

**THIAGO PINHEIRO ARRAIS ALOIA**

**Alterações celulares, moleculares e funcionais de fígados  
de ratas Wistar tratadas com fatores hepatotróficos**

São Paulo  
2010

**THIAGO PINHEIRO ARRAIS ALOIA**

**Alterações celulares, moleculares e funcionais de fígados de ratas Wistar  
tratadas com fatores hepatotróficos**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências

**Departamento:**

Cirurgia

**Área de concentração:**

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

**Orientador:**

Prof. Dr. Francisco Javier Hernandez-Blazquez

São Paulo

2010

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

#### DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da  
Universidade de São Paulo)

T.2268  
FMVZ

Aloia, Thiago Pinheiro Arrais

**Alterações celulares, moleculares e funcionais de fígados de ratas Wistar  
tratadas com fatores hepatotróficos /** Thiago Pinheiro Arrais Aloia. -- 2010.

160 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária  
e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2010.

Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.  
Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Javier Hernandez-Blazquez.

1. Fígado. 2. Fatores hepatotróficos. 3. Regeneração hepática. 4. Expressão gênica.  
I. Título.

## FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: ALOIA, Thiago Pinheiro Arrais

Título: Alterações celulares, moleculares e funcionais de fígados de ratas Wistar tratadas com fatores hepatotróficos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

### BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof.(a) Dr. (a) \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof.(a) Dr. (a) \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_


Assinatura: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

*Comissão de Ética no uso de animais*

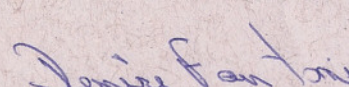
## CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado: "Alterações celulares, moleculares e funcionais de fígados de ratas Wistar tratadas com fatores hepatotróficos", protocolado sob o nº1110/2007, utilizando 105 (cento e cinco) ratos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Francisco Javier Hernandez Blazquez, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 22/08/07.

We certify that the Research "Cellular, molecular and functional alterations in rat liver treated with hepatotrophic factors", protocol number 1110/2007, utilizing (one hundred five) rats, under the responsibility Prof. Dr. Francisco Javier Hernandez Blazquez, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo was approved in the meeting of day 08/22/2007.



São Paulo, 16 de março de 2010



Profa Dra Denise Tabacchi Fantoni  
Presidente

## DEDICATÓRIA

A Deus deixo eternamente minha gratidão por sempre dar-me oportunidades em minha vida!

A minha mãe querida (*in memoriam*) que anda sempre comigo em todos os momentos. Que mesmo nos deixando na Terra, me orienta e protege em todos os meus caminhos demonstrando, "para mim" estar mais presente do que nunca principalmente em meu coração. Foram difíceis os momentos que passei quando você não estava mais entre nós, e, essa tese de doutoramento é inteiramente em sua dedicação. Para mim essa tese não é apenas mais uma etapa da minha vida, significa mais do isso, é um troféu que entrego a você por ter me dado educação, respeito, amor, profissionalismo, segurança e coragem que permitiram a execução deste. Sem sua criação, sem você minha mãe, eu não seria a pessoa que sou. Me orgulho de ter sido escolhido a dedo para ser seu filho. Você é um exemplo que sempre procuro seguir e que passarei aos meus filhos e netos. É difícil de expressar em palavras a gratidão e amor que tenho por você minha mãe.

*São eternas as saudades deixadas por ti*

*Te amo e até breve mamis...*

"Os bons momentos da vida são como paradas para o descanso. Os espíritos em sua origem já são eternos em sua passagem pela vida. Você, minha mãe, se tornou eterna nas realizações e no seu exemplo de vida. Sua vida de alegria é a realidade, e é o que aprendemos com a senhora, pois a sabedoria divina não comete enganos e até a sua partida Deus soube o que fez. Agora a senhora é uma nuvem que flutua no céu, é a estrela maior que brilha a noite, mas continua sendo eternamente minha "MÃE".

A DONA SÔNIA; a esposa; a irmã; a tia; a avó; a professora; a amiga;  
Enfim ... a "MINHA MÃE" Thiago, Fred, Diogo e Luciano

25/04/1949-16/01/2009 †

## AGRADECIMENTOS

A meu pai (Luciano Aloia) e irmãos (Frederico e Diogo) por fazerem parte de minha vida e terem me dado esse privilégio de formarmos uma linda família. Vocês são minha vida, hoje e sempre. Agradeço a vocês pelo apoio financeiro e acima de tudo pelos momentos em que me deram força e me encorajaram para nunca desistir. Hamintas, Lico e Galo, obrigado do Alemão.

Ao meu Mestre Francisco Javier Hernandez-Blazquez. Um exemplo de homem digno, honesto, correto, humano, ético, e acima de tudo amigo. Sua compreensão, ensinamentos, dedicação, solidariedade e honestidade o fazem mais ser humano do que qualquer "currículo lattes" encorpado. Obrigado por me aceitar como seu discípulo e por contribuir em minha formação como pesquisador e como pessoa digna nestes 5 anos de convivência.

Ao meu avô Gerson (*in memorian*) pelo exemplo de homem, respeito e por sempre acreditar e me incentivar em meus estudos. Um homem literalmente guerreiro que sempre revelava por trás de sua armadura sua compaixão.

A minha avó Thereza, avô Nicola (*in memorian*), tias Fátima, Ângela e Cecília, tio Tó e Geni, aos primos Nicolas e Alan e as primas Marília, Bruna e Paula, e a todos os outros tios(as), primos(as) e aos demais parentes de São Paulo que me receberam extraordinariamente de braços abertos.

Aos meu padrinho Bolinha (Paulo Vinícius), por me receber de portas abertas, pelo carinho e pela grande pessoa que representa para mim. Meu primo Fernando, que me deu toda a assistência necessária, amizade e companheirismo sempre que precisei.

A minha avó Sena (*in memorian*) que ainda guardo comigo suas sábias palavras de incentivo e aprendizado. As minhas tias Valéria, Zizi, Terezinha, Cleuza, Neli, Mimi (*in memorian*), tio Chico, Julião (pelos conselhos) Marco e Gersinho, primas Juliana, Luciana, Natália, Julieta e Flávia, primos Leo, Vinícios, Neto e Guilherme.

Ao meu grande amigo Bruno Cogliati, uma pessoa atenciosa, inteligente, amiga e que tem um futuro brilhante pela frente. Sou grato pelos seus ensinamentos laboratoriais e por suas palavras de incentivo em vários momentos na copa da

patologia. Sou muito agradecido por ter você em minha escassa lista de melhores amigos.

A Tereza Cristina por toda ajuda laboratorial e pela grande pequena pessoa que é. Sua atenção, dedicação e eficiência impressionam. Obrigado pela amizade.

Aos meus companheiros de república Carlos Alberto Sarmiento, Evander Bueno, Guilherme Buzon, Caio Biazzi, Leandro Fadel, Marcello Machado e Fernando Garbelotti. Vocês são e sempre serão meus irmãos que levo de São Paulo para minha vida. Somente quem chega a uma cidade onde não tem amigos sabe o valor que tem pessoas companheiras, sinceras e chatas como vocês. Os momentos que passamos juntos são e serão inesquecíveis, até porque está tudo arquivado.

Ao técnico de laboratório Diogo Náder Palermo, pela ajuda técnica, amizade e parceria nesses 6 anos de convivência.

Aos meus colegas de laboratório Alex Sander, Maurício, e Elizângela, Paula, Gisele e Fernanda. Obrigado pela amizade, companhia e parceria por todo esse tempo.

A todos os demais colegas de pós-graduação, técnicos, professores, bibliotecários e secretários que participaram de alguma forma na construção e que sou profundamente grato.

Aos professores(as) Júlia Maria Matera, José Roberto Machado da Cunha Silva, Tereza Cristina da Silva e José Manoel dos Santos pela enorme contribuição na confecção e qualidade desse exemplar. Suas sugestões e pontos de vistas são e serão de grande valia para futuras publicações e contribuíram e estão sempre contribuindo para minha formação como profissional, assim como, para formação de dezenas de outros pós-graduandos. Vocês estão dando qualidade para a formação do corpo docente do ensino superior no Brasil e devem e merecem o respeito e a admiração de todos nós pós-graduandos. Obrigado.

A Eloíse e sua família, pela pessoa maravilhosa que apareceu num momento tão difícil e que vem me surpreendendo cada vez mais demonstrando a incrível pessoa que é. Obrigado por tudo!

A Fórmula Medicinal por fornecer o suporte adequado durante meu experimento de doutorado e a Fundação de Amparo de Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) por financiar esse trabalho e minha manutenção mensal.

A todos meus sinceros agradecimentos!



## RESUMO

ALOIA, T. P. A. **Alterações celulares, moleculares e funcionais de fígados de ratos Wistar tratadas com fatores hepatotróficos.** [Cellular, molecular and functional alterations in rat liver treated with hepatotrophic factors]. 2010. 160 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Fatores hepatotróficos (FH) possuem a capacidade de promover aumento de massa hepática em ratos e diminuição da fibrose em animais cirróticos. Os FH podem ser importantes nos casos de ressecção e transplantes hepáticos no qual o fígado remanescente necessita de um volume considerável para exercer suas funções após a cirurgia. Objetivou-se neste trabalho avaliar a cinética de uma solução de FH em fígados de animais sadios. Utilizou-se 105 ratos Wistar fêmeas divididos em 7 grupos de 15 animais cada. 6 grupos receberam solução de FH na dose 40 ml/kg/dia, i.p. e 1 grupo controle (CT) recebeu apenas solução salina 0,9%. Os animais foram eutanasiados com 2, 4, 6, 8, 10 e 12 dias (grupos 2, 4, 6, 8, 10 e 12) após o início do tratamento. Avaliou-se os parâmetros biométricos, a proliferação dos hepatócitos pela análise imuno-histoquímica (PCNA), morfometria do colágeno, função hepática e a expressão gênica de colágeno  $\alpha 1$ , TGF $\beta$ 1, MMP 2 e PLAU. O aumento de massa hepática foi maior nos grupos 8, 10 e 12. A marcação de hepatócitos PCNA<sup>+</sup> obteve seu pico no grupo 2. A morfometria do colágeno (mensurado pelo picrossírius) revelou redução nos grupos 6, 10 e 12 (o Grupo 8 não foi avaliado). A imunofluorescência para colágeno tipo III evidenciou redução do colágeno no grupo 12. Os resultados das enzimas de função hepática permaneceram normais. A expressão gênica do colágeno  $\alpha 1$  obteve alta expressão diminuindo com o decorrer do tratamento; a ação do gene TGF $\beta$ 1 indicou inibição da proliferação celular no grupo 12. MMP 2 e PLAU não demonstraram participar de forma efetiva no mecanismo de ação dos FHs. Os resultados demonstraram que a solução de FH promove a hipertrofia hepatocitária, sem alteração da função hepática e diminuindo o colágeno volumétrico do fígado. Os FH representam uma opção relevante ao tratamento de hepatopatias ou quando é necessário aumento de massa hepática antes de hepatectomias e/ou ressecções.

Palavras-chave: Fígado. Fatores hepatotróficos. Regeneração hepática. Expressão gênica.

## ABSTRACT

ALOIA, T. P. A. **Cellular, molecular and functional alterations in rat liver treated with hepatotrophic factors.** [Alterações celulares, moleculares e funcionais de fígados de ratas Wistar tratadas com fatores hepatotróficos]. 2010. 160 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Hepatotrophic factors (HF) have the ability to increase the liver mass in rats and decrease fibrosis in cirrhotic rats. HFs can be important in cases of resection and liver transplantation in which the remnant liver needs to restore a considerable mass volume before surgery. Thus, this study evaluates the kinetics of HF solution in the livers of healthy animals. Were used 105 female Wistar rats divided into 7 groups of 15 animals each. 6 groups received HF solution at a dose 40 ml/kg/day, i.p. and 1 control group (CT) only received 0.9% saline solution. The animals were euthanized at 2, 4, 6, 8, 10 and 12 days (groups 2, 4, 6, 8, 10 and 12) after starting treatment. The biometric parameters, proliferation of hepatocytes by immunohistochemical analysis (PCNA), collagen morphometry, liver biochemical function and gene expression of collagen  $\alpha 1$ , TGF $\beta$ 1, MMP 2 and PLA2. The increase in liver mass was greater in groups 8, 10 and 12. The index of hepatocytes PCNA+ peak obtained in group 2. Morphometry of collagen (measured by picosirius red) revealed reduction in groups 6, 10 and 12 (Group 8 was not evaluated). Immunofluorescence for collagen type III showed reduction of collagen in group 12. The results of the enzymes of liver function remained normal. Gene expression of collagen  $\alpha 1$  expression was higher decreasing over the course of treatment; the action of TGF $\beta$ 1 gene showed inhibition of cell proliferation in group 12. MMP 2 and PLA2 not shown to effectively participate in the mechanism of action of HFs. The results showed that the solution of HF promotes hepatocyte hypertrophy with no change in liver function and decreasing the volume of liver collagen. Therefore, HFs represents an important option for treatment of chronic liver diseases or when it is necessary to increase liver mass before hepatectomy and/or resections.

Keywords: Liver. Hepatotrophic factors. Hepatic regeneration. Genic expression.

## Gracias por visitar este Libro Electrónico

Puedes leer la versión completa de este libro electrónico en diferentes formatos:

- HTML(Gratis / Disponible a todos los usuarios)
- PDF / TXT(Disponible a miembros V.I.P. Los miembros con una membresía básica pueden acceder hasta 5 libros electrónicos en formato PDF/TXT durante el mes.)
- Epub y Mobipocket (Exclusivos para miembros V.I.P.)

Para descargar este libro completo, tan solo seleccione el formato deseado, abajo:

