

AVALIAÇÃO CELULAR E FUNCIONAL DO FÍGADO ESTIMULADA POR LASER DE BAIXA POTÊNCIA NO TRANSOPERATÓRIO

Functional and cellular evaluation of the liver after low-power laser stimulation during surgery

Yasna Patrícia Aguilera **GODOY**¹, Simone **GERSON**¹, Milene Santana **PINTO**¹,
Márcio Fernando **BOFF**², Marcello Ávila **MASCARENHAS**¹, Valesca Veiga **CARDOSO**¹

Trabalho realizado no ¹Centro Universitário Metodista - IPA, Laboratório de Toxicologia e Mutagênese, Porto Alegre, RS; e ²Serviço de Cirurgia Oncológica, Hospital Mãe de Deus, Porto Alegre, RS, Brasil.

RESUMO - Racional: A hepatectomia parcial é intervenção cirúrgica que pode desencadear processo regenerativo, onde os lobos residuais deflagram resposta de hiperplasia compensatória, ocasionando restauração próxima ao seu volume original. Contudo, dependendo da extensão das lesões hepáticas a regeneração pode ser prejudicada. O laser de baixa potência tem sido pesquisado com resultados benéficos no processo de regeneração hepática. **Objetivo:** Investigar os possíveis danos funcionais e mutagênicos decorrentes da utilização do laser de baixa potência utilizado na regeneração hepática após hepatectomia parcial. **Métodos:** Quinze ratos adultos Wistar foram hepatectomizados a 70%, irradiados ou não com laser, dose de 70 J/cm², 650 nm, 100 mW, de forma direta sobre o fígado remanescente, durante o período transoperatório. Os animais foram distribuídos em quatro grupos: G1 (controle, 7 dias); G2 (laser, 7 dias); G3 (controle 14 dias); G4 (laser, 14 dias). Foram analisados o peso do fígado; número de hepatócitos; deposição de fibras colágenas; teste de função hepática: alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase, fosfatase alcalina, gama glutamiltransferase, bilirrubinas e teste de micronúcleo em eritrócitos. **Resultados:** O peso do fígado apresentou-se aumentado nos grupos G3 e G4 (p=0,001 e p=0,002) comparados aos demais grupos. A deposição das fibras colágenas no G1 foi estatisticamente maior em relação aos demais grupos (p=0,01). Nos testes de função hepática e teste de micronúcleo não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos. **Conclusão:** O laser de baixa potência não ocasionou perda de função hepática ou dano mutagênico.

DESCRIPTORIOS - Mutagênese. Hepatectomia. Regeneração hepática. Laser.

Correspondência:

Valesca Veiga Cardoso
E-mail: anastrefa@gmail.com;
anastrefa@gmail.com

Fonte de financiamento: não há
Conflito de interesse: não há.

Recebido para publicação: 11/01/2017
Aceito para publicação: 23/03/2017

HEADINGS - Mutagenesis. Hepatectomy. Liver regeneration. Laser therapy.

ABSTRACT - Background: Partial hepatectomy is a surgical intervention of the liver that can trigger its regenerative process, where the residual lobes deflagrate a compensatory hyperplasia, causing its restoration almost to the original volume. Nevertheless, depending on the extent of liver damage its regeneration might be impaired. The low-power laser has been studied with beneficial results. **Aim:** To investigate the possible functional and mutagenic damage arising from the use of low-power laser used in liver regeneration after partial hepatectomy. **Methods:** Fifteen male adult Wistar rats were hepatectomized in 70% and laser irradiated or not with dose of 70 J/cm², 650 nm, 100 mW, directly on the remaining liver, during the perioperative period. These animals were divided into four groups: G1 (control, 7 days); G2 (laser, 7 days); G3 (control, 14 days); G4 (laser, 14 days). Were analyzed the liver weight; number of hepatocytes; deposition of collagen fibers; liver function tests: serum alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, alkaline phosphatase, gamma glutamyl transferase, bilirubin and micronucleus test in peripheral blood erythrocyte. **Results:** The liver weight was greater in G3 and G4 (p=0.001 and p=0.002) compared to other groups. The deposition of collagen fibers in G1 was statistically higher than the other groups (p=0.01). In tests of liver function and micronucleus test was not found significant differences between the studied groups. **Conclusion:** Low-power laser stimulation did not cause loss of liver function or mutagenic damage.

INTRODUÇÃO

Hepatectomia parcial (HP) é técnica simples que consiste na remoção cirúrgica dos dois maiores lobos do fígado do rato, o lateral esquerdo e mediano, o que corresponde em aproximadamente 67% dos terços da massa hepática original¹¹. Este procedimento cirúrgico pode desencadear o início do processo regenerativo, onde os lobos residuais deflagram resposta de hiperplasia compensatória, restaurando o fígado a seu volume original^{2,3,12,16,24,27}.

A técnica cirúrgica preserva o resíduo de 1/3 dos hepatócitos¹⁶, os quais são células que possuem grande potencial proliferativo; encontram-se em repouso em fígados normais e replicam de forma limitada e regulada na regeneração hepática estimulada pela HP⁷. A cinética da proliferação de células e os fatores de crescimento produzidos por proliferação dos hepatócitos sugerem que estas células proporcionam estímulos miogênicos que conduzem à proliferação de outras células, iniciando-se na síntese de DNA dos hepatócitos¹⁶.

O colágeno é proteína proveniente da matriz extracelular, e pode desempenhar diversas funções no organismo¹⁵. No fígado, quando ocorre uma lesão, no primeiro momento há deposição de colágeno de maneira irregular, a qual tende a diminuir conforme o tecido hepático for se regenerando²⁹. Contudo, quando há lesão muito extensa e permanente, o

processo de diminuição do excesso de colágeno não ocorre e há divisão não arquitetural, formando áreas fibróticas que podem ser estimuladas por processos infecciosos ou pela superexposição do fígado às substâncias tóxicas, potencialmente irreversível, considerada cirrose¹⁵.

A capacidade do fígado de se regenerar é crucial após a HP, pois a perda maciça de hepatócitos, bem como a necrose celular ou apoptose, podem ser fatores limitantes para replicação celular e consequentemente retardo no processo de regeneração hepática, o que pode ocasionar graves efeitos adversos sobre a sobrevivida do animal¹³.

A terapia laser de baixa potência, ou baixa intensidade (TLBP) utiliza fótons com comprimentos de onda localizados na região vermelha visível do espectro, ou na região do infravermelho próximo, os quais consistem em lasers diodos superluminescentes monocromáticos, com potência relativamente baixa (inferiores a 500 mW) e são utilizados nos tratamentos atérmicos, pois não provocam calor nos tecidos biológicos¹⁴.

O efeito da TLBP na regeneração hepática após a HP estimula melhoria significativa da regeneração hepática favorável para a formação de novos hepatócitos, células-tronco mesenquimais e angiogênese na regeneração em ratos²³, melhorando a estabilidade da função mitocondrial, proporcionando aumento da taxa de controle respiratório, sugerindo retardo da sobrecarga hepatocelular do fígado remanescente⁵⁸. A TLBP pode levar ao bom desempenho clínico, simples, rápido, e fácil de executar, promovendo melhora da capacidade regenerativa do órgão após a HP, pelo aumento da expressão do fator de crescimento do hepatócito, exercendo papel acelerador no processo de regeneração hepática em ratos, independentemente da profundidade de penetração do laser^{4,21}.

Avaliação do funcionamento hepático fundamenta-se em testes de função hepática, através de marcadores sensíveis e específicos, que são classificados quanto à atividade hepatocelular, onde o diagnóstico resulta em valores aumentados na corrente sanguínea^{9,19}. Nas lesões da membrana dos hepatócitos são encontrados níveis séricos elevados das enzimas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT); doenças colestáticas, decorrentes do impedimento ou redução do fluxo de bile, levam ao aumento dos níveis plasmáticos de bilirrubina e predominantemente da fosfatase alcalina (FA) e da gama glutamil transpeptidase (GGT). Seus aumentos plasmáticos resultam de lesões de colangiócitos, infiltrativas, no aumento de FA, GGT e, ocasionalmente, bilirrubina^{15,19}.

Estudos que observam a função hepática através dos testes de função hepática, mediante análise dos níveis séricos das aminotransferases, gama glutamiltransferase, fosfatase alcalina e bilirrubina, demonstram que o emprego da TLBP no processo de regeneração hepática não causa lesões hepáticas adicionais ao procedimento cirúrgico de fígados de ratos saudáveis^{3,18,21,22}.

Na degradação das fibras de colágeno no tecido hepático remanescente após a HP, a TLBP evita a degradação de áreas fibróticas e posterior continuidade do desarranjo celular^{18,22}.

O teste de micronúcleo é utilizado como biomarcador na detecção e monitoramento de doenças associadas à mutação cromossômicas⁵, no qual pode ser utilizado o modelo de ensaio de micronúcleos em eritrócito de sangue periférico¹⁰. Micronúcleo é um núcleo acessório, originado a partir da quebra de cromossomos, os quais não são incluídos no núcleo principal durante a telófase da mitose ou meiose, permanecendo imersos no citoplasma²⁵. Sua presença sugere alterações genéticas espontâneas ou por indução através de agentes genotóxicos⁵.

O emprego do laser de baixa potência tem sido estudado nas últimas décadas como agente terapêutico no processo de regeneração do tecido hepático, após a HP. A literatura tem referenciado diversos achados positivos decorrentes de sua utilização, contudo observam-se carências nas publicações sobre a avaliação do dano celular como efeito adverso decorrente do seu uso.

O objetivo deste estudo consistiu em investigar os possíveis danos biológicos decorrentes da utilização do laser de baixa potência utilizado na regeneração hepática após a hepatectomia parcial.

Todos os protocolos seguiram as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), baseado no Guia Nacional para Cuidado e Uso de Animais de Laboratórios (Conselho Nacional de Pesquisa). Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Centro Universitário Metodista IPA nº 003/2014. É estudo experimental quantitativo, comparativo, realizado no Centro Universitário Metodista – IPA, Porto Alegre, RS, Brasil, nos laboratórios de Toxicologia, Mutagênese no período entre de abril de 2014 a junho de 2014.

A população da pesquisa foi formada de 15 ratos da linhagem *Wistar*, machos, adultos (90 dias) pesando em torno de 250-300g, mantidos no Biotério do Centro Universitário Metodista. Os animais permaneceram em caixas plásticas, contendo maravalha, identificados com etiquetas conforme o grupo pertencente, agrupados em dois animais por caixa. Para identificação, foram utilizadas marcações na cauda, realizada com caneta permanente. Os ratos foram mantidos sob as condições do biotério, com luz controlada em ciclo de 12 h (claro-escuro), temperatura de 22-24° C, umidade relativa do ar de 70,5%. A ração e a água foram administradas ad libitum.

Todos os ratos sofreram HP a 70 % (retirada dos lobos mediano e lateral esquerdo)¹³, com irradiação ou não com TLBP sobre forma direta no tecido hepático remanescente, durante o período transoperatório. Os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos conforme o período de eutanásia: G1 (controle, 7 dias); G2 (laser, 7 dias); G3 (controle, 14 dias); G4 (laser, 14 dias). Eles foram previamente pesados e posteriormente anestesiados com injeção intraperitoneal de Ketamina 5%, na dose de 90 mg/kg, combinada com Xilazina 2% na dose de 12 mg/kg, produzindo sedação e analgesia cirúrgica eficaz, em um tempo hábil de 30 min. Seus sinais vitais foram monitorizados, através de oxímetro, além da avaliação clínica da respiração através da profundidade e ritmo, pela cor das membranas e mucosas, observando a efetividade das trocas de gases pulmonares. Para manutenção da normotermia, os animais foram mantidos aquecidos com luz alógena (45W, 127V), com temperatura corpórea monitorada por um termômetro retal digital e mantida em torno de 37° C. O reflexo podal dos animais foi avaliado a cada 5 min ou mais, a fim de atingir a profundidade anestésica. Após o efeito desejado da anestesia os ratos foram submetidos à tricotomia da região abdominal. Sobre condições estéreis, todos foram submetidos à HP 70%. Em seguida, antes do fechamento da cavidade abdominal, os componentes dos grupos G2 e G4 receberam a TLBP do feixe de laser diodo, tensão 90-240 V, automático, emissor de laser vermelho, índio- gálio-iodo-fósforo (InGaIP), comprimento de onda 650 nm, potência máxima de emissor de 100 mW (modelo Therapy XT, da marca DMC Equipamentos LTDA®, RDC 185/2001 (ANVISA) III, IEC 60825-1/3R) expandido a toda a porção de fígado remanescente de cada animal, na dose de 2 J, fluência de 70 J/cm², repetido em cinco pontos diferentes, com tempo 20 s de aplicação por ponto. Os grupos experimentais G1 e G3, considerados grupos controles, não receberam a TLBP.

Após estes procedimentos, os ratos tiveram suas cavidades abdominais fechadas por meio de sutura simples. Uma vez concluído o procedimento cirúrgico, eles foram mantidos aquecidos com luz alógena e permaneceram monitorados até estarem recuperados dos efeitos anestésicos, quando então foram levados ao biotério. Para melhorar a taxa de sobrevivida no pós-operatório imediato foi acondicionada glicose 20% na água²⁹.

Após os períodos de 7-14 dias do procedimento cirúrgico, conforme o período de observação de cada grupo, os animais foram eutanasiados, para a dissecação das amostras. Logo após a eutanásia, os fígados foram imediatamente retirados para análise da função dos hepatócitos, e amostras de sangue troncular coletada sendo posteriormente centrifugada, utilizada

a sorologia para análise bioquímica da avaliação da função hepática por meio de ALT, AST, FA, GGT e bilirrubina. A função hepática foi observada através de métodos cinéticos, utilizando-se kits comerciais (Labtest®). As aminotranferases (ALT e AST) foram dosadas no soro pelo método cinético UV-IFCC; GGT e FA pelo Szasz modificado; bilirrubinas por método colorimétrico (Sims-Horn). Todas as dosagens foram realizadas em triplicatas no sistema semiautomático Labquest (Labtest®).

O tecido hepático foi pesado, cortado em lâminas e fixado com formol 10% durante 24 h para posterior processamento e análises histológicas. Para histologia os fígados foram pesados, seccionados e processados convencionalmente, ou seja, após a fixação com formol, os cortes foram lavados em água destilada, desidratados em série crescente de etanol, diafanizados e embebidos em parafina. As amostras foram seccionadas em micrótomo na espessura de 7 µm e colocados em lâminas de vidro identificadas com o código do grupo e o número do animal. A parafina foi removida dos cortes e o tecido hidratado, prosseguindo-se com a coloração por H&E e tricrômico de Masson. Os cortes histológicos foram analisados e documentados em microscópio biológico binocular com captura de imagem Tim-2 Opton. Nos cortes corados em H&E foram avaliadas áreas de cicatrização e a morfologia do parênquima hepático, com a finalidade de observar se houve estimulação da hiperplasia do tecido hepático remanescente após a utilização da TLBP, através da contagem do número de hepatócitos em 10 campos para cada corte, em aumento de 400x. A área analisada correspondeu a 62500 µm². Para os cortes corados em tricrômico Masson foram analisadas a proliferação das fibras colágenas e a reepitelização em 10 campos com aumento de 200x por lâmina e atribuídos três escores: 0 (ausente), 1 (leve), 2 (moderado) e 3 (acentuado).

A avaliação do dano mutagênico se deu por meio da contagem de micronúcleos em eritrócito de sangue periférico. Após eutanásia foram imediatamente colocadas amostras de sangue sobre lâmina e posteriormente coradas com Giemsa®. Elas foram analisadas em microscopia ótica, utilizando-se aumento da objetiva de imersão (400x), sendo determinado a partir de mil eritrócitos por lâmina. A classificação e contagem de micronúcleo em eritrócitos seguiram o protocolo sugerido por Tolber et al.³¹.

Análise estatística

Os resultados foram expressos em média e desvio-padrão, avaliados utilizando-se a análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida do teste de Tukey como *post-hoc*, sendo expressos como média±desvio-padrão. O valor usado de significância estatística para os resultados foi de p<0,05. O banco de dados e as análises foram realizados no programa estatístico *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS versão 21.0 for Windows).

RESULTADOS

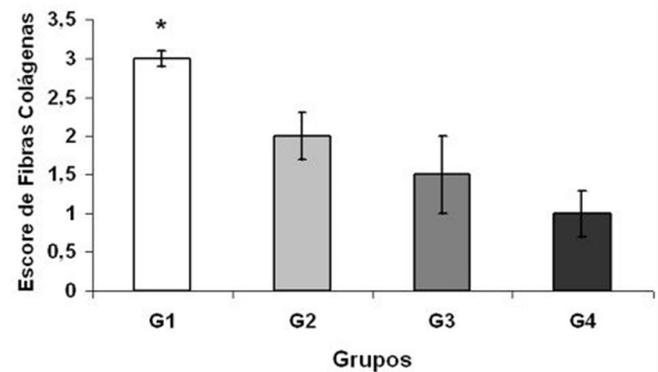
Na Tabela 1 observa-se a comparação do peso do fígado entre os grupos, pela média±desvio-padrão: G1 controle de 7 dias, 8,13±0,10 g; G2 laser 7 dias, 8,53±0,20 g; G3 controle 14 dias, 10,04±0,03 g; G4 laser 14 dias, 10,10±0,06 g. Os resultados apresentados demonstraram que no grupo G3 (p=001), os pesos dos fígados foram significativamente maiores do que nos G1 e G2. Da mesma forma, ele no G4 (p=0,02) foi significativamente maior do que no G1 e G2. Também se observa a comparação do número de hepatócitos entre os diferentes grupos: G1 controle de 7 dias, 555±17 U; G2 laser 7 dias, 619±30 U; G3 controle 14 dias, 642±44 U; G4 laser 14 dias, 714±5,6 U). Os resultados não apresentaram significância estatística entre os quatro grupos do experimento na contagem do número de hepatócitos. Entretanto, pôde-se observar tendência de aumento no número de hepatócitos nos grupos tratados com laser comparados com os seus respectivos controles G2 vs. G1 e G4 vs. G3.

TABELA 1- Comparação do peso dos fígados hepatectomizados e da contagem do número de hepatócitos entre os diferentes grupos

| Grupo | Peso(g) | Número de hepatócitos |
|-------|------------------------|-----------------------|
| G1 | 8,13±0,10 | 555±17 |
| G2 | 8,53±0,20 | 619±30 |
| G3 | 10,04±0,03 * p=0,01 | 642±44 |
| G4 | 10,10±0,06 * p=0,02 | 714±5,6 |

Os valores representam a média do grupo±desvio-padrão. ANOVA de uma via do pós-teste de Tukey. * p< 0,05.

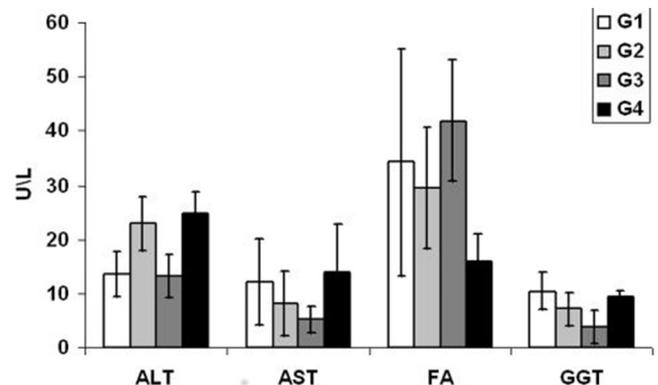
Na Figura 1 observa-se a quantificação de fibras colágenas nos fígados entre os diferentes grupos: G1 controle 7 dias, 3±0,1; G2 laser 7 dias, 2±0,3; G3 controle 14 dias, 1,5±0,5 e G4 laser 14 dias, 1±0,3. Os resultados apresentados demonstram que no grupo G1 os valores referentes à presença de fibras colágenas são significativamente maiores (p=0,01) em relação aos demais grupos.



0=ausente, 1=leve, 2=moderado, 3=acentuado; os valores representam a média e o desvio-padrão

FIGURA 1 - Quantificação de fibras colágenas

Na Figura 2 observa-se a comparação dos níveis séricos entre os diferentes grupos das enzimas. A ALT foi no G1 controle 7 dias, 13,5±4,2 U/l; G2 laser 7 dias, 22,89±5 U/l; G3 controle 14 dias, 13,18±4 U/l; G4 laser 14 dias, 24,67±4 U/l. A AST foi no G1 controle 7 dias, 12,11±8 U/l; G2 laser 7 dias, 8,22± 6 U/L, G3 controle 14 dias, 5,19±2,45 U/l; G4 laser 14 dias, 14±8,71 U/l. A FA foi no G1 controle 7 dias, 34,21±21 U/l; G2 laser 7 dias, 29,49±11,1 U/l; G3 controle 14 dias, 41,92±11,28 U/l; G4 laser 14 dias, 16±5 U/l. A GGT foi no G1 controle 7 dias, 10,44±3,5 U/l; G2 laser 7 dias, 7,09±3,07 U/l; G3 controle 14 dias, 3,87±3 U/l; G4 laser 14 dias, 9,42±1,13 U/l.

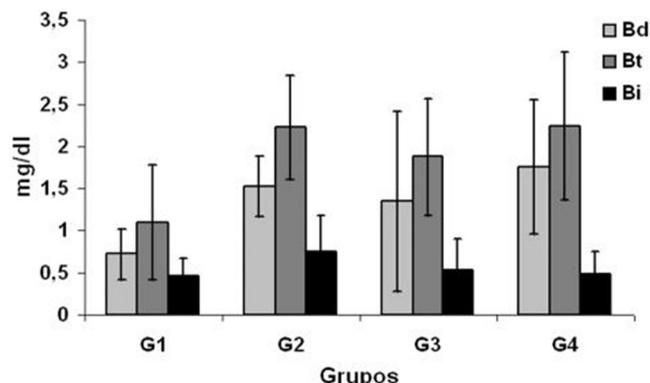


Valores=média do grupo±desvio-padrão; ANOVA de uma via, seguido do pós-teste de Tukey; p< 0,05.

FIGURA 2 - Comparação de ALT, AST, FA e GGT

Na Figura 3 observa-se a comparação dos níveis séricos da bilirrubina direta, total e indireta entre os diferentes grupos,

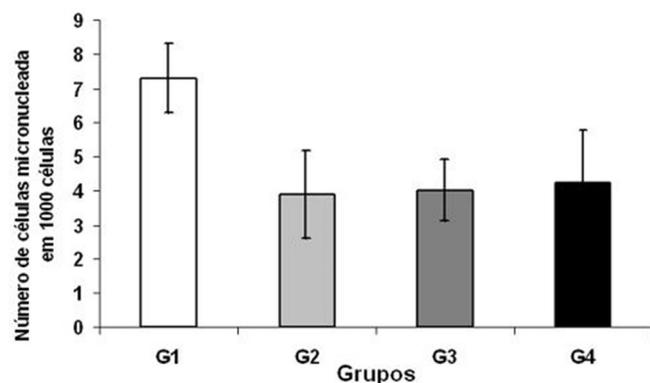
onde se vê no G1 controle 7 dias, $0,72 \pm 0,3$ mg/dl; G2 laser 7 dias, $1,53 \pm 0,36$ mg/dl; G3 controle 14 dias, $1,35 \pm 1,07$ mg/dl; G4 laser 14 dias, $1,76 \pm 0,8$ mg/dl. A bilirrubina total foi nos grupos G1, controle 7 dias, $1,1 \pm 0,68$ mg/dl; G2 laser 7 dias, $2,23 \pm 0,62$ mg/dl; G3 controle 14 dias, $1,88 \pm 0,69$ mg/dl; G4 laser 14 dias, $2,24 \pm 0,88$ mg/dl. A bilirrubina indireta foi no G1 controle 7 dias, $0,46 \pm 0,22$ mg/dl; G2 laser 7 dias, $0,75 \pm 0,43$ mg/dl; G3 controle 14 dias, $0,54 \pm 0,37$ mg/dl; G4 laser 14 dias, $0,48 \pm 0,27$ mg/dl. A análise estatística da bilirrubina direta, total e indireta não apresentou diferença significativa quando comparados os quatro grupos.



Valores=média do grupo±desvio-padrão; ANOVA de uma via, seguido do pós-teste de Tukey; $p < 0,05$

FIGURA 3 – Comparação das bilirrubinas total (Bt), direta (Bd) e indireta (Bi)

Na Figura 4 observa-se a comparação do número de micronúcleos em eritrócitos de sangue periférico entre os diferentes grupos: G1 controle 7, 3 ± 1 U; G2 laser 7 dias, $3,9 \pm 1,3$ U; G3 controle 14 dias; $4 \pm 0,9$ U; G4 laser 14 dias, $4,25 \pm 1,55$ U. A análise estatística não apresentou diferença significativa quando comparados os quatro grupos.



Valores=média do grupo±desvio-padrão; ANOVA de uma via, seguido do pós-teste de Tukey; $p < 0,05$

FIGURA 4 - Número de células micronucleadas em 1000 eritrócitos de sangue periférico analisadas entre os grupos

DISCUSSÃO

Na comparação do peso do fígado entre os grupos encontraram-se resultados que demonstraram que os grupos 14 dias do experimento, G3 e G4, foram significativamente maiores que nos grupos analisados em 7 dias, G1 e G2. Porém, não houve diferença significativa na comparação dos dois grupos de 14 dias com os de sete, como já demonstrado por Aguiar et al.¹. Mediante estes resultados não houve diferenças entre os grupos tratados com laser dos seus respectivos controle, e que o emprego do laser no tecido hepático remanescente

não provoca atraso na restauração do volume inicial após o estímulo ofertado pela HP.

Na análise morfológica para o número de hepatócitos não houve diferenças entre os grupos, sem perda maciça de hepatócitos, como também já observado por outros autores^{18,22}.

Na análise da deposição de fibras de colágenos, observou-se sua redução gradativa, acompanhando o processo de regeneração do fígado remanescente, concordando com outros estudos onde a TLBP não adiciona a degradação de áreas fibróticas, evitando posterior continuidade do desarranjo celular^{18,22}.

A avaliação do funcionamento hepático fundamenta-se em testes de função hepática através de marcadores sensíveis e específicos, classificados quanto à atividade hepatocelular; são úteis para o diagnóstico, prognóstico e monitoramento hepático. As aminotransferases ALT e AST na presença de lesão à membrana do hepatócito são liberadas em grande quantidade na circulação sanguínea, observando-se níveis elevados de ALT e AST^{9,20}. Os estudos realizados por Araujo Lima et al.³ e Monteiro¹⁸, ambos com ratos Wistar cirróticos hepatectomizados, demonstraram que testes de função hepática permanecem dentro dos limites da normalidade. Neste estudo, todos os grupos apresentaram valores de média da AST, inferiores aos valores de referência da literatura ($39-92$ U/l)²⁹, mas não foram estatisticamente significativos quando comparados entre si. Evidenciou-se diminuição da ALT no grupo controle 14 dias, já mencionado por outros autores²¹.

A enzima FA encontra-se distribuída em diversos tecidos; no fígado, encontra-se na membrana canalicular dos ductos biliares. O impedimento do fluxo biliar normal leva à colestase¹⁴. Araujo Lima et al.³ ao analisarem o comportamento dela após hepatectomia a 30% (retirada do lóbulo esquerdo) de ratos cirróticos, concluíram que em todos os grupos cirróticos os valores da FA foram maiores que o controle, mas entre os grupos cirróticos não houve diferença. Neste estudo não foram encontradas diferenças estatísticas significativas entre os grupos na sua concentração; contudo, percebeu-se declínio nos níveis plasmáticos nos dois grupos irradiados com laser quando comparados ao controle, deduzindo-se que a aplicação de laser sobre o tecido hepático remanescente reduz os níveis de FA, descaracterizando lesão na membrana canalicular dos ductos biliares.

A GGT encontra-se presente em vários órgãos. No fígado, ela localiza-se nos canalículos das células hepáticas e nas células epiteliais que revestem os ductos biliares¹⁹. Sua elevação no plasma ocorre quando há lesão de colangiócitos¹⁵. Este trabalho evidenciou que o TLBP não produziu efeitos significativos nos níveis plasmáticos entre os grupos. Contudo, a GGT é marcador não específico de doença do fígado, podendo ser útil para determinar se nível elevado de FA é decorrente ou não de doença hepática¹⁹.

A concentração plasmática elevada de bilirrubina sugere a presença de lesões hepáticas, decorrentes do impedimento ou redução do fluxo de bile, onde ocorre dificuldade na conjugação e refluxo da bilirrubina conjugada para o sangue¹⁵. Sua análise é útil para o diagnóstico diferencial de doenças hepáticas e biliares. A concentração elevada nos níveis plasmáticos correlaciona-se com pior prognóstico na insuficiência hepática⁹. Aguiar et al.¹ ao avaliarem efeito da regeneração hepática após a HP em fígados congestos devido à indução da hipertensão portal mediante a mensuração do nível plasmático de bilirrubinas totais diretas e indiretas, não observaram diferença significativa na dosagem delas. Resultados similares foram observados neste estudo no qual os níveis séricos das bilirrubinas permaneceram dentro dos limites da normalidade.

A presença de micronucleações em eritrócitos de medula óssea ou eritrócitos de sangue periférico sugere alterações genéticas espontâneas ou por indução por meio de agentes genotóxicos⁵. Neste estudo optou-se pela utilização do teste de micronúcleo em eritrócito de sangue periférico. Esta escolha se deu devido ao fato de ser método simples, que possui boa

reprodutibilidade, rápida análise, e exige apenas pequenas quantidades de sangue periférico, além de ser pouco invasivo¹⁰. Mediante este teste obteve-se resultados similares aos de Monteiro¹⁸, sem diferenças estatísticas entre os diferentes grupos, na contagem de número de micronucleações nos eritrócitos de sangue periférico, demonstrando valores não condizentes com a presença de dano nuclear.

CONCLUSÃO

O uso de laser de baixa potência, na dose aplicada sobre o tecido hepático remanescente após a hepatectomia parcial, não interfere na função hepática normal e não leva ao dano mutagênico.

REFERÊNCIAS

1. Aguiar LF, Nassif PAN, Ribas CAPM, Czczko NG, Ribas MM, Marinho Júnior CH, Wendler, E. Regeneração do fígado após hepatectomia parcial em ratos submetidos à hipertensão portal pós-hepática. *ABCD, arq. bras. cir. Dig.* 2011 Jun; 24 (2): 144-151. 2011.
2. Amico EC, Alves JR, João SA, Guimarães PL, Medeiros JA, Barreto ÉJ. Immediate complications after 88 hepatectomies - brazilian consecutive series. *Arq Bras Cir Dig.* 2016 Jul-Sep;29(3):180-184. doi: 10.1590/0102-6720201600030012.
3. Araujo Lima AAL, Ramalho L NZ, Zucoloto S, Bagnato VS, Silva Júnior OC. Estudo da fosfatase alcalina em ratos cirróticos hepatectomizados após aplicação de laser. *Acta Cir. Bras* 2001 Nov; 16 (Suppl 1): 16-17
4. Araújo TG, de Oliveira AG, Tobar N, Saad MJ, Moreira LR, Reis ER et al. Liver regeneration following partial hepatectomy is improved by enhancing the HGF/Met axis and Akt and Erk pathways after low-power laser irradiation in rats. *Lasers Med Sci.* 2013 Nov; 28(6):1511-7
5. Barbosa AJ, Santana ACDA, Castro e Silva T, Kurachi C, Inada N, Bagnato Vanderlei Salvador et al . Effect of laser on the remnant liver after the first 24 hours following 70% hepatectomy in rats. *Acta Cir. Bras* 2011 Dec; 26(6): 470-474 .
6. Bonassi S, Znaor A, Ceppi M, Lando C, Chang WP, Holland N et al. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis.* 2007 Mar; 28(3):625-31.
7. Fausto, N. Liver regeneration and repair: hepatocytes, progenitor cells and stem cells. *Hepatology.* 2004 Jun; 39(6):1477-87.
8. Gao X.; Xin D. Molecular mechanisms of cell proliferation induced by low power laser irradiation. *J Biomed Sci.* 2009 Jan; 16(1): 4.
9. Goldman, L; Ausiello, D. *Cecil tratado de medicina interna.* 22. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.v. 2.
10. Hayashi M, MacGregor JT, Gatehouse DG, Blakey DH, Dertinger SD, Abramsson-Zetterberg L et al. In vivo erythrocyte micronucleus assay III. Validation and regulatory acceptance of automated scoring and the use of rat peripheral blood reticulocytes, with discussion of non-hematopoietic target cells and a single dose-level limit test. *Mutat Res.* 2007 Feb; 627(1):10-30.
11. Higgins, G.M, Anderson, R.M. Experimental pathology of the liver: restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch Pathol.* 1931; 12:186-202.
12. Hockings,P.D,etal. Longitudinal magnetic resonance imaging quantification of rat liver regeneration after partial hepatectomy. *Toxicol Pathol.* 2002 Sep-Oct; 30(5):606-10.
13. Hovhannisyán, A.; Gebhardt, R. Animal models for studies on liver regeneration. In: HÄUSSINGER, D. (Ed.). *Liver Regeneration.* Berlin: De Gruyter; 2011. p.175- 190 .
14. Kitchen,S. *Eletroterapia:Prática baseada em evidências.* 11.ed.São Paulo: Manole; 2003.
15. Koepfen BM.; Stanton BA. *Berne e Levy Fisiologia.*6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2009.
16. Michalopoulos G. K. Review Liver regeneration. *J Cell Physiol.* 2007 Nov; 213(2):286-300.
17. Michalopoulos GK, DeFrances M.C. Liver regeneration. *Science* 1997 Apr 4; 276 (5309): 60-6.
18. Monteiro A S. Efeitos do laser de baixa potência sobre um modelo experimental de cirrose hepática com CCl 4. 2006. 48f. Dissertação (Mestrado) - Universidade do Vale do Paraíba, São José dos campos, 2006.
19. Motta VT. *Bioquímica clínica para o Laboratório: princípios e interpretações.* 4. ed. Porto Alegre: Médica Missau; 2003.
20. Mukherjee S.; Gollan J. L. Assessment of liver function. In: DOOLEY, J. S. et al. *Sherlock's diseases of the liver biliary system.* Oxford: Wiley-Blackwell; 2011. p. 20-35.
21. Oliveira AF, Castro e Silva T, Sankarankutty AK, Pacheco EG, Ferreira J, Bagnato VS et al . The effect of laser on remanent liver tissue after 90% hepatectomy in rats. *Acta Cir. Bras* 2006; 21(Suppl 1): 29-32.
22. Oliveira-Junior MC, Monteiro AS, Leal-Junior EC, Munin E, Osório RA, Ribeiro W, Vieira RPLow-level laser therapy ameliorates CCl4-induced liver cirrhosis in rats. *Photochem Photobiol.* 2013 Jan-Feb;89(1):173-8
23. Oron U, Maltz L, Tuby H, Sorin V, Czerniak A. Enhanced liver regeneration following acute hepatectomy by low-level laser therapy. *Photomed Laser Surg* 2010 Oct; 28(5):675-8.
24. Petroianu A, Esquerdo CR; Barbosa, Alfredo JA, ALBERTI LR. Regeneração hepática induzida por ressecção segmentar do fígado, em rato. *Rev. Col. Bras. Cir* 2004 Feb; 31(1): 10-14.
25. Ramirez,A.;Saldanha,P.H. Micronucleus Investigation of Alcoholic Patients with Oral Carcinomas. *Genet. Mol. Res.* 2002 Sept ; 1, (3): 246-260.
26. Ribeiro, L.R; Salvador, D.M.F, E.K. Teste de micronúcleo em medula óssea de roedores in vivo. *Mutagênese Ambiental Canoas:* Ed.ULBRA; 2003. 356p.
27. Sobral FA, Daga H, Rasera HN, Pinheiro Mda R, Cella IF, Morais IH, Marques Lde O, Colloço LM. Tranexamic acid action on liver regeneration after partial hepatectomy: experimental model in rats. *Arq Bras Cir Dig.* 2016 Apr-Jun;29(2):102-4. doi: 10.1590/0102-6720201600020009.
28. Tolbert, P.E; Shy, C.M; Allen, J.W. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. *Mutat Res* 1992 Feb; 271:69-77.
29. Valdez, VI; Mattaria, V.M; Ko, GM (org) *Cuidados e manejos de animais de laboratório.* São Paulo: Atheneu, 2009.
30. Vicentine FP, Gonzalez AM, Azevedo RA, Benini BB, Linhares MM, Lopes-Filho GJ, Martins JL, Salzedas-Netto AA. Pediatric liver transplantation with ex-situ liver transection and the application of the human fibrinogen and thrombin sponge in the wound area. *Arq Bras Cir Dig.* 2016 Nov-Dec;29(4):236-239. doi: 10.1590/0102-6720201600040006.
31. Yamamoto H, Murawaki Y, Kawasaki H. Hepatic collagen synthesis and degradation during liver regeneration after partial hepatectomy. *Hepatology.* 1995 Jan; 21(1):15561