

# Avaliação da regeneração hepática com dieta suplementada com L-glutamina: estudo experimental em ratos

## *Liver regeneration with L-glutamine supplemented diet: experimental study in rats*

CIBELLE RIBEIRO MAGALHÃES<sup>1</sup>; OSVALDO MALAFAIA, ECBC-PR<sup>1</sup>; ORLANDO JORGE MARTINS TORRES, TCBC-MA<sup>2</sup>; LUCIANE BUGMANN MOREIRA<sup>1</sup>; SILVIA CARMEN DA SILVA GONÇALVES TEFIL<sup>1</sup>; MATHEUS DA ROCHA PINHERIO<sup>3</sup>; BRUNA AYUMI HARADA<sup>3</sup>

### R E S U M O

**Objetivo:** Avaliar a regeneração hepática em ratos submetidos à hepatectomia de 60% com e sem suplementação de L-glutamina através de alteração ponderal do fígado, parâmetros laboratoriais e estudo histológico. **Métodos:** Foram usados 36 ratos machos, distribuídos em dois grupos: grupo controle e grupo glutamina. Cada um foi subdividido em mais três subgrupos com óbito em 24h, 72h e sete dias. O grupo glutamina recebeu água e dieta padrão suplementada com L-glutamina e o controle solução fisiológica a 0,9%. Em todos os subgrupos foi feita análise da regeneração hepática através da fórmula de Kwon, estudo da função hepática (AST, ALT, gama GT, bilirrubina total, bilirrubina indireta e indireta e albumina) e análise de mitose celular pela coloração de Hematoxilina – Eosina. **Resultados:** Nos dois grupos houve regeneração hepática pelo ganho ponderal. Gama GT aumentou significativamente no grupo controle ( $p < 0,05$ ) já albumina aumentou no da glutamina. Os demais indicadores da função hepática não apresentaram diferenças significantes. A análise histológica em 72h mostrou maior número de mitoses no grupo glutamina, não havendo diferença nos demais subgrupos. **Conclusão:** A suplementação de L-glutamina à dieta é benéfica para a regeneração hepática.

**Descritores:** Avaliação. Hepatectomia. Regeneração hepática. Dieta. Glutamina.

### INTRODUÇÃO

O fígado é considerado um dos órgãos mais complexos do corpo humano. Ele tende a manter a mesma massa ao longo de toda a vida, e para tal necessita de regeneração<sup>1</sup>.

Os bons resultados em hepatectomias extensas são constantes graças às técnicas operatórias e manejo perioperatório mais aprimorados, bem como à capacidade de regeneração do fígado<sup>2</sup>.

Em seres humanos, a regeneração após ressecção hepática acontece em três meses; no rato em sete a dez dias, por isso, o modelo experimental para avaliar regeneração hepática em ratos é muito utilizado e eficiente<sup>3</sup>.

Em evento com perda substancial de tecido, como na hepatectomia, ocorre divisão celular, intenso crescimento de tecido promovendo a regeneração e alteração da função do órgão. A capacidade energética e de síntese da massa hepática neoformada é mantida. Este processo implica em hiperplasia celular compensatória e hipertrofia, controlado e mediado por nutrientes e fatores de crescimento<sup>2</sup>.

O uso de dietas enriquecidas com glutamina mostrou benefícios para pacientes cirúrgicos; assim, é interessante que se pesquise a relação da regeneração hepática com o uso suplementar de glutamina. Provavelmente os benefícios da suplementação com dipeptídeos são devidos à sua participação na ureagênese, gliconeogênese e síntese de proteínas<sup>4</sup>.

Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a regeneração hepática em ratos submetidos à hepatectomia de aproximadamente 60% com e sem suplementação de L-glutamina através de alteração ponderal do fígado, parâmetros laboratoriais e estudo histológico.

### MÉTODOS

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética e Experimentação Animal da Universidade Estadual do Maranhão sob número 036/2012.

Utilizou-se 36 ratos (*Rattus norvegicus albinus*, Rodentia mammalia), da linhagem Wistar, machos, adul-

1. Programa de Pós Graduação em Princípios da Cirurgia do Instituto de Pesquisas Médicas da Faculdade Evangélica do Paraná/Hospital Universitário Evangélico de Curitiba, Curitiba, PR, Brasil; 2. Departamento de Cirurgia da Universidade Federal do Maranhão (UFMA) – UFMA, São Luis, MA, Brasil; 3. Curso de Medicina da Faculdade Evangélica do Paraná/Hospital Universitário Evangélico de Curitiba, Curitiba, PR, Brasil.

tos, pesando entre 195 e 330g. Foram acomodados quatro animais por gaiola, receberam livremente água e ração padrão para espécie (Purina® Labina), sob temperatura de  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ , em ambiente arejado e sem ruídos, obedecendo ao ciclo claro/escuro de 12h. Eles foram distribuídos aleatoriamente em 18 animais por grupo. O primeiro, foi definido como controle e o segundo, recebeu L-glutamina. Ambos foram subdivididos em três subgrupos: morte em 24h, 72h e sete dias.

Após jejum pré-operatório de 6h, e 15min antes do ato operatório, foi administrada por gavagem com sonda plástica, a primeira dose de L-glutamina (1ml por 100g de peso corporal). No grupo controle foi introduzido o mesmo volume por 100g de peso corporal de soro fisiológico a 0,9%.

Os animais foram anestesiados após pesagem em balança eletrônica digital. Administração do anestésico foi por injeção intramuscular de 40mg/Kg de ketamina a 5% e 10mg/Kg de xilazina a 2%, aplicados na face posterior da coxa. A analgesia pós-operatória foi feita com aplicação de dipirona na dose de 0,1ml (apresentação 500mg/ml).

A ressecção hepática (de 60%) foi padronizada de acordo com o peso do animal e o peso do fígado; isto foi estabelecido após medição em quatro animais fora do estudo exclusivamente para esta função, tendo em conta a proporção rato/fígado. Seis horas após o ato operatório, os ratos tiveram livre acesso à água e após 12h à alimentação padrão; o grupo glutamina além de água e alimentação recebeu uma vez ao dia no mesmo horário por gavage 1ml de solução de L-glutamina e o controle 1ml de solução de cloreto de sódio a 0,9%.

Em cada subgrupo foi coletado 4ml de sangue para análise da função hepática (AST, ALT, gama GT, bilirrubinas e albumina); em seguida, foram mortos por overdose anestésica. O fígado foi retirado, exsanguinado, pesado e fotografado. Para calcular a taxa de regeneração baseada no peso foi utilizada a fórmula de Kwon *et al*, ou seja: % de regeneração =  $D/E \times 100$  ( $E = R/0,7$  - onde D= peso do fígado por 100 g do peso do animal no dia do sacrifício, E= estimativa do fígado ressecado por 100 g antes da hepatectomia e R= peso do fígado ressecado).

As peças cirúrgicas retiradas no dia do experimento foram imersas em formaldeído a 10% e então encaminhadas ao laboratório de patologia para cortes histológicos e coloração por H-E.

Para a análise estatística foi usado o programa SPSS for Windows 17.0 (2007). Primeiramente foi realizado o teste de normalidade de Shapiro-Wilk e apenas as variáveis peso inicial e final do animal, peso final do fígado e ALT apresentaram distribuição normal ( $p > 0,05$ ); as demais não. Nas variáveis com distribuição normal foi aplicado o teste de Análise de Variância Multivariada (MANOVA) com dois fatores (grupo e tempo) e depois o teste de Tukey para fazer as comparações post hoc em relação ao tempo. Nas variáveis sem distribuição normal foram aplicados os testes não paramétricos de Mann-Whitney para avaliar o efeito do grupo e o teste de Kruskal-Wallis para o tempo.

O nível de significância para se rejeitar a hipótese de nulidade foi de 5%, ou seja, foi considerado como estatisticamente significativo valor de  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

No grupo glutamina, um animal morreu nas primeiras 24h após a operação, antes do tempo previsto para seu grupo e foi relacionada à indução anestésica. Portanto este animal foi retirado da análise.

Quando analisados o peso inicial dos ratos e do fragmento hepático ressecado eles foram comparáveis inter e intra-grupos ( $p < 0,05$ ).

Avaliando-se os resultados do ganho ponderal do fígado em relação ao tempo de óbito, observou-se que grupo glutamina e controle juntos, e em ambos os grupos analisados separadamente, houve ganho ( $p < 0,05$ ); embora não significativo, ele foi maior no grupo controle (Figura 1).

Avaliando a função hepática em relação aos grupos, observaram-se alterações da gama GT e albumina em ambos os grupos; porém, o da glutamina foi melhor (Tabela 1).

Foi realizada análise da regeneração hepática utilizando o número de mitoses (Tabela 2); observou-se que entre os grupos não houve significância estatística, mas quando avaliados os tempos de óbito dentro de cada grupo (controle e glutamina), destaca-se o aumento das mitoses nas 72h (Figuras 3 e 4).

Quando avaliado o posto médio, observou-se que a regeneração hepática foi melhor nas 72h no grupo glutamina em relação ao controle (Figura 2).

## DISCUSSÃO

São conhecidas complexas interações entre nutrição, função da barreira mucosa, imunorregulação e afecções graves, e hoje há esperanças de que determinadas formas de terapia nutricional possam ter benefícios em doenças específicas. Várias formulações contêm nutrientes considerados não essenciais, mas que em determina-

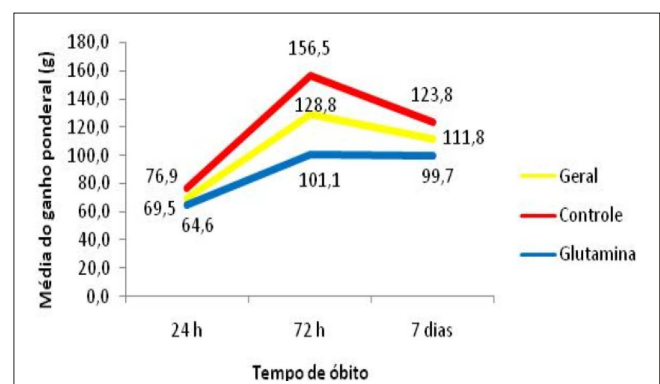


Figura 1 - Ganho ponderal do fígado em relação ao tempo.

**Tabela 1** - Avaliação da função hepática entre grupos.

Variável	Grupo	n	Mediana	p
AST	Controle	18	243,5 a	0,064
	Glutamina	17	318,0 a	
ALT	Controle	18	164,5 a	0,448
	Glutamina	17	202,0 a	
Gama GT	Controle	18	5,0 a	<b>0,015</b>
	Glutamina	17	2,5 b	
Bilirrubina total	Controle	18	0,90 a	0,722
	Glutamina	17	0,90 a	
Bilirrubina indireta	Controle	18	0,30 a	0,242
	Glutamina	17	0,30 a	
Bilirrubina direta	Controle	18	0,60 a	0,541
	Glutamina	17	0,60 a	
Albumina	Controle	18	0,90 b	<b>0,027</b>
	Glutamina	17	1,00 a	

**a, b** (letras diferentes) significam  $p < 0,05$  em relação ao tempo

**Tabela 2** - Análise das mitoses.

Grupo	Tempo	N	Mediana	p
Controle		<b>18</b>	4,0 <b>A</b>	0,056
	24 h	6	7,5 <b>a</b>	0,088
	72 h	6	10,5 <b>a</b>	
	7 dias	6	2,0 <b>a</b>	
Glutamina		<b>17</b>	1,0 <b>A</b>	
	24 h	5	1,0 <b>b</b>	
	72 h	6	6,0 <b>a</b>	
	7 dias	6	1,0 <b>b</b>	

A =  $p > 0,05$  para grupo

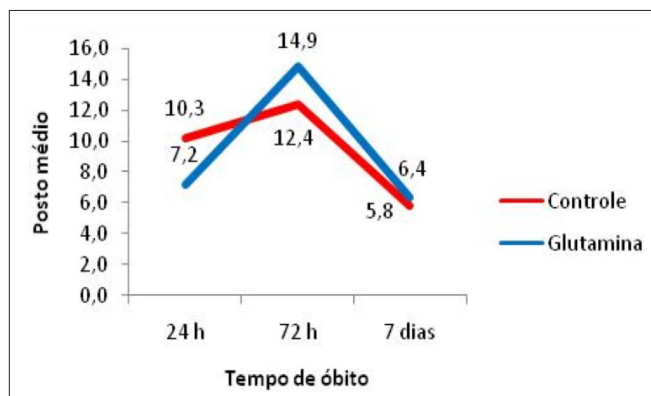
**a, b** (letras diferentes) significam  $p > 0,05$  para o tempo dentro do grupo

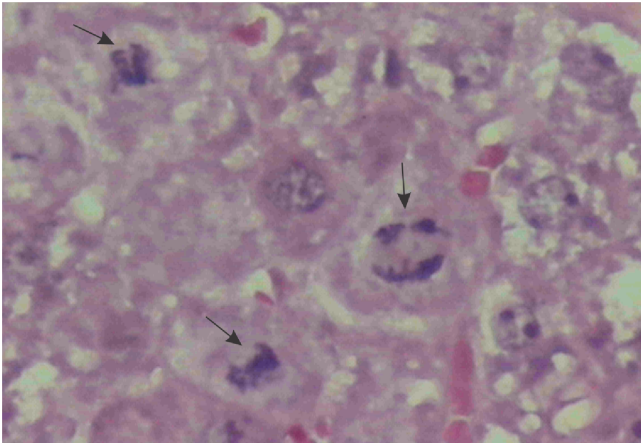
dos agravos tornam-se condicionalmente essenciais. Dentre estes nutrientes estão: glutamina, arginina e os ácidos graxos ômega-3<sup>6</sup>.

A glutamina tem sido indicada como detentora de inúmeras propriedades que favorecem a regeneração de

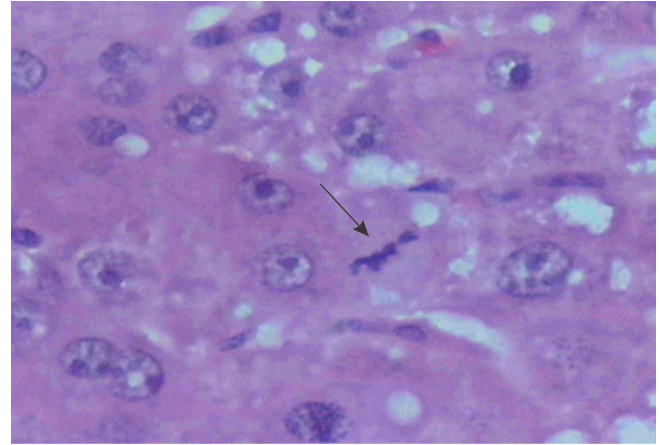
muitos tecidos, assim como do hepático. O estudo dessas propriedades tornou-se cada vez mais importante<sup>7</sup>. Dados de metanálise realizada por Novak *et al.*<sup>8</sup>, revelaram que a suplementação com glutamina pode estar associada com a redução de complicações infecciosas, estresse oxidativo e taxas de mortalidade em pacientes gravemente enfermos.

A regeneração hepática avaliada pela fórmula de Kwon no trabalho de Gama-Filho *et al.*<sup>9</sup>, foi significativa tanto no grupo controle como no experimento (uso de Tacrolimus) nas primeiras 24h e no sétimo dia pós-hepatectomia. Quando foram comparados os valores dentro de cada grupo houve aumento em ambos, mais pronunciado no grupo de estudo. Estudo semelhante aos destes autores, também utilizando a fórmula de Kwon para calcular a taxa de regeneração hepática em ratos, revelou que o remanescente hepático ganhou maior volume nos dois grupos (controle/experimento) tanto com 24h quanto com sete dias, mas sem significância estatística. O grupo experimento utilizou glutamina suplementada na dose 50µg/dia por via oral<sup>7</sup>.

**Figura 2** - Número de mitoses em relação ao grupo.



**Figura 3** - Fotomicrografia de corte hepático do grupo glutamina corado pelo he - presença de mitose (setas).



**Figura 4** - Fotomicrografia de corte hepático do grupo controle corado pelo he - presença de mitose (seta).

Os resultados deste trabalho quanto à taxa de regeneração hepática pela fórmula de Kwon mostram ganho ponderal estatisticamente significativo do fígado remanescente em ambos os grupos (controle/glutamina), quando comparado ao tempo do experimento, porém, mais significativo no grupo controle. Na comparação entre os grupos a diferença foi significativa apenas nas 72h, melhor no grupo controle.

Neste estudo, quando os exames laboratoriais foram avaliados, houve elevação dos valores de albumina comparando o grupo glutamina com o controle ( $p=0,027$ ). Já os níveis de gama GT aumentaram no grupo controle em relação ao da glutamina ( $p=0,015$ ). Vários testes bioquímicos podem ser usados para avaliar o perfil hepático, como dosagem da alanina-aminotransferase (ALT), da aspartatoaminotransferase (AST), relação AST/ALT, gama glutamiltranspeptidase (GGT), fosfatase alcalina, tempo de protrombina, albumina e bilirrubinas. Entretanto, a doença hepática grave pode manifestar níveis normais de enzimas hepáticas, ou causar alterações de 1,5 a 3 vezes acima dos níveis de referência<sup>10</sup>. Em estudo experimental em ratos com suplementação de dieta imunomoduladora, Torres *et al.*<sup>11</sup> observaram aumento dos valores de albumina no grupo suplementado com imunonutrição.

O aumento progressivo do fígado se deve a dois picos de mitoses, encontrados normalmente duran-

te o processo de regeneração. O primeiro ocorre nas primeiras 24h após a hepatectomia e está relacionado exclusivamente aos hepatócitos<sup>12</sup>. O segundo se dá com a participação de células não parenquimatosas e em ratos ocorre em 72h, sendo evidente nas ressecções hepáticas maiores que 50%<sup>13</sup>. A suplementação de glutamina à dieta de ratos leva à maior replicação de hepatócitos com 24h sendo benéfica à regeneração hepática<sup>7</sup>. Em seu estudo, testando o efeito do Tacrolimus sobre a regeneração hepática, Gama-Filho *et al.*<sup>9</sup> encontraram diferença estatística inter e intra-grupo nos períodos de 24h e sete dias, com aumento progressivo do índice mitótico, concluindo portanto que quanto mais tempo sob a ação do Tacrolimus maior o efeito positivo na regeneração hepática, o que não corrobora com os resultados deste trabalho, onde encontrou-se maior número de mitoses intra-grupo (grupo glutamina) apenas nas 72h de experimento ( $p=0,003$ ). Entre os grupos houve tendência à significância estatística ( $p=0,056$ ). Tarla *et al.*<sup>1</sup>, destacaram que após 72h o aspecto histológico do tecido hepático muda bastante em relação ao tecido normal, com proliferação de hepatócitos em aglomerados não vascularizados e ainda sem síntese de nova matriz extracelular.

Concluimos que a suplementação de L-glutamina à dieta foi benéfica para a regeneração hepática.

## A B S T R A C T

**Objective:** To assess liver regeneration in rats after 60% hepatectomy with and without supplementation of L-glutamine through liver weight changes, laboratory parameters and histological study. **Methods:** 36 male rats were divided into two groups: glutamine group and control group. Each group was subdivided into three subgroups, with death in 24h, 72h and seven days. The glutamine group received water and standard diet supplemented with L-glutamine, and the control received 0.9% saline. In all subgroups analysis of liver regeneration was made by the Kwon formula, study of liver function (AST, ALT, GGT, total bilirubin, indirect and indirect bilirubin and albumin) and analysis of cell mitosis by hematoxylin-eosin. **Results:** In both groups there was liver regeneration by weight gain. Gamma-GT increased significantly in the control group ( $p < 0.05$ ); albumin increased in the glutamine group. The other indicators of liver function showed no significant differences. Histological analysis at 72h showed a higher number of mitoses in the glutamine group, with no differences in other subgroups. **Conclusion:** Diet supplementation with L glutamine is beneficial for liver regeneration.

**Key words:** Evaluation. Hepatectomy. Liver regeneration. Diet. Glutamine.

## REFERÊNCIAS

1. Tarlá MR, Ramalho F, Ramalho LNZ, Castro e Silva T, Brandão DF, Ferreira J, et al. Cellular aspects of liver regeneration. *Acta Cir Bras.* 2006;21(Suppl 1):63-6.
2. Kurokawa T, An J, Tsunekawa K, Shimomura Y, Kazama S, Ishikawa N, et al. Effect of L-arginine supplement on liver regeneration after partial hepatectomy in rats. *World J Surg Oncol.* 2012;10:99.
3. Torres OJM, Arraes LRG, Ferreira EDZ, Coutinho IHLS, Dominici AJ. Hepatectomia central. *ABCD arq bras cir dig.* 2005;18(1):30-2.
4. Naka S, Saito H, Hashiguchi Y, Lin MT, Furukawa S, Inaba T, et al. Alanyl-glutamine-supplemented total parenteral nutrition improves survival and protein metabolism in rat protracted bacterial peritonitis model. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 1996;20(6):417-23.
5. Kwon AH, Uetsuji S, Yamamura M, Hioki K, Yamamoto M. Effect of administration of fibronectin or aprotinin on liver regeneration after experimental hepatectomy. *Ann Surg.* 1990;211(3):295-300.
6. Okawa L. Influência da suplementação enteral pré-operatória com dieta enriquecida com arginina, ácidos graxos ômega-3, nucleotídeos e oligoelementos na cicatrização de anastomoses colônias em ratos: estudos tensiométrico e da densitometria do colágeno [dissertação]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, Faculdade de Medicina; 2009.
7. Biondo-Simões MLP, Matias JEF, Martone D, Barbosa RF, Ogawa GH. Influência da glutamina na regeneração hepática. *Rev med (São Paulo).* 2007;86(4):219-23.
8. Novak F, Heyland DK, Avenell A, Drover JW, Su X. Glutamine supplementation in serious illness: a systematic review of the evidence. *Crit Care Med.* 2002;30(9):2022-9.
9. Gama Filho O, Toderke EL, Baretta GAP, Sakamoto DG, Agulham MA, Tambara EM, et al. Imunossupressão com tacrolimus favorece a regeneração hepática induzida por hepatectomia extensa em ratos. *ABCD arq bras cir dig.* 2010;23(2):74-80.
10. Zamin Jr I, Matos AA, Perin C, Ramos GZ. A importância do índice AST/ALT no diagnóstico da esteatohepatite não-alcólica. *Arq Gastroenterol.* 2002;39(1):22-6.
11. Torres OJM, Campos ACL, Malafaia O, Melo TCM, Marques SG, Dietz UA. Translocação bacteriana: efeito de dieta imunoestimuladora em ratos com oclusão intestinal. *Rev Col Bras Cir.* 1999;26(1):1-6.
12. Fausto N, Riehle KJ. Mechanisms of liver regeneration and their clinical implications. *J Hepatobiliary Pancreat Surg.* 2005;12(3):181-9.
13. Koniaris LG, Mckillop IH, Schwartz SI, Zimmers TA. Liver regeneration. *J Am Coll Surg.* 2003;197(4):634-59.

Recebido em 03/01/2013

Aceito para publicação em 08/02/2013

Conflito de interesse: nenhum.

Fonte de financiamento: nenhuma.

### Como citar este artigo:

Magalhães CR, Malafaia O, Torres OJM, Moreira LB, Tefill SCSG, Pinheiro MR, Harada BA. Avaliação da regeneração hepática com dieta suplementada com L-Glutamina: estudo experimental em ratos. *Rev Col Bras Cir.* [periódico na Internet] 2014;41(2). Disponível em URL: <http://www.scielo.br/rcbc>

### Endereço para correspondência:

Cibelle Ribeiro Magalhães

E-mail: [cibelle.magalhaes@hospitalsaodomingos.com.br](mailto:cibelle.magalhaes@hospitalsaodomingos.com.br)