

Avaliação da regeneração hepática com dieta suplementada com ácidos graxos ômega-3: estudo experimental em ratos

Evaluation of liver regeneration diet supplemented with omega-3 fatty acids: experimental study in rats

ROSILDA MENDES DA SILVA^{1,2}; OSVALDO MALAFAIA, ECBC-PR¹; ORLANDO JORGE MARTINS TORRES, TCBC-MA^{2,3}; NICOLAU GREGORI CZEZCKO, TCBC-PR¹; CARLOS HESPANHA MARINHO JUNIOR¹; RONALDO KIVIATCOSKI KOZLOWSKI¹

R E S U M O

Objetivo: avaliar a regeneração hepática em ratos submetidos à hepatectomia parcial de 60% com e sem ação de dieta suplementada com ácidos graxos ômega-3 através do estudo ponderal do fígado regenerado, parâmetros laboratoriais da função hepática e estudo histológico. **Métodos:** foram usados 36 ratos machos, distribuídos em dois grupos: grupo controle e grupo ômega-3. Cada um foi subdividido em mais três subgrupos com óbito em 24h, 72h e sete dias. O grupo ômega-3 recebeu água e dieta padrão suplementada com emulsão lipídica de ácidos graxos ômega-3 a 10% 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: dosagem de AST, ALT, gama-GT, bilirrubina total, bilirrubina indireta e indireta e albumina, e análise de mitose celular pela coloração de Hematoxilina-Eosina. **Resultados:** o grupo com dieta suplementada não apresentou diferença estatística ($p>0,05$) quanto à evolução dos pesos. Administração de ácidos graxos ômega-3 pós-hepatectomia mostrou que os níveis de gama-GT tiveram redução significativa, podendo refletir na regeneração hepática. Na avaliação do índice mitótico não houve diferença entre os momentos estudados. **Conclusão:** a suplementação com ácidos graxos ômega-3 em ratos submetidos à ressecção hepática a 60% não apresentou papel expressivo relacionados à regeneração do fígado.

Descritores: Hepatectomia. Regeneração Hepática. Ácidos graxos. Ácidos Graxos Ômega-3.

INTRODUÇÃO

O início da evolução da cirurgia hepática foi em 1716, com a realização de uma ressecção parcial do fígado em paciente vítima de trauma. Contudo, a primeira ressecção hepática bem sucedida foi realizada em 1888 por Langenbuch e a técnica do controle vascular, que possibilitou grande melhora no procedimento, foi introduzida por Pringle em 1908¹.

Nas últimas décadas, a segurança cirúrgica aumentou consideravelmente graças às novas técnicas, novos equipamentos e materiais, reduzindo a morbiletalidade dos pacientes submetidos à hepatectomia².

Outros conhecimentos surgiram nos últimos anos sobre os elementos envolvidos no processo de regeneração hepática e o efeito específico dos fatores de crescimento, tais como o do crescimento do hepatócito, o transformador do crescimento-alfa, o de crescimento epidérmico e de fibroblastos, os quais determinam estímulo mitogênico que atinge outras células hepáticas³.

A regeneração do fígado é um fenômeno celular que confere capacidade especial de resposta aos estí-

mulos lesivos. Difere de outros tipos de regeneração, na medida em que não há propriamente uma reconstituição da estrutura prévia à lesão. Em condições normais, o fígado mantém renovação celular basal muito baixa, onde o tempo de vida média de um hepatócito adulto varia entre 200 e 300 dias. Após a hepatectomia, ocorre rápido aumento dos níveis da interleucina 6 (IL-6) e do fator de necrose tumoral (TNF- α)⁴.

É conhecido que o estado nutricional do paciente influencia diretamente na capacidade regenerativa do fígado, além de possuir papel importante na regulação nutricional, por metabolizar, distribuir e usar apropriadamente os nutrientes⁵. Alterações no estado nutricional do paciente com cirrose, principalmente a desnutrição calórico-protéica, podem contribuir para a baixa resistência às infecções, retenção de líquidos e atraso na cicatrização, aumentando a morbiletalidade após procedimentos cirúrgicos⁶.

Alguns nutrientes específicos, denominados farmaconutrientes, demonstraram em estudos clínicos e laboratoriais possuírem a capacidade de modular a resposta imunológica e inflamatória de animais e seres huma-

1. Programa de Pós-graduação em Princípios da Cirurgia da Faculdade Evangélica do Paraná/Hospital Universitário Evangélico de Curitiba, Curitiba, PR, Brasil; 2. Hospital São Domingos, São Luis, MA, Brasil; 3. Universidade Federal do Maranhão, São Luis, MA, Brasil.

nos. Dentre eles os que têm maior relevância e ação imunomoduladora são: arginina, glutamina, ácidos graxos ômega-3 e nucleotídeos⁷.

O uso de dietas enriquecidas com ácidos graxos ômega-3 mostrou benefícios na regeneração hepática em ratos que foram submetidos à hepatectomia parcial de 90%⁸. Dessa maneira, é interessante que se estude a relação da dieta suplementada por imunonutrição com ácidos graxos ômega-3 e regeneração do fígado. Redução das citocinas pró-inflamatória e aumento da expressão de citocinas como um agente anti-inflamatório podem retardar o processo de insuficiência hepática aguda e promover o processo de regeneração hepática⁸.

Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a regeneração hepática em ratos submetidos à hepatectomia de aproximadamente 60% com e sem ação de dieta suplementada com ácidos graxos ômega-3 através do estudo ponderal do fígado regenerado, parâmetros laboratoriais da função hepática e estudos histológicos.

MÉTODOS

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética e Experimentação Animal, Universidade Estadual do Maranhão, São Luis, MA, Brasil sob o protocolo 036/12. Foram utilizados 36 ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*, Rodentia mammalia), machos, adultos, pesando entre 195 e 330 g. A pesquisa foi realizada no Laboratório de Cirurgia Experimental da Universidade Federal do Maranhão. Os animais foram acomodados três por gaiola recebendo água e ração padrão para espécie (Purina®Labina), sob temperatura de 23±2°C, em ambiente arejado, sem ruídos e ciclo claro/escuro de 12 em 12 horas. Foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos de 18, e todos submetem-se à mesma hepatectomia.

O primeiro foi o grupo controle; os animais receberam nutrição por via oral em quantidade adequada para sua espécie, idade e peso. Para determinar essa quantidade, foi feito um experimento durante 24h onde um rato foi alimentado livremente e a ração pesada antes da administração e também no final. Ressalta-se que no final de 24h a ração foi pesada novamente incluindo o resto que estava depositado no fundo da gaiola. Assim, obteve-se a quantidade exata que o animal consumiria em um dia. Após conhecer esse valor, o grupo controle foi alimentado diariamente com essa quantidade de ração, e a água foi oferecida livremente acrescida de infusão de soro fisiológico (1ml/100g).

No segundo grupo, além de serem alimentados com ração, foi administrada 15 minutos antes do procedimento cirúrgico 1ml/100g da emulsão lipídica de ômega-3 a 10%, da seguinte formulação: ômega-3 (10%), carboximetilcelulose (0,2%), Tween (50%), água destilada q.s.p (100%). Foi feita uma dose igual a cada 24h até a data da morte, administrada por gavagem para garantir o

recebimento total do nutriente. O que caracterizava cada subgrupo era o tempo de suplementação pré-operatória em 24h, 72h e sete dias.

O controle do peso foi realizado no início do experimento após a aclimação e diariamente nas fases pré e pós-operatórias. As medidas foram utilizadas a fim de se realizar o cálculo das doses diárias das dietas a serem suplementadas.

A ressecção hepática foi padronizada de acordo com o peso do animal e o peso do fígado. Isto foi estabelecido após teste em quatro ratos fora do estudo. Eles foram pesados vivos, e definidos a média de peso. Depois, foram anestesiados e sacrificados, tendo seus fígados retirados para pesagem e definida a proporção rato/fígado. Após realização do inventário da cavidade, localizou-se o fígado e em seguida fez-se ressecção do ligamento hepático. O segmento ressecado foi pesado em balança de precisão. O cálculo da taxa de regeneração baseada no peso foi feito através da fórmula de Kwon *et al.*⁹: % de regeneração = D/E x 100 (D=peso do fígado por 100g do peso do animal no dia da morte; E = R/0,7; E = estimativa do fígado ressecado por 100g antes da hepatectomia, que é calculada pelo peso do fígado ressecado (R).

Os lobos hepáticos ressecados foram conservados em formol a 10% e posteriormente encaminhados para estudo histopatológico, corando-se os cortes histológicos por H&E. A análise foi realizada por um único patologista sem conhecimento dos grupos em estudo. Ao fim do procedimento cirúrgico, cada rato foi colocado em gaiola isolada para recuperação anestésica e mantido em ar ambiente até completa recuperação. A analgesia pós-operatória foi feita com aplicação de 0,1ml de dipirona 500mg/ml, intramuscular no membro posterior esquerdo.

Seis horas após o ato operatório, os ratos tiveram livre acesso à água e após 12h à alimentação, acondicionados nas mesmas condições de temperatura e luminosidade do pré-operatório. Foram diariamente avaliados verificando-se o peso, as condições comportamentais e o aspecto da ferida operatória.

Em cada subgrupo foi coletado 4ml de sangue da veia cava caudal, colocados em tubo de ensaio para análise de: albumina, proteína total, globulina, bilirrubinas total, direta e indireta, ureia, creatinina, AST, ALT, gama-GT, glicemia e fosfatase alcalina.

Para análise estatística, os dados foram avaliados pelo programa SPSS for Windows 20 (2011). Inicialmente foi feito o teste de normalidade de Shapiro-Wilk, e somente as variáveis peso inicial do rato, percentual de regeneração final do fígado, glicemia, creatinina e fosfatase alcalina apresentaram distribuição normal (p>0,05). As demais distribuições foram assimétricas (p<0,05). 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 pos-hoc em relação ao tempo. Nas variáveis que não possuíram distribuição normal, foram aplicados os

testes não paramétricos de Mann-Whitney para se avaliar o efeito do grupo e o teste Kruskal-Wallis o efeito do tempo. O nível de significância para se rejeitar a hipótese de nulidade foi 5%, ou seja, considerou-se como significante valor de $p < 0,05$.

RESULTADOS

No grupo ômega-3 um animal morreu nas primeiras 24h após a operação. Quando foram analisados os pesos inicial do fígado e do fragmento hepático ressecado, eles foram comparáveis ($p < 0,05$) (Tabela 1).

Avaliando-se os resultados do ganho ponderal do fígado em relação ao tempo de óbito, usando a fórmula de Kwon⁹, observou-se que não houve diferença entre o grupo ômega-3 e o controle ($p > 0,05$) (Tabela 2).

Avaliando a função hepática em relação aos grupos através dos parâmetros laboratoriais, observaram-se alterações de gama-GT em ambos os grupos (Tabela 3). Entretanto, o grupo ômega-3 apresentou níveis menores quando comparados com o controle ($p < 0,05$).

Quando realizada a comparação dos grupos controle e ômega-3 em relação ao número de mitoses (Tabela 4), os resultados mostraram que não houve diferença entre os dois grupos ($p = 0,215$). Em relação ao dias de morte, tanto entre o grupo controle e ômega-3, não se observou diferença significativa ($p > 0,05$) (Figuras 1 e 2).

DISCUSSÃO

A utilização da suplementação pré e pós-operatória em ratos, neste estudo, baseou-se em comprovações clínicas e experimentais de que ela pode interferir de forma benéfica na regeneração hepática, embora os mecanismos exatos de regeneração não estejam claramente entendidos^{7,10}. A suplementação diária neste experimento foi realizada por meio de gavagem, para que fosse assegurada a administração correta das doses de dieta calculadas pelo peso do animal. São descritos problemas com esse processo em modelos animais, como o estresse pelo próprio procedimento, ou lesões de boca, esôfago e estômago. Através de treinamento prévio, utilização de sedação e padronização do procedimento, a gavagem pôde ser realizada com segurança, sem complicações perceptíveis. Para diminuir o risco de regurgitação, o rato foi mantido com a porção cefálica mais elevada que a caudal após a gavagem.

Diversos são os estudos que mostraram os benefícios com a utilização de suplementação com arginina, ácidos graxos ômega-3 e nucleotídeos na diminuição de complicações infecciosas e no tempo de internação em pacientes críticos e operados¹¹⁻¹³.

O processo de regeneração hepática depois de desencadeado pode ser avaliado por diversos métodos: peso do fígado, número de mitoses, componentes do ácido desoxirribonuclêico, índice de síntese dos antígenos

Tabela 1 - Avaliação do peso inicial do fígado e percentual de hepatectomia entre os grupos controle e ômega-3.

Grupo	Controle		Ômega 3		p
	N	Mediana	N	Mediana	
Peso inicial do fígado	18	4,8	18	5,4	0,141
% de hepatectomia	18	51,5	18	56,6	0,181

Teste de Mann-Whitney em relação ao grupo.

Tabela 2 - Análise do percentual de regeneração hepática utilizando a fórmula de Kwon⁹.

Grupo	Tempo	N	Mediana	Posto médio	p
Controle		18	101,5	19,1	0,715
	24 h	6	1,1	5,3	0,013
	72 h	6	80,0	8,8	
	7 dias	6	144,1	14,3	
Ômega-3		18	78,9	17,9	
	24 h	6	0,2	5,7	0,086
	72 h	6	115,8	12,2	
	7 dias	5	81,0	10,7	

Teste de Kruskal-Wallis em relação ao tempo.

Tabela 3 - Avaliação da regeneração hepática pelos exames laboratoriais entre grupos controle e ômega-3.

Grupo	Controle		Ômega 3		p
	N	Mediana	N	Mediana	
Ureia (mg/dl)	18	54,0	17	53,0	0,684
AST (U/l)	18	243,5	17	314,0	0,118
ALT (U/l)	18	164,5	17	155,0	0,443
Gama-GT (U/l)	18	5,0	17	3,0	0,025
Proteína total (g/dl)	18	1,3	17	1,3	0,684
Albumina (g/dl)	18	0,9	17	0,9	0,525
Globulina (g/dl)	18	0,4	17	0,4	0,546
Bilirrubina total (mg/dl)	18	0,9	17	0,9	0,546
Bilirrubina indireta (mg/dl)	18	0,3	17	0,3	0,083
Bilirrubina direta (mg/dl)	17	0,6	17	0,6	0,339

Teste de Mann-Whitney.

Tabela 4 - Análise da mitose.

Grupo	Tempo	N	Mediana	Posto médio	p
Controle		18	4,0	20,1	0,215
	24 h	6	7,5	10,3	0,088
	72 h	6	10,5	12,4	
	7 dias	6	2,0	5,8	
Ômega-3		17	3,0	15,8	0,105
	24 h	6	2,5	9,1	
	72 h	6	4,5	11,8	
	7 dias	5	1,0	5,5	

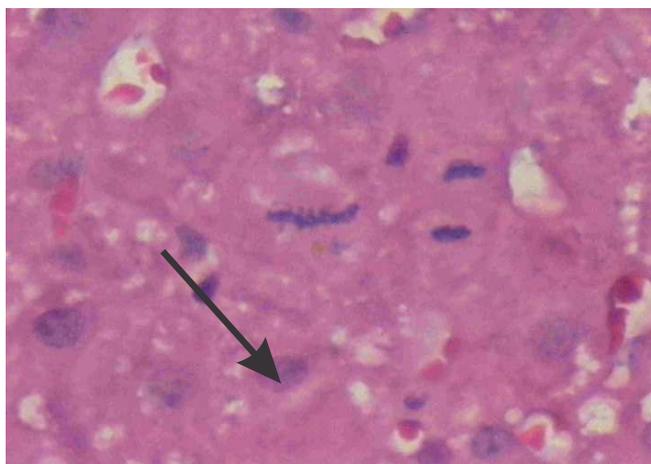


Figura 1 - Fotomicrografia de corte hepático do grupo ômega-3 corado por H&E: presença de mitose (seta).

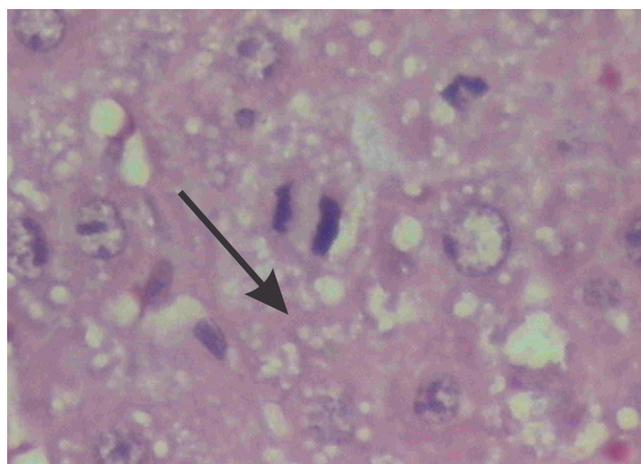


Figura 2 - Fotomicrografia de corte hepático do grupo controle corado por H&E: presença de mitose (seta).

nucleares, usando-se imuno-histoquímica, expressão de genes, variações dos níveis de proteínas séricas, testes sorológicos, determinações enzimáticas de marcadores de proliferação e citometria de fluxo¹⁴.

Foi observado que, utilizando-se a fórmula de Kwon para avaliação de aumento de peso, não houve diferença entre o grupo ômega-3 e controle ($p > 0,05$), con-

forme pode ser observado na tabela 2. A variável peso não foi diferente em nenhum grupo (tanto o grupo controle quanto o grupo suplementado com ácidos graxos ômega-3) durante as 24h, 72h e sete dias. Tal fato está de acordo com a literatura, que mostra que a nutrição perioperatória não é superior à pré-operatória no quesito peso, quando se trata de grupos sem déficits nutricionais¹⁵.

Na avaliação da regeneração hepática pelos exames laboratoriais entre grupos (Tabela 3) somente a variável gama-GT apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) e verificou-se que o grupo ômega-3 apresentou menor nível dela.

A análise estatística dos valores obtidos para proteínas totais, albumina e globulina entre os grupos não demonstrou diferença significativa. Valores de referência sorológicas considerados neste estudo foram semelhantes àqueles obtidos no grupo controle.

Alguns testes bioquímicos também podem ser usados para observar o perfil hepático, como dosagem da ALT, da AST, relação AST/ALT, gama-GT, fosfatase alcalina, tempo de protrombina, albumina e bilirrubinas. Contudo, a doença hepática grave ainda pode apresentar níveis

normais das enzimas hepáticas, ou acarretar alterações de 1,5 a três vezes acima dos níveis de referência^{16,17}.

A contagem de figuras de mitoses coradas pela H&E é um dos parâmetros mais utilizados para avaliação da regeneração hepática por ser fácil de reproduzir com custo baixo, e dessa forma é considerado método de referência para estudos experimentais¹⁴. Na regeneração hepática, avaliando-se o índice mitótico com histologia convencional (H&E) neste estudo, verificou-se que não houve alteração entre os momentos 24h, 72h e sete dias.

Em conclusão, a administração de ácidos graxos ômega-3 em ratos submetidos à hepatectomia de 60% nos tempos 24h, 72h e sete dias não desempenhou papel expressivo no processo de regeneração hepática.

A B S T R A C T

Objective: to evaluate liver regeneration in rats after partial hepatectomy of 60% with and without action diet supplemented with omega-3 fatty acids through the study of the regenerated liver weight, laboratory parameters of liver function and histological study. **Methods:** thirty-six Wistar rats, males, adults were used, weighing between 195 and 330 g assigned to control and omega-3 groups. The omega-3 supplementation group received the diet by gavage and were killed after 24h, 72h and seven days. Evaluation of regeneration occurred through analysis of weight gain liver, serum aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, gamma-glutamyltransferase, and mitosis of the liver stained with H&E. **Results:** the diet supplemented group showed no statistical difference ($p > 0.05$) on the evolution of weights. Administration of omega-3 fatty acids post-hepatectomy had significant reduction in gamma glutamyltransferase levels and may reflect liver regeneration. Referring to mitotic index, it did not differ between period of times among the groups. **Conclusion:** supplementation with omega-3 fatty acids in rats undergoing 60% hepatic resection showed no significant interference related to liver regeneration.

Key words: Hepatectomy. Liver Regeneration. Fatty acids. Fatty acids, Omega-3.

REFERÊNCIAS

- Coelho JCU, Claus CMP, Machuca TN, Sobottka WH, Gonçalves CG. Liver resection: 10-year experience from a single institution. *Arq Gastroenterol.* 2004;41(4):229-33.
- Torres OJM, Pantoja PB, Barbosa ES, Melo LAL, Miranda Filho AR, Coelho JC. Ressecções hepáticas: experiência inicial e resultados cirúrgicos a médio prazo. *ABCD, arq bras cir dig.* 2004;17(1):3-7.
- Michalopoulos GK. Liver regeneration. *J Cell Physiol.* 2007;213(2):286-300.
- Zimmermann A. Regulation of liver regeneration. *Nephrol Dial Transplant.* 2004;19 Suppl 4:iiv6-10.
- Bianchi G, Marzocchi R, Lorusso C, Ridolfi V, Marchesini G. Nutritional treatment of chronic liver failure. *Hepatol Res.* 2008;38 Suppl 1:S93-S101.
- Merli M, Nicolini G, Angeloni S, Riggio O. Malnutrition is a risk factor in cirrhotic patients undergoing surgery. *Nutrition.* 2002;18(11-12):978-86.
- Heyland DK, Novak F, Drover JW, Jain M, Su X, Suchner U. Should immunonutrition become routine in critically ill patients? A systematic review of the evidence. *JAMA.* 2001;286(8):944-53.
- Qiu YD, Wang S, Yang Y, Yan XP. Omega-3 polyunsaturated fatty acids promote liver regeneration after 90% hepatectomy in rats. *World J Gastroenterol.* 2012;18(25):3288-95.
- 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.
- 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.
- Tepaske R, Velthuis H, Oudemans-van Straaten HM, Heisterkamp SH, van Deventer SJ, Ince C, et al. Effect of preoperative oral immune-enhancing nutritional supplement on patients at high risk of infection after cardiac surgery: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet.* 2001;358(9283):696-701.
- Braga M, Gianotti L, Nespoli L, Radaelli G, Di Carlo V. Nutritional approach in malnourished surgical patients: a prospective randomized study. *Arch Surg.* 2002;137(2):174-80.
- Waitzberg DL, Saito H, Plank LD, Jamieson GG, Jagannath P, Hwang TL, et al. Postsurgical infections are reduced with specialized nutrition support. *World J Surg.* 2006;30(8):1592-604.
- Assy N, Minuk GY. Liver regeneration: methods for monitoring and their applications. *J Hepatol.* 1997;26(4):945-52.
- Gianotti L, Braga M, Nespoli L, Radaelli G, Beneduce A, Di Carlo V. A randomized controlled trial of preoperative oral supplementation with a specialized diet in patients with gastrointestinal cancer. *Gastroenterology.* 2002;122(7):1763-70.
- Aguiar LRF, Nassif PAN, Ribas CAPM, Czezczko NG, Ribas MM, Marinho Júnior CH, et al. Regeneração do fígado após hepatectomia parcial em ratos submetidos à hipertensão portal pós-hepática. *ABCD, arq bras cir dig.* 2011;24(2):144-51.
- Zamin Jr I, Mattos AA, Perin C, Ramos GZ. A importância do índice AST/ALT no diagnóstico da esteatohepatite não-alcoólica. *Arq Gastroenterol.* 2002;39(1):22-6.

Recebido em 02/04/2015
Aceito para publicação em 30/05/2015
Conflito de interesse: nenhum.
Fonte de financiamento: nenhuma.

Endereço para correspondência:
Rosilda Mendes da Silva
E-mail: rosildamendes@terra.com.br