

AÇÃO DO ÁCIDO TRANEXÂMICO NA REGENERAÇÃO HEPÁTICA APÓS HEPATECTOMIA PARCIAL: MODELO EXPERIMENTAL EM RATOS

Tranexamic acid action on liver regeneration after partial hepatectomy: experimental model in rats

Felipe Antonio **SOBRAL**¹, Henrique **DAGA**¹, Henrique Nogueira **RASERA**¹, Matheus da Rocha **PINHEIRO**¹, Igor Furlan **CELLA**¹, Igor Henrique **MORAIS**¹, Luciana de Oliveira **MARQUES**¹, Luiz Martins **COLLAÇO**²

Trabalho realizado na ¹Faculdade Evangélica do Paraná e ²Hospital Nossa Senhora das Graças, Curitiba, PR, Brasil.

RESUMO - Racional: Muitas são as injúrias que acometem o fígado e levam a estímulo lesivo. Alguns procedimentos terapêuticos para tratamento dessas lesões dependem da regeneração hepática para aumentar a sua capacidade funcional. **Objetivo:** Avaliar o efeito do ácido tranexâmico na regeneração hepática após hepatectomia parcial em ratos. **Método:** Foram utilizados 40 ratos (*Rattus norvegicus albinus*, Rodentia mammalia) convencionais da linhagem Wistar-UP. Foram divididos aleatoriamente em dois grupos de 20: grupo controle (CT) e grupo ácido tranexâmico (ATX). Cada um deles foi dividido em dois subgrupos para avaliar a regeneração hepática no tempo de 32 h e 7 dias do pós-operatório. A regeneração do órgão foi avaliada quanto ao peso e histologia, sendo esta última por hematoxilina-eosina e antígeno nuclear de proliferação celular. **Resultados:** A média dos pesos dos animais dos grupos ATX 7 dias e CT 7 dias no pré-operatório foram de 411,2 g e 432,7 g, respectivamente, e após a regeneração foram de 371,3 g e 392,9 g. As médias das taxas de mitose coradas por HE dos dois grupos em 7 dias foram de 33,7 e 32,6 mitoses, respectivamente, e de 14,5 e 14,9 mitoses para os grupos ATX e CT 32 h. A contagem de células por antígeno nuclear de proliferação celular mostrou valores de 849,7 para o grupo ATX 7 dias e 301,8 para o CT 7 dias; 814,2 para o grupo ATX 32 h e 848,1 para o CT 32 h. **Conclusão:** O ácido tranexâmico mostrou-se efetivo na regeneração hepática somente em período mais longo de observação após hepatectomia parcial.

DESCRIPTORIOS: Ácido tranexâmico. Hepatectomia. Regeneração hepática.

Correspondência:

Henrique Daga
E-mail: henrique.daga@hotmail.com

Fonte de financiamento: não há
Conflito de interesses: não há

Recebido para publicação: 17/12/2015
Aceito para publicação: 25/02/2016

HEADINGS - Tranexamic acid. Hepatectomy. Liver regeneration.

ABSTRACT - Background: Different lesions may affect the liver resulting in harmful stimuli. Some therapeutic procedures to treat those injuries depend on liver regeneration to increase functional capacity of this organ. **Aim:** Evaluate the effects of tranexamic acid on liver regeneration after partial hepatectomy in rats. **Method:** 40 rats (*Rattus norvegicus albinus*, Rodentia mammalia) of Wistar-UP lineage were randomly divided into two groups named control (CT) and tranexamic acid (ATX), with 20 rats in each. Both groups were subdivided, according to liver regeneration time of 32 h or seven days after the rats had been operated. The organ regeneration was evaluated through weight and histology, stained with HE and PCNA. **Results:** The average animal weight of ATX and CT 7 days groups before surgery were 411.2 g and 432.7 g, and 371.3 g and 392.9 g after the regeneration time, respectively. The average number of mitotic cells stained with HE for the ATX and CT 7 days groups were 33.7 and 32.6 mitosis, and 14.5 and 14.9 for the ATX and CT 32 h groups, respectively. When stained with proliferating cell nuclear antigen, the numbers of mitotic cells counted were 849.7 for the ATX 7 days, 301.8 for the CT 7 days groups, 814.2 for the ATX 32 h and 848.1 for the CT 32 h groups. **Conclusion:** Tranexamic acid was effective in liver regeneration, but in longer period after partial hepatectomy.

INTRODUÇÃO

As doenças hepáticas apresentam elevadas taxas de morbimortalidade no Brasil, e ainda são responsáveis por altos custos ao sistema de saúde do país^{3,16}. É manifesto que a maioria das hepatopatias leva à injúria celular, e quando não tratadas adequadamente levam o órgão a falência, que por sua vez tem por consequência o desequilíbrio da homeostase corporal, a desregulação do nível glicêmico, a deficiência da depuração de substâncias tóxicas, a deficiência de fatores de coagulação e proteínas plasmáticas, além de alterações no ciclo da ureia e secreção biliar⁸.

Muitos dos procedimentos terapêuticos utilizados, como o transplante de doadores vivos e a ressecção tumores hepáticos primários ou mesmo secundários, dependem da regeneração hepática para aumento da capacidade funcional do órgão. Diante desse conhecimento, muitos estudos têm sido publicados^{6,9,12,17,19}.

Ainda dentro deste foco de pesquisa, o papel das plaquetas vem sendo investigado. No ano de 2000 surgiu o primeiro artigo dirigido especificamente ao papel das plaquetas na regeneração hepática. Desde então, os estudos experimentais com plaquetas evidenciam que elas contribuem expressivamente para a regeneração do órgão, sendo sua eficácia proporcional à sua quantidade na corrente sanguínea^{6,19}.

Tais estudos identificaram aumentos significativos na velocidade de regeneração do órgão de cobaias portadores de trombocitose e contagem normal de plaquetas, quando comparadas com trombocitopênicos. Ainda, alguns autores demonstraram aumento na sobrevida dessas cobaias em relação ao último grupo^{6,19}.

Partindo desta hipótese, faz-se necessário a verificação de fármacos que possam manter taxas elevadas destes elementos em situações de injúria celular. Os antifibrinolíticos, por exemplo, permitem a manutenção da quantidade de plaquetas ao inibirem a fibrinólise que

impede ou diminui a formação dos produtos de degradação da fibrina. Além disso, eles diminuem a conversão do plasminogénio em plasmina, promovendo atividade proteolítica nos receptores plaquetários¹⁴.

O objetivo deste estudo foi avaliar o uso do ácido tranexâmico na regeneração hepática após hepatectomia parcial em ratos.

MÉTODOS

O experimento foi conduzido na Faculdade Evangélica do Paraná, Curitiba, PR, Brasil. O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Sociedade Evangélica Beneficente de Curitiba [004117/2013] e foram respeitados os princípios éticos de manuseio e experimentação animais definidos pela Comissão de Ética em Uso de Animais e Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório.

Foram utilizados 40 ratos machos adultos (*Rattus norvegicus albinus*, Rodentia mammalia), convencionais da linhagem Wistar. Foram mantidos em ciclo claro/escuro de 12/12h, umidade de 55±10%, em temperatura ambiente de 21-24°C, com livre acesso à ração própria para a espécie e à água. Os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos de 20: grupo controle (CT) e grupo ácido tranexâmico (ATX). Ambos foram subdivididos em dois subgrupos com 32 h (CT32/ATX32) e sete dias (CT7/ATX7) de acordo com tempo de eutanásia após o procedimento cirúrgico. A técnica cirúrgica consistiu, primeiramente, em anestesia intraperitoneal 0,1 ml/100 g de quetamina 10% e 0,05 ml/100 g de xilazina 2%; epilação; degereação; e laparotomia mediana de aproximadamente 5 cm. A manutenção anestésica foi feita com Isoflurano inalatório com concentração de 1% a 2,5%.

Após a localização do fígado, foi realizada a ressecção do ligamento redondo e a ligadura do pedículo vasculobiliar do lobo mediano com fio de algodão 4.0 e posterior ressecção. O mesmo procedimento foi feito no lobo lateral esquerdo, resultando em hepatectomia de aproximadamente 70%⁷.

Os grupos CT32 e CT7 receberam tratamento placebo com infusão de 1 ml/kg de solução salina isotônica 0.9% intraperitoneal após a hepatectomia parcial. Já os grupos ATX32 e ATX7 receberam, após a hepatectomia parcial, infusão de ácido tranexâmico (Transamin[®]) em 50 mg/kg na cavidade peritoneal.

Os lobos ressecados foram pesados e em seguida foi feita a laparotomia com dois planos de sutura. A analgesia pós-operatória foi realizada com cloridrato de tramadol na dose de 7 mg/kg de peso intramuscular a cada 12 h durante quatro dias de pós-operatório nos grupos CT7 e ATX7, e até o momento da eutanásia nos grupos CT32 e ATX32.

Após os períodos de regeneração pré-determinados, os grupos foram operados novamente para o estudo dos órgãos regenerados. No pós-operatório imediato, todos os ratos foram submetidos à eutanásia sob overdose de isoflurano inalatório. Somente os grupos CT7 e ATX7 foram analisados quanto a estimativa de regeneração pela fórmula de Kwon.

Foi realizada a fixação em formalina tamponada para confecção das lâminas e estudo das mitoses com HE. Ainda foram confeccionadas lâminas seguindo o método de Microarranjo Tecidual (TMA), marcadas por Antígeno Nuclear de Proliferação Celular (PCNA), para quantificação dos hepatócitos em fase de duplicação na imunohistoquímica^{13,15}.

Os dados coletados foram submetidos à análise estatística pelo teste de Wilcoxon, realizado pelo programa Action 2.8 para Microsoft Windows 8, adotando como padrão p<0.05.

RESULTADOS

As médias ponderadas foram 411,2 g±10,27 para ATX7 e 432,7 g±40,54 para CT7; 391,4 g±43,86 para ATX32 e 417 g±41,84 para CT32. Após o sétimo dia de pós-operatório os pesos dos grupos ATX7 e CT7 foram novamente verificados e foram obtidas,

respectivamente, as médias 371,3 g±13,06 e 392,9 g±41,28. Pode ser verificada na Tabela 1 o peso dos animais antes da hepatectomia parcial e após a regeneração.

TABELA 1 - Peso antes do procedimento cirúrgico e após o período de sete dias de pós-operatório

	CT32	ATX32	CT7	ATX7
Pesagem inicial				
Rato 1	390g	460g	390g	418g
Rato 2	415g	300g	379g	390g
Rato 3	340g	330g	400g	420g
Rato 4	390g	370g	430g	410g
Rato 5	440g	411g	470g	415g
Rato 6	415g	403g	372g	415g
Rato 7	505g	415g	447g	410g
Rato 8	440g	410g	446g	420g
Rato 9	440g	410g	503g	420g
Rato 10	395g	405g	400g	394g
Pesagem após sete dias de regeneração				
Rato 1	-	-	372g	380g
Rato 2	-	-	330g	359g
Rato 3	-	-	380g	380g
Rato 4	-	-	410g	370g
Rato 5	-	-	443g	345g
Rato 6	-	-	340g	373g
Rato 7	-	-	420g	385g
Rato 8	-	-	430g	386g
Rato 9	-	-	450g	385g
Rato 10	-	-	354g	360g

A diferença entre a regeneração hepática dos grupos ATX7 e CT7, quando aplicada a fórmula de Kwon não foi significativa (p=0,91). A contagem de mitoses na microscopia óptica não apresentou alteração na morfologia das células hepáticas e evidenciou médias mitóticas de 33,6±12,8 para o grupo ATX7, 32,6±10,7 para CT7, 14,5±13,3 para ATX32 e 14,9±20,5 para CT32. Foram insignificantes as diferenças mitóticas apresentadas por ambos os grupos nos dois períodos de 32h e sete dias (p=0,38 e p=1,0 respectivamente). Os valores obtidos na marcação por HE estão apresentados na Tabela 2.

TABELA 2 - Número de mitoses marcadas por HE

	CT32	ATX32	CT7	ATX7
Rato 1	0	4	1	0
Rato 2	62	17	0	0
Rato 3	10	9	0	0
Rato 4	35	46	0	0
Rato 5	0	8	0	0
Rato 6	0	28	0	0
Rato 7	2	12	0	0
Rato 8	28	13	4	1
Rato 9	8	6	0	0
Rato 10	4	2	0	2

Na análise imunohistoquímica foram obtidos valores médios de 849,7±134 células marcadas para o grupo ATX7, 301,8±241,8 para CT7, 814,2±153,2 para ATX32 e 848,1±52,2 para o grupo CT32. A comparação mitótica entre o grupo CT32 e ATX32 não foi significativa estatisticamente (p=1,0). No entanto, nos grupos avaliados com 7 dias de regeneração, a análise estatística evidenciou maior taxa mitótica para o grupo ATX7 (p=0,0002056). Os números obtidos na marcação imunohistoquímica estão apresentados na Tabela 3.

TABELA 3 - Número de mitoses marcadas por PCNA

	CT32	ATX32	CT7	ATX7
Rato 1	827	405	90	810
Rato 2	823	853	347	851
Rato 3	948	895	214	868
Rato 4	872	783	854	926
Rato 5	854	947	257	958
Rato 6	769	808	448	620
Rato 7	869	912	40	792
Rato 8	899	888	69	664
Rato 9	792	794	260	959
Rato 10	828	857	439	1049

DISCUSSÃO

Conhecer a capacidade de regeneração do fígado e como ele irá responder a um fármaco frente a injúrias celulares nos ajuda a programar terapêutica de qualidade aos pacientes. Na literatura foram encontrados poucos experimentos parecidos a este e ainda eles não utilizaram drogas da mesma classe nem no mesmo período de avaliação aqui apresentado. Com isso, a comparação de resultados é limitada.

O período determinado de 32 h para se avaliar a resposta do fígado frente ao estresse causado foi baseado no fato de que neste tempo após a operação observa-se o pico máximo de mitose no órgão. Já em sete dias estima-se que o processo regenerativo esteja completo^{10,18}.

A análise da regeneração hepática através da fórmula de Kwon não evidenciou diferenças estatisticamente significantes. Contudo, este resultado pode ser considerado duvidoso. Um trabalho publicado no *Journal of Hepatology*¹ demonstrou que a análise por este método não se mostra eficiente, uma vez que o peso do órgão sofre influência de fatores como o depósito de lipídios, glicogênio e reação inflamatória.

De acordo com um estudo brasileiro², a avaliação da velocidade de crescimento das figuras de mitose na microscopia óptica por HE não é método com boa acurácia, visto que é impossível evidenciar quais são exatamente as células que entram no ciclo de divisão celular, em função de que as fases G1, S e G2 do ciclo celular não são identificadas na microscopia óptica. Dessa forma, a análise aqui presente mostra-se também duvidosa, mesmo não apresentando diferença entre os grupos. Já o PCNA tem-se mostrado parâmetro de boa precisão para análise de proliferação celular, inclusive de regeneração hepática após hepatectomia parcial. Ele transforma-se em parâmetro útil para análise da atividade da regeneração hepática²¹. Comparando os grupos ATX7 e CT7 pelo PCNA observou-se que o grupo em uso da droga obteve resposta regenerativa significativamente maior do que o grupo que não recebeu o fármaco.

Em outro estudo²⁰, usando osirolimo como droga imunossupressora, foi realizada a leitura de lâminas para a regeneração hepática com o Ki-67 e chegou-se a um valor significativo ($p=0,04$) na análise entre os grupos controle e estudo após sete dias da hepatectomia parcial, e também a um valor não significativo na análise entre os grupos controle e estudo em 24 h de pós-operatório. Neste aspecto, a regeneração do fígado não se mostra significativa em curtos períodos do pós-operatório, como abaixo de 32 h aqui evidenciado.

Utilizando o Tacrolimus para estudo da regeneração hepática⁴, foram separados grupos para avaliação em 24 h e sete dias após hepatectomia, sendo a imunistoquímica realizada com Ki-67 e PCNA. Concluiu-se que o Ki-67 não evidenciou diferenças entre os grupos e o PCNA, por sua vez, sim, corroborando com dados apresentados neste trabalho. Entretanto, contrariando os resultados deste estudo, houve diferença entre os grupos em 24 h. Essa discrepância pode ter ocorrido pela diferença de ação das drogas estudadas.

Pelo fato de os resultados obtidos neste trabalho terem apontado para aumento na taxa mitótica em período mais tardio (sete dias) do que o tempo do pico mitótico normal para os casos de injúria hepática, pode-se levantar a hipótese de que a droga estudada estaria atrasando a atividade celular. Contudo, esta hipótese não é válida, uma vez que para isso as taxas de mitose no tempo de 32 h deveriam ser inferiores no grupo ATX comparado com o CT, o que não foi observado neste estudo.

Uma a duas horas após a hepatectomia parcial ocorre aumento dos fatores de crescimento mitóticos, como o HGF (hepatocyte growth factor), fator de maior potencial mitótico, chegando a valores 20 vezes maiores que os apresentados no pré-operatório¹¹. Três a quatro dias depois da hepatectomia as taxas mitóticas das células hepáticas estão bastante diminuídas, devido ao aparecimento de fatores inibidores de crescimento, como o TGF- β 1 (transforming growth factor- β 1), o qual é considerado sinal do fim da regeneração

do órgão¹⁰. Neste período, o fígado atingiu praticamente o seu volume original. Partindo deste conhecimento, parece possível que o ácido tranexâmico atue intervindo nos níveis de fatores de crescimento e inibidores⁵.

CONCLUSÃO

O modelo experimental com ácido tranexâmico mostrou-se efetivo na regeneração hepática em período mais longo de observação após hepatectomia parcial.

REFERÊNCIAS

1. Assy N, Minuk GY. Liver regeneration: methods for monitoring and their applications. *J Hepatol*. 1997 Apr;26(4):945-52.
2. Bonhin RG, Carvalho GM, Guimarães AC, Chone CT, Crespo AN, Altemani AMAM, Amstalden EMI. Histologic correlation of expression of Ki-67 in squamous cell carcinoma of the glottis according to the degree of cell differentiation. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2014;80(4):290-295.
3. Carvalho JR, Portugal FB, Flor LS, Campos MR, Schramm JMA. Método para estimação de prevalência de hepatites B e C crônicas e cirrose hepática – Brasil, 2008. *Epidemiol Serv Saude*. 2014 Oct/Dec;23(4):691-700.
4. Filho OG, Toderke EL, Baretta GAP, Sakamoto DG, Agulham MA, Tambara EM, Maias JEF. Imunossupressão com tacrolimus favorece a regeneração hepática induzida por hepatectomia extensa em ratos. *Arq Bras Cir Dig*. 2010 Jun;23(2):74-80.
5. Godoy JL, Matias JEF, Coelho JCU. Regeneração hepática: O mito de Prometeu revisado. *Jornal Brasileiro de Transplantes*. 2006;9(1):535-39.
6. Gomes HMP, Serigiolle LC, Rodrigues DAB, Lopes CM, Studart SV, Leme PLS. Unfeasible experimental model of normothermic hepatic ischemia and reperfusion in rats using the Pringle maneuver. *Arq Bras Cir Dig*. 2014 July/Sept; 27(3):196-200.
7. Higgins G, Anderso G. Experimental pathology of the liver restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch Pathol Lab Med*. 1931;12:186-202.
8. Jesus RP, Waitzberg DL, Campos FG. Regeneração hepática: papel dos fatores de crescimento e nutrientes. *Rev Assoc Med Bras*. 2000 Jul/Sep;46(3):242-54.
9. Kalil NA, Coral GP, Santos FAI, Gonzalez MC, Neutzling CB. The association between preoperative chemotherapy and the prevalence of hepatic steatosis in hepatectomy for metastatic colorectal cancer. *Arq Bras Cir Dig*. 2014 Apr/June; 27(2):120-125.
10. 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 Mar;211(3) 295-300.
11. Lindroos PM, Zarnegar R, Michalopoulos GK. Hepatocyte growth factor (hepatopoietin A) rapidly increases in plasma before DNA synthesis and liver regeneration stimulated by partial hepatectomy and carbon tetrachloride administration. *Hepatology*. 1991 Apr;13(4):743-50.
12. Lopes-Junior AG, Belebecha V, Jacob CE. Hepatectomy: a critical analysis on expansion of the indications. *Arq Bras Cir Dig*. 2014 Mar; 27(1):47-52.
13. Luz L, Sankarankutty A, Passos E, Rizoli S, Fraga GP, Nascimento B. Ácido tranexâmico no tratamento da hemorragia no trauma. *Rev Col Bras Cir*. 2012;39(1):77-80.
14. Matsuo R, Nakamo Y, Ohkohchi N. Platelet administration via the portal vein promotes liver regeneration in rats after 70% hepatectomy. *Ann Surg*. 2011 Apr;257(4):759-63.
15. Michalopoulos GK, DeFrances MC. Liver regeneration. *Science*. 1997 Apr;276:60-66.
16. Morais A, Magno LA, Gomide GPM. Impacto da hepatite C sobre o consumo de recursos e custos de pacientes com cirrose hepática no SUS. *J Bras de Econ Saúde*. 2015;7(2):116-21.
17. Nacif LS, Andraus W, Martino RB, Santos VR, Pinheiro RS, Haddad LBP, D'Albuquerque LC. Adoption of MELD score increases the number of liver transplant. *Arq Bras Cir Dig*. 2014 July/Sept; 27(3):201-203.
18. Nocito A, Kononen J, Kallioniemi OP, Sauter G. Tissue Microarrays (TMAS) for high-throughput molecular pathology research. *Int J Cancer*. 2001 Oct;94(1):1-5.
19. Silva RR. Regeneração hepática e o papel das plaquetas [dissertação]. Porto: U Porto;2010 Jun.
20. Toderke EL, Baretta GAP, Gama Filho, O. P. G.; Matias, J. E. F. Efeito do sirolimo na regeneração hepática induzida por hepatectomia no rato. *Rev Col Bras Cir*. 2014;41(3):203-07.
21. Wolf HK, Michalopoulos GK. Hepatocyte regeneration in acute fulminant and nonfulminant hepatitis: a study of proliferating cell nuclear antigen expression. *Hepatology*. 1992 Apr;15(4):707-13.