

# Efeito do sirolimo na regeneração hepática induzida por hepatectomia no rato

## *Sirolimus influence on hepatectomy-induced liver regeneration in rats*

EDIMAR LEANDRO TORDERKE, TCBC-PR<sup>1</sup>; GIORGIO ALFREDO PEDROSO BARETTA, TCBC-PR<sup>1</sup>; OZIMO PEREIRA GAMA FILHO<sup>1</sup>; JORGE EDUARDO FOUTO MATIAS, ACBC-PR<sup>1</sup>

### R E S U M O

**Objetivo:** avaliar a influência do sirolimo sobre a regeneração hepática desencadeada pela ressecção de 70% do fígado de ratos adultos. **Métodos:** utilizaram-se 40 ratos *Wistar* que foram divididos aleatoriamente em dois grupos (estudo e controle), cada grupo foi subdividido em dois subgrupos iguais conforme o dia da morte (24 horas e sete dias). O sirolimo foi administrado na dose de 1mg/kg/dia no grupo de estudo e no grupo controle foi administrado 1ml de solução salina. As soluções foram administradas diariamente, desde três dias precedentes à hepatectomia até a morte dos ratos, para a retirada do fígado regenerado, realizada em 24h ou 7d após a hepatectomia. A análise da regeneração hepática foi mensurada pela fórmula de KWON, número de figuras de mitose pela técnica de hematoxilina-eosina e pelos marcadores imunoistoquímicos PCNA e Ki-67. **Resultados:** demonstrou-se variação estatisticamente significativa quando comparado os grupos 24h com os grupos 7d através dos métodos de análise. Ao comparar os grupos de estudo e controle no mesmo período demonstrou-se variação estatisticamente significativa apenas pelo Ki-67 no qual foi verificado aumento do número de hepatócitos em multiplicação celular no grupo de estudo de 7d quando comparado com o grupo controle de 7d ( $p=0,04$ ). **Conclusão:** não demonstramos influência negativa do sirolimo na regeneração hepática e houve efeito parcial positivo pela análise imunoistoquímica utilizando Ki-67.

**Descritores:** Regeneração hepática. Sirolimo. Hepatectomia. Antígeno Nuclear de Célula em Proliferação.

### INTRODUÇÃO

A regeneração hepática é um evento que envolve várias células e uma complexa interação entre citocinas e fatores de crescimento. Higgins e Anderson<sup>1</sup> publicaram os primeiros estudos sobre regeneração hepática em 1931, quando notaram uma marcante capacidade do fígado do rato se regenerar após hepatectomia parcial. Esse modelo de hepatectomia com ressecção de aproximadamente 70% da massa hepática tem sido largamente utilizado para investigação da regeneração hepática<sup>2</sup>. O processo regenerativo hepático em ratos assemelha-se ao processo de regeneração do fígado humano, o que justifica seu amplo uso em várias áreas da pesquisa biomédica atual<sup>3</sup>.

A regeneração hepática é um componente essencial no mecanismo de proteção orgânica contra a perda de tecido hepático funcionante, seja por agressão química, viral, perda traumática ou por hepatectomia parcial. Na ausência desse processo regenerativo, a morbidade e a mortalidade estão frequentemente aumentadas<sup>4</sup>.

O fígado apresenta a característica de ajustar-se ao tamanho proporcional requerido pelo receptor através

da capacidade regenerativa, a qual é crucial para o sucesso do transplante hepático intervivos, e naqueles em que o órgão implantado é menor que o tamanho ideal para o organismo receptor<sup>5</sup>.

O fenômeno da regeneração hepática é amplo, complexo e ainda não completamente conhecido<sup>6-9</sup>. As interferências de medicamentos, do metabolismo intrínseco do organismo e de doenças também é motivo de estudo para a compreensão desta complexa rede de fatores estimuladores e inibidores da regeneração hepática.

O sirolimo é um novo fármaco, potente imunossupressor e atualmente proposto como terapêutica após transplantes hepáticos para controlar a rejeição do órgão. O mecanismo de ação é bloquear a resposta imune interferindo na produção de linfócitos. Liga-se a um complexo protéico intracelular denominado FKBP12 que é postulado como uma via de resposta ao estímulo regenerativo<sup>10-14</sup>. Esta interferência na proliferação celular pode ocasionar alterações no fenômeno de regeneração hepática. Portanto decidimos avaliar se o processo de regeneração hepática, após a ressecção de 70% do fígado de ratos, sob a influência do imunossupressor sirolimo pode determinar novas informações pertinentes à prática clínica.

1. Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica do Departamento de Cirurgia da Universidade Federal do Paraná – UFPR.

## MÉTODOS

A pesquisa esteve de acordo com as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde, sob o registro CEP/SD: AN.006.002.07.06.

Foram utilizados 40 ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*, *Rodentia mammalia*) adultos, machos, com peso médio inicial de 512,06g (DP  $\pm$  34,88), variando de 431,8g a 610g. Os ratos foram mantidos em ambiente adequado e ração balanceada *ad libitum*. Os 40 animais foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos: controle e estudo, com 20 animais cada um. O grupo controle foi dividido em: grupo controle 24h (GC<sub>24h</sub>) composto por dez animais que foram mortos 24h após a hepatectomia parcial e grupo controle sete dias (GC<sub>7d</sub>) composto por dez animais que foram mortos sete dias após a hepatectomia parcial; o grupo estudo foi dividido em: grupo estudo 24h (GE<sub>24h</sub>) composto por dez animais que foram mortos 24h após a hepatectomia parcial e grupo estudo sete dias (GE<sub>7d</sub>) composto por dez animais que foram mortos sete dias após a hepatectomia parcial.

Nos animais do grupo controle administraram-se solução salina isotônica de cloreto de sódio 0,9% (SSI 0,9%) e, nos do grupo de estudo, sirolimo em solução oral na dose de 1mg/Kg/dia. As soluções foram administradas por processo de gavagem conforme pesagem diária dos ratos iniciadas três dias antes da hepatectomia parcial e mantidas até o dia da morte dos animais.

A anestesia e sedação dos ratos foram realizadas com isoflurano através de um sistema fechado para vaporização e manutenção da anestesia na concentração de 1,5 a 3% e fluxo de oxigênio variando de 0,5 a 3L/min.

Os ratos foram submetidos à clássica hepatectomia parcial de 70% com ressecção dos lobos lateral esquerdo e mediano após a ligadura do pedículo vascular por uma pequena incisão na linha mediana da parede abdominal<sup>1</sup>.

A eutanásia foi induzida pela inalação de isoflurano vaporizado em campânula com oxigênio medicinal. A incisão abdominal era reaberta e o fígado regenerado era retirado para análise.

A regeneração hepática foi avaliada pela fórmula proposta por Kwon<sup>15</sup> – % de regeneração =  $(S \times PH \times 70) / (PS \times R)$ , onde: S= peso em gramas do fígado ressecado no sacrifício; PH= peso do rato na hepatectomia; PS= peso do rato no sacrifício; e R= peso do fígado ressecado na hepatectomia experimental – que fornece um valor percentual de regeneração baseado nos pesos corporal e do fígado dos ratos nos períodos da hepatectomia e da morte.

A multiplicação celular foi avaliada pela contagem de células através de figuras de mitose pela coloração de hematoxilina-eosina e através da imunistoquímica onde foram utilizados os marcadores de proliferação celular PCNA e o Ki67<sup>16-21</sup>.

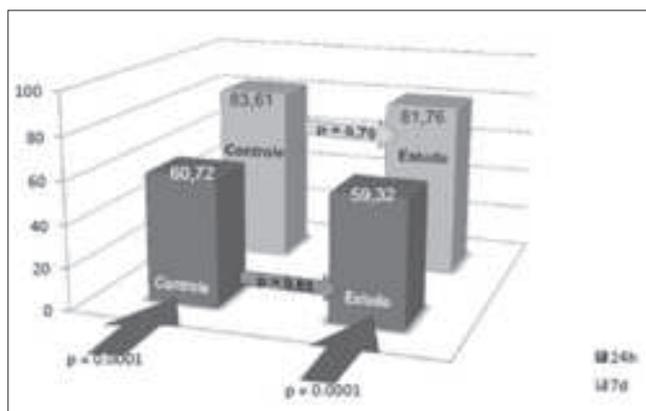
O estudo estatístico utilizou a análise da distribuição normal (Gaussiana) e homocedasticidade das variâncias das variáveis para a escolha do teste estatístico. Na análise não paramétrica foi utilizado o teste de *Mann-Whitney* e na análise paramétrica o teste t de *Student*, e empregou-se o critério de *Aspin-Welch* para o cálculo dos graus de liberdade. Em todos os testes estatísticos, o nível de significância adotado foi  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

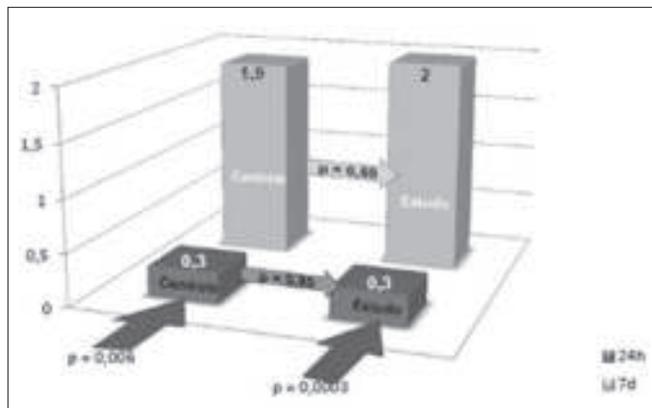
A regeneração hepática avaliada pela fórmula de Kwon mostrou crescimento estatisticamente significativo do remanescente hepático nos dois subgrupos, nas primeiras 24 horas e no sétimo dia após a hepatectomia. Na comparação entre os grupos controle com os grupos de estudo, não houve variação estatisticamente significativa (Figura 1).

Na avaliação do índice mitótico pela coloração de hematoxilina-eosina (HE), houve diferença estatística entre subgrupos 24 horas quando comparados com os subgrupos sete dias. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle e de estudo do mesmo período (Figura 2).

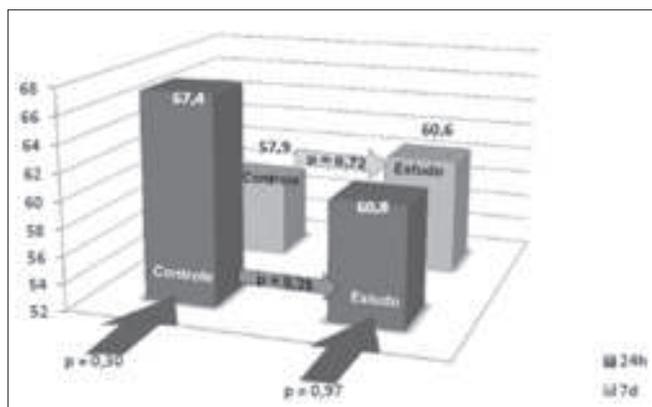
Na avaliação da proliferação celular pelo antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ou entre os subgrupos (Figura 3). Na avaliação da proliferação celular pelo antígeno Ki-67 não houve diferença estatística entre os subgrupos 24 horas quando comparados com os subgrupos sete dias. Também não houve diferença estatística entre os grupos controle e estudo nas 24 horas. No entanto, houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle e estudo após sete dias ( $p=0,04$ ) (Figura 4).



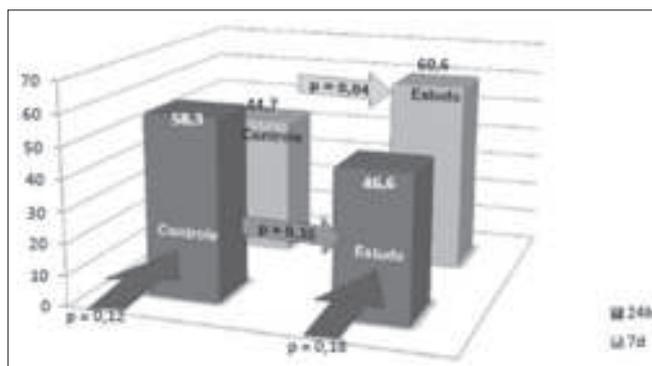
**Figura 1** - Avaliação da percentagem da regeneração hepática pela fórmula de Kwon. Comparação estatística entre os grupos de estudo e controle nos períodos de 24 horas e sete dias. Em cinza escuro os grupos de 24 horas e em cinza claro os grupos de sete dias. Comparação estatística entre os grupos ( $p$ ).



**Figura 2** - Avaliação da regeneração hepática pelo índice mitótico. Comparação estatística entre os grupos de estudo e controle nos períodos de 24 horas e sete dias. Em cinza escuro os grupos de 24 horas e em cinza claro os grupos de sete dias. Comparação estatística entre os grupos ( $p$ ). Índice mitótico: número de núcleos em mitose em dez campos de grande aumento.



**Figura 3** - Avaliação da porcentagem da regeneração hepática pelo PCNA. Comparação estatística entre os grupos de estudo e controle nos períodos de 24 horas e sete dias. Em cinza escuro os grupos de 24 horas e em cinza claro os grupos de sete dias. Comparação estatística entre os grupos ( $p$ ). PCNA: número de núcleos positivos em 100 hepatócitos registrados.



**Figura 4** - Avaliação da porcentagem da regeneração hepática pelo Ki-67. Comparação estatística entre os grupos de estudo e controle nos períodos de 24 horas e sete dias. Em cinza escuro os grupos de 24 horas e em cinza claro os grupos de sete dias. Comparação estatística entre os grupos ( $p$ ). Ki-67: número de núcleos positivos em 100 hepatócitos registrados.

## DISCUSSÃO

Os ratos utilizados neste estudo foram considerados plenamente desenvolvidos, apresentando peso acima de 350 gramas. Ao utilizar ratos adultos, podemos analisar o fenômeno da regeneração hepática na ausência dos estímulos de crescimento do organismo, excluindo-se os mecanismos gerais e específicos que poderiam estar em atividade induzindo a divisão celular em vários tecidos e órgãos.

Nos grupos de estudo utilizou-se a pré-terapia com sirolimo em três dias precedendo o ato operatório até a morte dos animais em 24 horas ou sete dias após a ressecção hepática. O uso da pré-terapia ocasiona presença do sirolimo no organismo no momento da hepatectomia, o que é importante para avaliar a influência da droga nos minutos seguintes à ressecção hepática. Esta estratégia é fundamental na avaliação da regeneração hepática em ratos, pois os processos iniciam-se rapidamente, em minutos, e a maioria das modificações fundamentais são estabelecidas no prazo de 24 horas. A via oral em dose única diária foi utilizada devido à comprovada eficácia e biodisponibilidade desta droga. A utilização do método de gavagem permitiu ter a garantia da completa administração da dose calculada para cada animal.

Os quatro subgrupos apresentaram diminuição do peso corporal desde o início da gavagem até a data da morte de maneira estatisticamente significativa. Esta diminuição do peso corpóreo pode estar relacionada ao estresse causado pelo manuseio dos ratos e à agressão cirúrgica sofrida no período. Nas comparações entre os subgrupos de 24 horas ( $GC_{24h}$  X  $GE_{24h}$ ) e sete dias ( $GC_{7d}$  X  $GE_{7d}$ ) avaliando-se as médias do peso inicial da hepatectomia e do dia da morte, não se verificou variação estatisticamente significativa. Estes dados estatísticos demonstram não haver influência da droga na evolução ponderal nos grupos citados.

Ao comparar os valores percentuais da regeneração pela fórmula de Kwon entre cada grupo, observa-se aumento significativo da taxa de regeneração nos grupos controle ( $GC_{24h}$  X  $GC_{7d}$ ) e estudo ( $GE_{24h}$  X  $GE_{7d}$ ) ao longo do tempo. O grupo controle 24 horas ( $GC_{24h}$ ) apresentou 60,72% e o grupo controle sete dias ( $GC_{7d}$ ) 83,61% ( $p=0,0001$ ), enquanto o grupo de estudo 24 horas ( $GE_{24h}$ ) apresentou 59,32% e o grupo de estudo sete dias ( $GE_{7d}$ ) 81,76% ( $p=0,0001$ ). A fase  $G_2$  (a mitose) acontece em 22-24 horas após a ressecção hepática, atingindo um pico em 32 a 34 horas após a operação, além disso, ciclos adicionais de síntese do DNA podem ser detectados dias após a hepatectomia parcial, justificando o aumento percentual da regeneração hepática pela fórmula de Kwon entre os grupos de estudo e controle<sup>22-25</sup>. Entretanto, quando comparados os grupos 24 horas ( $GC_{24h}$  X  $GE_{24h}$ ) e os grupos sete dias ( $GC_{7d}$  X  $GE_{7d}$ ) não houve diferença estatisticamente significativa ( $p=0,65$  e  $0,70$ , respectivamente). Estes dados sugerem não haver influencia do sirolimo no processo

regenerativo quando utilizamos como parâmetro a fórmula de Kwon.

A análise estatística do índice mitótico foi significativa apenas quando comparados os grupos controles e de estudo entre si ( $p=0,006$  e  $p=0,0003$ , respectivamente). Quando comparados os subgrupos no mesmo período ( $GC_{24h}$  X  $GE_{24h}$  e  $GC_{7d}$  X  $GE_{7d}$ ), não houve diferença estatística. Estes dados sugerem não haver influência do sirolimo na regeneração hepática utilizando a contagem de figuras de mitose pelo HE.

Na análise do PCNA utilizando-se os dados entre os subgrupos no mesmo período ( $GC_{24h}$  X  $GE_{24h}$  e  $GC_{7d}$  X  $GE_{7d}$ ) e entre os grupos controle e estudo ( $GC_{24h}$  X  $GC_{7d}$  e  $GE_{24h}$  X  $GE_{7d}$ ) não houve diferença estatística significativa. Estes dados são semelhantes ao estudo realizado por Chavéz *et al.*<sup>26</sup> que não demonstrou interferência na regeneração hepática pelo sirolimo. Quando se analisa os grupos controle, comparando-se  $GC_{24h}$  X  $GC_{7d}$ , verifica-se uma diminuição percentual nos hepatócitos positivos para PCNA com a evolução do período ( $p=0,30$ ). Esta diminuição, mesmo que estatisticamente não significativa, deve-se ao fato de que a maior proliferação dos hepatócitos ocorre próximo às primeiras 24 horas após a hepatectomia. Ao final dos sete dias, os núcleos não apresentam a cromatina organizada dentro de uma carioteca íntegra e o produto que é detectado pela imunistoquímica se dispersa no citoplasma, impossibilitando sua positividade. Deve-se considerar que, no grupo de estudo, quando comparado o período de 24 horas com o de sete dias, foi encontrado um número percentual semelhante de hepatócitos corados pelo PCNA ( $p=0,97$ ).

Utilizando-se o índice do Ki-67 (percentual de células marcadas/total de células avaliadas) não houve diferença significativa ao serem comparados os dois subgrupos de 24 horas ( $GC_{24h}$  X  $GE_{24h}$ ). Na pesquisa houve diferença estatisticamente significativa ao serem comparados os subgrupos no período de sete dias ( $GC_{7d}$  X  $GE_{7d}$ ) com  $p=0,04$ . Ao final de sete dias de regeneração hepática o grupo de estudo apresentou maior percentual de hepatócitos mar-

cados quando comparado com o grupo controle, demonstrando um maior número de hepatócitos no grupo que usou sirolimo. Este dado poderia sugerir um estímulo na regeneração hepática, entretanto, o pico da produção de DNA seguido da mitose acontece precocemente e, mesmo que ocorram picos subsequentes, estes são de menor intensidade e não refletem grande variação no percentual regenerativo.

No estudo realizado por Palmes *et al.*<sup>27</sup>, com metodologia semelhante ao presente estudo, não foi verificada variação estatística no grupo de sete dias quando utilizado como parâmetro o Ki-67, no entanto, foi verificada variação estatística significativa na análise do fígado no segundo, terceiro e quarto dias. Este estímulo da proliferação celular no fígado, demonstrando um maior número de hepatócitos fora do período  $G_0$ , pode estar relacionado com a inibição das células *natural killer* durante o processo regenerativo. Segundo Tamura *et al.*<sup>28</sup>, o FK506 (tacrolimo) poderia promover a regeneração hepática por inibir a atividade das células *natural killer*. A mesma hipótese poderia ser aplicada para o sirolimo, visto que apresenta estrutura molecular semelhante ao FK506<sup>29-31</sup>.

Nesse contexto, o sirolimo ao inibir a atividade da mTOR (Mammalian target of rapamycin) e a sua via de proliferação celular resultaria também em inibição do sistema imune. A diminuição da atividade hepatolítica das células *natural killer*, por um efeito somatório, resultaria em uma maior regeneração hepática. Ao se comparar os subgrupos de estudo entre si ( $GE_{24h}$  X  $GE_{7d}$ ) e os subgrupos controle entre si ( $GC_{24h}$  X  $GC_{7d}$ ) utilizando o Ki-67, não houve diferença estatística ( $p=0,18$  e  $p=0,12$ , respectivamente).

Ao realizar o presente estudo, utilizando parâmetros como o peso do fígado regenerado, índice mitótico e análise imunistoquímica, não se verificou influência na regeneração hepática nos grupos que utilizaram o sirolimo, exceto na análise com Ki-67 que influenciou positivamente.

## A B S T R A C T

**Objective:** To evaluate the influence of sirolimus on liver regeneration triggered by resection of 70% of the liver of adult rats.

**Methods:** we used 40 Wistar rats randomly divided into two groups (study and control), each group was divided into two equal subgroups according to the day of death (24 hours and seven days). Sirolimus was administered at a dose of 1mg/kg in the study group and the control group was given 1 ml of saline. The solutions were administered daily since three days before hepatectomy till the rats death to removal of the regenerated liver, conducted in 24 hours or 7 days after hepatectomy. Liver regeneration was measured by the KWON formula, by the number of mitotic figures (hematoxylin-eosin staining) and by the immunohistochemical markers PCNA and Ki-67. **Results:** there was a statistically significant difference between the 24h and the 7d groups. When comparing the study and control groups in the same period, there was a statistically significant variation only for Ki-67, in which there were increased numbers of hepatocytes in cell multiplication in the 7d study group compared with the 7d control group ( $p = 0.04$ ). **Conclusion:** there was no negative influence of sirolimus in liver regeneration and there was a positive partial effect at immunohistochemistry with Ki-67.

**Key words:** Liver Regeneration. Sirolimus. Hepatectomy. Proliferating Cell Nuclear Antigen.

## REFERÊNCIAS

- Higgins GM, Anderson RM. Experimental pathology of the liver: Restoration of the liver by the white rat following partial surgical removal. *Arch Pathol.* 1931;12:186-202.
- Court FG, Wemyss-Holden SA, Dennison AR, Maddern GJ. The mystery of liver regeneration. *Br J Surg.* 2002;89(9):1089-95.
- Rozga J. Hepatocyte proliferation in health and in liver failure. *Med Sci Monit.* 2002;8(2):32-8.
- Jesus RP, Waitzberg DL, Campos FG. Regeneração hepática: papel dos fatores de crescimento e nutrientes. *Rev Assoc Med Bras.* 2000;46(3):242-54.
- Liu C, Schreiter T, Frilling A, Dahmen U, Broelsch CE, Gerken G, et al. Cyclosporine A, FK-506, 40-0-[2-hydroxyethyl] rapamycin and mycophenolate mofetil inhibit proliferation of human intrahepatic biliary epithelial cells in vitro. *World J Gastroenterol.* 2005;11(948):7602-5.
- Michalopoulos GK, DeFrances MC. Liver regeneration. *Science.* 1997;276(5309):60-6.
- Michalopoulos GK. Liver regeneration: molecular mechanisms of growth control. *FASEB J.* 1990;4(2):176-87.
- Tarlá MR, Ramalho FS, Ramalho LNZ, Silva TC, Brandão DF, Ferreira J, et al. A molecular view of liver regeneration. *Acta Cir Bras.* 2006;21(1):58-62.
- Tarlá MR, Ramalho FS, Ramalho LNZ, Silva TC, Brandão DF, Ferreira J, et al. Cellular aspects of liver regeneration. *Acta Cir Bras.* 2006;21(1):63-6.
- Fruman DA, Wood MA, Gjertson CK, Katz HR, Burakoff SJ, Bierer BE. FK506 binding protein 12 mediates sensitivity to both FK506 and rapamycin in murine mast cells. *Eur J Immunol.* 1995;25(2):563-71.
- Fausto N. Liver regeneration: from laboratory to clinic. *Liver Transplant.* 2001;7(10):835-44.
- Ramalho FS, Ramalho LNZ, Zucoloto S, Silva Júnior OC. Regeneração hepática: algumas definições num universo de incertezas. *Acta Cir Bras.* 1993;8(4):177-89.
- Nelsen CJ, Rickheim DG, Tuckers 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.
- Watson CJE, Friend PJ, Jamieson NV, Frick TW, Alexander G, Gimson AE, et al. Sirolimus: a potent new immunosuppressant for liver transplantation. *Transplantation.* 2002;6(4):505-9.
- Kwon AH. Effect of administration of fibronectin or aprotinin on liver regeneration after experimental hepatectomy. *Ann Surg.* 1990;211(3):295-300.
- Biondo-Simões MLP, Greca FH, Smaniotto GH, Techy F, Soares DP, Kannenberg C, et al. Efeito da histamina na regeneração hepática estudo experimental em ratos. *Acta Cir Bras.* 2000;15(1):350-6.
- Assy N, Gong Y, Zhang M, Pettigrew NM, Pashniak D, Minuk GY. Use of proliferating cell nuclear antigen as a marker of liver regeneration after partial hepatectomy in rats. *J Lab Clin Med.* 1998;131(3):251-6.
- Assy N, Minuk GY. Liver Regeneration: Methods for Monitoring their Applications. *J Hepatol.* 1997;26(4):945-52.
- Ben-izhak O, Bar-chana M, Sussman L, Dobiner V, Sandbank J. Ki67 antigen and PCNA proliferation markers predict survival in anorectal malignant melanoma. *Histopathology.* 2002;41(6):519-25.
- Bravo R, Frank R, Blundell PA, Bravo HM. Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase delta. *Nature.* 1987;326(6112):515-7.
- Brown DC, Gatter KC. Ki-67 protein: the immaculate deception? *Histopathology.* 2002;40(1):2-11.
- Fausto N. Liver regeneration. *J Hepatol.* 2002;32(19):1477-87.
- Michalopoulos GK. Liver regeneration. *J Cell Physiol.* 2007;213(2):286-300.
- Koniaris LG, Mckillop I, Schwartz SI, Zimmers TA. Liver regeneration. *J Am Col Surg.* 2003;197(4):634-48.
- LaBrecque D. Liver regeneration: a picture emerges from the puzzle. *Am J Gastroenterol.* 1994;89(8 Suppl):S86-96.
- Chaves R, Jamieson N, Takamori S, Nivatvongs S, Pino G, Metcalfe A, et al. Hepatotrophic effect of cyclosporine and FK 506 is not mimicked by rapamycin. *Transplant Proc.* 1999;31(6):2429.
- Palmes D, Zibert A, Budny T, Bahde R, Minin E, Kobschull L, et al. Impact of rapamycin on liver regeneration. *Virchows Arch.* 2008;452(5):545-57.
- Tamura F, Masuhara A, Sakaida I, Fukumoto E, Nakamura T, Okita K. FK506 promotes liver regeneration by suppressing natural killer cell activity. *J Gastroenterol Hepatol.* 1998;13(7):703-8.
- Francavilla A, Starzl TE, Carr B, Azzarone A, Carrieri G, Zeng Q, et al. The effects of FK 506, cyclosporine, and rapamycin on liver growth in vitro and in vivo. *Transplant Proc.* 1991;23(6):2817-20.
- Francavilla A, Vujanovic NL, Polimeno L, Azzarone A, Iacobellis A, Deleo A, et al. The in vivo effect of hepatotrophic factors augments liver regeneration, hepatocyte growth factor, and insulin-like growth factor-II on liver natural killer cell functions. *Hepatology.* 1997;25(2):411-5.
- 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(2):622-6.

Recebido em 15/06/2013

Aceito para publicação em 25/07/2013

Conflito de interesse: nenhum.

Fonte de financiamento: nenhuma.

**Endereço para correspondência:**

Edimar Leandro Toderke

E-mail: edimar.toderke@pucpr.br