	8,65	2,94	161	5,5	V	V	113	4,7	V	56	6,9	M	NA	NA	M	NA	NA
61	Medula óssea total	3x 10 ⁷	315	16	9,67	3,07	159	2,7	V	V	97	4,3	V	36	7,2	M	NA	NA	M	NA	NA
62	Medula óssea total	3x 10 ⁷	294	16	9,12	3,10	139	2,9	V	V	102	3,3	V	88	3,9	V	101	3,5	V	119	3,6
63	Medula óssea total	3x 10 ⁷	289	13	9,07	3,14	146	2,0	V	V	70	4,2	V	72	5,7	V	77	5,0	M	NA	NA
64	Medula óssea total	3x 10 ⁷	274	12	8,83	3,22	138	5,4	V	V	42	4,5	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA

NA=não se aplica; NR=não realizado; M=morto; V=vivo.

Dados brutos – Fase 2 (continuação)

Identificação	Vivo 96 horas	Glicose 96 horas (mg/dL)	Lactato 96 horas (mmol/L)	Vivo 120 horas	Glicose 120 horas (mg/dL)	Lactato 120 horas (mmol/L)	Vivo 144 horas	Glicose 144 horas (mg/dL)	Lactato 144 horas (mmol/L)	Vivo 168 horas	Glicose 168 horas (mg/dL)	Lactato 168 horas (mmol/L)	Identificação	Vivo 192 horas	Peso corporal 192 horas (g)	Vivo 216 horas	Peso corporal 216 horas (g)	Vivo 240 horas	Peso corporal 240 horas (g)	Glicose 240 horas (mg/dL)	Lactato 240 horas (mmol/L)	Tempo de sobrevivência (h)	Peso dos lobos remanescentes (g)	Razão peso dos lobos remanescentes / peso corporal 72 horas (%)
1	V	115	4,0	V	111	4,3	V	119	3,5	V	132	2,6	1	V	N	V	N	V	214	128	7,9	240	7,94	3,70
2	V	84	4,6	V	70	4,3	V	49	3,0	M	NA	NA	2	M	NA	M	NA	M	NA	NA	NA	167	NA	NA
3	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	3	M	NA	M	NA	M	NA	NA	NA	23	NA	NA
4	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	4	M	NA	M	NA	M	NA	NA	NA	23	NA	NA
5	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	5	M	NA	M	NA	M	NA	NA	NA	5	NA	NA
6	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	6	M	NA	M	NA	M	NA	NA	NA	47	NA	NA
7	V	84	5,8	V	89	8,6	V	115	3,8	V	116	3,7	7	V	263	V	261	V	263	89	4,8	240	5,92	2,25
8	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	8	M	NA	M	NA	M	NA	NA	NA	23	NA	NA
9	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	9	M	NA	M	NA	M	NA	NA	NA	23	NA	NA
10	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	10	M	NA	M	NA	M	NA	NA	NA	23	NA	NA
11	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	11	M	NA	M	NA	M	NA	NA	NA	23	NA	NA
12	V	93	4,7	V	90	3,5	V	180	3,8	V	121	2,8	12	V	235	V	239	V	230	109	NA	240	4,45	1,94
13	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	13	M	NA	M	NA	M	NA	NA	NA	23	NA	NA
14	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	14	M	NA	M	NA	M	NA	NA	NA	47	NA	NA
15	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	15	M	NA	M	NA	M	NA	NA	NA	71	NA	NA
16	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	16	M	NA	M	NA	M	NA	NA	NA	47	NA	NA
17	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	17	M	NA	M	NA	M	NA	NA	NA	5	NA	NA
18	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	18	M	NA	M	NA	M	NA	NA	NA	47	NA	NA
19	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	19	M	NA	M	NA	M	NA	NA	NA	95	NA	NA
20	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	20	M	NA	M	NA	M	NA	NA	NA	47	NA	NA
21	V	44	5,2	V	73	6,1	M	NA	NA	M	NA	NA	21	M	NA	M	NA	M	NA	NA	NA	143	NA	NA
22	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	22	M	NA	M	NA	M	NA	NA	NA	47	NA	NA
23	V	108	5,2	V	108	6,0	V	119	3,5	V	127	4,8	23	V	246	V	239	V	245	140	4,7	240	8,89	3,63
24	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	24	M	NA	M	NA	M	NA	NA	NA	71	NA	NA
25	V	139	2,6	V	177	3,4	V	171	3,6	V	221	3,4	25	V	229	V	225	V	234	109	2,0	240	7,56	3,22
26	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	26	M	NA	M	NA	M	NA	NA	NA	47	NA	NA
27	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	27	M	NA	M	NA	M	NA	NA	NA	71	NA	NA
28	V	123	3,7	V	161	3,2	V	141	2,8	V	131	4,6	28	V	222	V	232	V	229	95	0,8	240	6,02	2,63
29	V	131	2,8	V	179	3,9	V	142	2,3	V	162	3,2	29	V	263	V	269	V	267	127	2,3	240	7,72	2,89
30	V	124	3,3	V	156	3,0	V	171	3,7	V	165	4,4	30	V	273	V	277	V	277	158	4,3	240	8,13	2,94
31	V	113	2,8	V	163	3,3	V	128	2,8	V	157	2,4	31	V	268	V	272	V	277	115	3,7	240	9,55	3,45
32	V	124	2,6	V	133	2,2	V	126	2,3	V	124	2,4	32	V	313	V	316	V	321	117	3,5	240	9,05	2,82

NA=não se aplica; NR=não realizado; M=morto; V=vivo.

Dados brutos – Fase 2 (continuação)

Identificação	Vivo 96 horas	Glicose 96 horas (mg/dL)	Lactato 96 horas (mmol/L)	Vivo 120 horas	Glicose 120 horas (mg/dL)	Lactato 120 horas (mmol/L)	Vivo 144 horas	Glicose 144 horas (mg/dL)	Lactato 144 horas (mmol/L)	Vivo 168 horas	Glicose 168 horas (mg/dL)	Lactato 168 horas (mmol/L)	Identificação	Vivo 192 horas	Peso corporal 192 horas (g)	Vivo 216 horas	Peso corporal 216 horas (g)	Vivo 240 horas	Peso corporal 240 horas (g)	Glicose 240 horas (mg/dL)	Lactato 240 horas (mmol/L)	Tempo de sobrevivência (h)	Peso dos lobos remanescentes (g)	Razão peso dos lobos remanescentes / peso corporal 72 horas (%)
33	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	33	M	NA	M	NA	M	NA	NA	NA	47	NA	NA
34	V	108	3,7	V	116	3,4	V	139	3,2	V	126	3,0	34	V	281	V	284	V	289	118	4,0	240	9,14	3,16
35	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	35	M	NA	M	NA	M	NA	NA	NA	71	NA	NA
36	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	36	M	NA	M	NA	M	NA	NA	NA	95	NA	NA
37	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	37	M	NA	M	NA	M	NA	NA	NA	23	NA	NA
38	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	38	M	NA	M	NA	M	NA	NA	NA	47	NA	NA
39	V	98	2,8	V	116	2,4	V	117	2,4	V	123	1,8	39	V	261	V	261	V	262	111	2,1	240	8,18	3,12
40	V	94	2,4	V	123	2,5	V	134	2,4	V	129	3,0	40	V	231	V	241	V	243	123	3,0	240	7,60	3,13
41	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	41	M	NA	M	NA	M	NA	NA	NA	47	NA	NA
42	V	107	2,4	V	141	3,3	V	131	2,4	V	121	2,3	42	V	252	V	269	V	270	124	2,8	240	10,45	3,87
43	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	43	M	NA	M	NA	M	NA	NA	NA	47	NA	NA
44	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	44	M	NA	M	NA	M	NA	NA	NA	47	NA	NA
45	V	97	1,8	V	112	2,8	V	109	3,7	V	114	1,1	45	V	262	V	263	V	267	111	2,7	240	7,55	2,82
46	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	46	M	NA	M	NA	M	NA	NA	NA	47	NA	NA
47	V	90	4,0	V	98	2,9	V	75	3,1	V	92	2,8	47	V	239	V	255	V	263	85	2,7	240	8,89	3,39
48	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	48	M	NA	M	NA	M	NA	NA	NA	47	NA	NA
49	V	96	2,9	V	105	2,4	V	91	3,0	V	104	4,4	49	V	298	V	294	V	294	96	2,4	240	10,54	3,58
50	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	50	M	NA	M	NA	M	NA	NA	NA	47	NA	NA
51	V	117	3,3	V	95	3,4	V	71	4,4	V	74	3,1	51	V	250	V	244	V	237	84	4,8	240	6,79	2,86
52	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	52	M	NA	M	NA	M	NA	NA	NA	47	NA	NA
53	V	113	3,0	V	109	1,7	V	101	4,3	V	116	2,2	53	V	304	V	310	V	305	109	3,8	240	9,03	2,96
54	V	182	NR	V	107	NR	V	42	2,9	V	134	3,0	54	V	207	V	208	V	209	138	2,0	240	7,11	3,40
55	V	194	NR	V	123	NR	V	142	1,5	V	114	1,8	55	V	216	V	220	V	226	147	3,7	240	7,71	3,42
56	V	177	NR	V	78	NR	V	155	3,8	V	93	4,0	56	V	167	V	167	V	170	84	6,6	240	3,81	2,24
57	V	190	NR	V	115	NR	V	155	3,3	V	128	1,9	57	V	207	V	207	V	216	109	2,0	240	8,94	4,13
58	V	170	NR	V	101	NR	V	151	4,5	V	115	2,7	58	V	173	V	183	V	192	112	2,1	240	6,94	3,61
59	V	119	NR	V	96	NR	V	135	4,5	V	132	3,7	59	V	160	V	154	V	147	90	5,0	240	6,24	4,26
60	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	60	M	NA	M	NA	M	NA	NA	NA	47	NA	NA
61	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	61	M	NA	M	NA	M	NA	NA	NA	47	NA	NA
62	V	120	2,9	V	138	3,3	V	138	3,7	V	127	2,7	62	V	248	V	257	V	261	133	3,3	240	10,73	4,10
63	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	63	M	NA	M	NA	M	NA	NA	NA	71	NA	NA
64	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	M	NA	NA	64	M	NA	M	NA	M	NA	NA	NA	23	NA	NA

NA=não se aplica; NR=não realizado; M=morto; V=vivo.

Dados brutos – Fase 3

Identificação	Regime terapêutico	Momento do sacrifício (horas após hepatectomia)	Peso corporal antes da hepatectomia (g)	Peso corporal do dia do sacrifício (g)	Peso dos lobos remanescentes (g)	Razão peso dos lobos remanescentes em /peso corporal do dia do sacrifício (%)	Hepatócitos em mitoses	PDGF BB sérico (ng/mL)	TGF beta sérico (ng/mL)	IL-6 sérica (pg/mL)
1	Sem células	6	366	366	2,70	0,74	0	8,03	39,44	NR
2	Sem células	6	306	306	2,99	0,98	0	7,58	44,72	NR
3	Sem células	6	252	252	2,67	1,06	0	7,64	63,73	NR
4	Fração mononuclear	6	295	295	2,00	0,68	0	8,44	122,58	416,12
5	Fração mononuclear	24	341	317	4,03	1,27	0	5,09	74,58	119,72
6	Fração mononuclear	24	307	286	3,33	1,17	0	6,66	88,46	168,54
7	Fração mononuclear	6	339	339	3,60	1,06	0	8,00	95,05	242,58
8	Medula óssea total	24	325	304	3,01	0,99	0	6,76	26,79	64,92
9	Medula óssea total	24	362	333	3,60	1,08	0	6,71	44,17	58,06
10	Medula óssea total	6	302	302	2,99	0,99	1	8,32	87,85	372,20
11	Medula óssea total	6	269	269	3,19	1,18	1	8,04	67,95	182,37
12	Medula óssea total	6	251	251	2,72	1,08	1	8,35	101,17	308,08
13	Medula óssea total	6	310	310	3,01	0,97	0	8,11	88,15	172,33
14	Sem células	6	370	370	3,04	0,82	0	7,92	107,40	238,95
15	Sem células	24	359	340	4,49	1,32	3	6,21	49,45	101,28
16	Sem células	24	354	329	4,61	1,40	0	6,30	28,40	192,35
17	Sem células	24	306	277	4,18	1,51	11	7,05	32,33	124,94
18	Sem células	24	278	243	3,13	1,29	13	7,05	61,40	99,95
19	Sem células	48	247	216	4,10	1,89	20	3,45	60,29	132,74
20	Sem células	48	289	258	5,16	2,00	44	1,83	18,14	143,06
21	Sem células	24	272	264	3,30	1,25	9	4,85	77,36	172,33
22	Fração mononuclear	24	292	267	4,43	1,66	5	7,78	106,00	263,03
23	Fração mononuclear	24	310	288	4,81	1,67	0	7,35	75,18	253,43
24	Fração mononuclear	24	282	272	4,62	1,70	1	6,81	25,46	280,91
25	Fração mononuclear	48	280	254	5,67	2,23	27	7,65	29,17	48,39

NR=não realizado.

Dados brutos – Fase 3 (continuação)

Identificação	Regime terapêutico	Momento do sacrifício (horas após hepatectomia)	Peso corporal antes da hepatectomia (g)	Peso corporal do dia do sacrifício (g)	Peso dos lobos remanescentes (g)	Razão peso dos lobos remanescentes em /peso corporal do dia do sacrifício (%)	Hepatócitos em mitoses	PDGF BB sérico (ng/mL)	TGF beta sérico (ng/mL)	IL-6 sérica (pg/mL)
26	Fração mononuclear	48	281	264	4,64	1,76	50	6,21	33,41	67,65
27	Fração mononuclear	6	246	246	3,36	1,37	1	5,86	41,26	278,53
28	Medula óssea total	24	291	260	3,59	1,38	0	6,75	47,83	124,94
29	Medula óssea total	24	272	242	3,73	1,54	8	7,37	89,04	106,57
30	Medula óssea total	24	272	262	4,28	1,63	55	6,43	79,43	202,27
31	Medula óssea total	48	247	215	4,65	2,16	57	5,68	89,00	79,86
32	Medula óssea total	48	225	220	5,33	2,42	36	6,91	26,86	90,61
33	Medula óssea total	48	315	287	5,07	1,76	99	4,92	38,17	49,78
34	Medula óssea total	6	332	332	3,11	0,94	2	6,53	47,38	264,22
35	Sem células	12	297	279	2,94	1,05	1	7,47	61,05	135,33
36	Sem células	12	292	265	3,21	1,21	1	7,77	51,93	303,37
37	Sem células	12	344	328	4,43	1,35	0	6,80	66,97	181,12
38	Sem células	12	301	281	3,58	1,27	1	8,03	64,85	217,03
39	Sem células	12	315	295	3,58	1,21	0	8,25	100,51	588,79
40	Sem células	48	289	263	5,02	1,91	49	5,23	25,10	74,45
41	Sem células	48	286	261	4,02	1,54	38	3,07	25,56	30,23
42	Sem células	48	315	291	3,67	1,26	89	4,25	5,13	110,53
43	Sem células	72	335	322	8,26	2,57	39	6,65	42,16	74,45
44	Sem células	72	311	290	7,21	2,48	49	7,57	44,33	60,81
45	Fração mononuclear	6	318	318	2,76	0,87	2	7,32	35,12	228,03
46	Fração mononuclear	6	330	330	3,63	1,10	2	7,79	31,39	309,26
47	Fração mononuclear	48	327	295	4,72	1,60	91	7,58	55,13	89,28
48	Fração mononuclear	48	361	317	6,63	2,09	56	4,64	33,74	119,72
49	Fração mononuclear	72	315	290	6,12	2,11	33	7,40	42,68	90,61
50	Fração mononuclear	72	353	298	5,90	1,98	64	3,71	31,00	169,81

Dados brutos – Fase 3 (continuação)

Identificação	Regime terapêutico	Momento do sacrifício (horas após hepatectomia)	Peso corporal antes da hepatectomia (g)	Peso corporal do dia do sacrifício (g)	Peso dos lobos remanescentes (g)	Razão peso dos lobos remanescentes em /peso corporal do dia do sacrifício (%)	Hepatócitos em mitoses	PDGF BB sérico (ng/mL)	TGF beta sérico (ng/mL)	IL-6 sérica (pg/mL)
51	Fração mononuclear	72	287	274	5,63	2,06	79	4,65	34,80	51,16
52	Medula óssea total	72	279	257	4,85	1,89	60	4,30	39,31	53,93
53	Medula óssea total	72	287	263	5,60	2,13	67	8,00	37,40	74,45
54	Medula óssea total	72	316	282	5,66	2,01	100	8,18	32,88	94,62
55	Medula óssea total	72	299	247	5,39	2,18	42	7,45	65,78	74,45
56	Fração mononuclear	12	315	294	2,81	0,96	1	8,47	50,22	141,78
57	Fração mononuclear	12	337	318	2,66	0,84	1	7,58	60,78	261,83
58	Fração mononuclear	12	309	293	2,60	0,89	0	1,20	40,49	203,50
59	Fração mononuclear	12	312	298	3,88	1,30	0	7,78	41,09	540,29
60	Fração mononuclear	72	312	281	5,04	1,79	68	5,85	34,98	93,29
61	Sem células	72	335	303	6,69	2,21	65	6,38	32,03	90,61
62	Sem células	72	369	337	7,54	2,24	72	2,79	21,51	135,33
63	Medula óssea total	12	390	374	3,85	1,03	1	7,86	43,71	247,41
64	Medula óssea total	12	319	309	2,35	0,76	1	7,71	55,88	253,43
65	Medula óssea total	12	285	277	2,41	0,87	0	8,10	57,95	231,68
66	Medula óssea total	12	334	326	2,92	0,90	1	7,71	40,93	1284,79
67	Medula óssea total	12	340	328	2,91	0,89	1	7,73	54,87	228,03
68	Medula óssea total	48	347	308	5,10	1,66	92	3,51	28,17	197,32
69	Medula óssea total	48	336	309	5,20	1,68	58	7,01	39,81	119,72
70	Fração mononuclear	12	332	301	3,13	1,04	0	7,63	37,08	348,99
71	Fração mononuclear	48	304	280	5,22	1,86	65	8,17	46,25	119,72
72	Fração mononuclear	72	302	269	5,13	1,91	70	1,71	39,29	66,28
73	Sem células	6	340	340	3,34	0,98	1	8,06	47,03	298,66
74	Sem células	72	341	294	6,25	2,13	51	8,14	51,51	105,25
75	Medula óssea total	72	332	257	4,88	1,90	23	4,52	78,05	148,20