

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CURSO DE MEDICINA

STÉFANE DAISE LIMA FERREIRA

**AVALIAÇÃO DA REGENERAÇÃO HEPÁTICA COM O USO DE DIETA
SUPLEMENTADA COM L- ARGININA EM ESTUDO EXPERIMENTAL COM
RATOS**

SÃO LUIS
2016

STÉFANE DAISE LIMA FERREIRA

**AVALIAÇÃO DA REGENERAÇÃO HEPÁTICA COM O USO DE DIETA
SUPLEMENTADA COM L- ARGININA EM ESTUDO EXPERIMENTAL COM
RATOS**

Monografia apresentada ao Curso de Medicina
da Universidade Federal do Maranhão como
requisito à obtenção do Grau de Médico

Orientador: Prof. Dr. Orlando José dos Santos

SÃO LUIS

2016

STÉFANE DAISE LIMA FERREIRA

**AVALIAÇÃO DA REGENERAÇÃO HEPÁTICA COM O USO DE DIETA
SUPLEMENTADA COM L- ARGININA EM ESTUDO EXPERIMENTAL COM
RATOS**

Monografia apresentada ao Curso de Medicina
da Universidade Federal do Maranhão como
requisito à obtenção do Grau de Médico

Orientador: Prof. Dr. Orlando José dos Santos

BANCA EXAMINADORA

**Prof. Dr. Orlando José dos Santos - Orientador
Universidade Federal do Maranhão**

**Prof. Dr. Gutemberg Fernandes Araújo - Examinador 1
Universidade Federal do Maranhão**

**Prof. Mr. José Aparecido Valadão - Examinador 2
Universidade Federal do Maranhão**

Jordana Rikelly Santos Silva Durans - Examinador 3

**SÃO LUIS
2016**

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho de conclusão de curso ao nosso Senhor Jesus Cristo, pela força e coragem que me concedeu durante essa longa caminhada, pois nada seria de mim, sem o seu amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por todas as maravilhas que têm feito em minha vida e, neste momento em especial, pela conclusão do curso de medicina com este trabalho.

À minha família, em especial a minha mãe Claudinéia Lima, meu irmão Henrique Lima e minha avó Julia Lima de Sá, que mesmo distantes fisicamente, sempre estiveram presentes me apoiando e incentivando.

Ao meu namorado, Marcos Sousa, pela atenção, cuidado e alegrias proporcionadas em meio a tantos momentos difíceis.

À minha amiga irmã Jordana Rikelly, um presente de Deus, que me ensinou a lutar pelos meus objetivos e a fortalecer a minha Fé.

Ao Prof. Dr. Orlando José dos Santos, pela atenção e simplicidade. Sendo um exemplo de pessoa e profissional, uma referência de bons princípios.

A todos da Igreja de Cristo, pessoas enviadas por Deus para iluminar a minha vida e me aproximar cada dia mais do amor de Cristo.

À companheira de pesquisa, Widlani Sousa Montenegro, pela contribuição essencial na realização desta pesquisa.

À minha Turma 92, pelas experiências vividas. De forma especial, agradeço aos amigos Tamyls França, Érika Diniz, Joyce Leal, Dirley Martins, Andrieli Barros, Tamara Mascarenhas, Gustavo Nascimento e Klecio Holanda.

A todos aqueles que de alguma forma estiveram e estão próximos a mim, torcendo e me apoiando.

RESUMO

Introdução: A administração de aminoácidos, entre eles a L-arginina, tem mostrado efeitos favoráveis na regeneração hepática de animais. Os aspectos de regulação fisiológica da imunonutrição podem mostrar-se promissores no prognóstico do pós-hepatectomizado, contribuindo de forma significativa no tratamento de doenças do fígado. **Objetivo:** Avaliar o efeito da suplementação de L-arginina em ratos submetidos à hepatectomia parcial de 60% através de: alteração ponderal do fígado regenerado, parâmetros laboratoriais e estudo histológico. **Métodos:** Utilizou-se 36 ratos machos, distribuídos em dois grupos: grupo controle e grupo arginina. Cada um foi subdividido em mais três subgrupos com óbito em 24h, 72h e sete dias. O grupo arginina recebeu água e dieta padrão suplementada com L-arginina 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 e lesão hepática e análise de mitose celular pela coloração de Hematoxilina – Eosina. **Resultados:** A comparação de regeneração hepática através do peso não mostrou benefício com a suplementação de L-arginina. No entanto, nas primeiras 24 horas observou-se efeito significativo da suplementação da L-arginina ($p=0,008$) intragrupo. Exames laboratoriais mostraram que apenas ALP apresentou-se mais aumentada no grupo arginina ($p<0,04$). Na avaliação histológica em 24h houve maior número de mitoses no grupo L-arginina, não havendo diferença nos demais subgrupos. **Conclusão:** A suplementação de L-arginina não mostrou benefícios na regeneração do fígado. Porém, favoreceu o ganho ponderal e proliferação celular nas primeiras 24 h de pós-operatório .

Palavras-chave: L-arginina, regeneração hepática, hepatectomia.

ABSTRACT

Introduction: The administration of amino acid, including L-arginine, has been shown beneficial effects in animal liver regeneration. The aspects of physiological regulation of immunonutrition may be promising in post-hepatectomy prognosis, significantly contributing in the treatment of liver diseases. **Objective:** To evaluate the liver regeneration in rats subjected to 60% partial hepatectomy with and without the action of the diet supplemented with L-arginine by: change weight of regenerated liver, laboratory parameters of liver function and pathology studies. **Method:** 36 male rats were separated in two groups (control and L-arginine), which were then divided in three subgroups, according to death time (24hours, 72 hours and seven days after surgery). The L- arginine group received water and ration with L-arginine supplementation. The control group received saline solution 0,9%. In all subgroups, the liver regeneration was evaluated through liver weight gain, estimated by the formula KWON; alterations in function and injury laboratory test results and number of mitosis in parts of the liver stained with Hematoxylin and Eosin. **Results:** The comparison of regeneration through the evaluation of liver weight increase showed no benefit of supplementation with L-arginine. However, in the first 24 hours it was observed significantly effect of supplementation of L-arginine ($p=0,008$) intragroup. Laboratory tests showed that only ALP had become more increased in the arginine group ($p<0,04$). In histologic evaluation, there were more mitosis in the L-arginine group, with no difference in the other subgroups. **Conclusion:** Supplementation with L-arginine did not show benefits in liver regeneration. However, it has led to weight gain and liver cell proliferation in the first 24 hours.

KEYWORDS: L-arginine; Liver regeneration; Hepatectomy

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Alimentação por gavagem	14
Figura 2 - Procedimento anestésico	15
Figura 3 - Laparotomia mediana com exposição do fígado.....	16
Figura 4 - Fotomicrografia de corte hepático do grupo L-arginina com coloração HE, aumento 400x - presença de mitose (seta).....	23

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Avaliação final do peso dos ratos e fígados em relação ao tempo e ao grupo	20
Tabela 2 - Análise da % regeneração hepática.....	21
Tabela 3 - Avaliação das provas de função e lesão hepática em relação ao tempo - intragrupos e intergrupos.....	22
Tabela 4 - Análise da mitose	23

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AST -	Aspartato aminotransferase
ALT -	Alanina Aminotransferase
GGT -	Gama-Glutamiltranspeptidase
ALP -	Fosfatase Alcalina
MANOVA -	Análise de variância multivariada

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	Erro! Indicador não definido.
MÉTODOS	Erro! Indicador não definido.
RESULTADOS	Erro! Indicador não definido.
DISCUSSÃO	Erro! Indicador não definido.
CONCLUSÃO	Erro! Indicador não definido.
REFERÊNCIAS	Erro! Indicador não definido.
APÊNDICE	Erro! Indicador não definido.
ANEXO	Erro! Indicador não definido.

INTRODUÇÃO

A hepatectomia é uma cirurgia utilizada, dentre outras finalidades, para ressecções de tumores hepáticos primários e secundários¹, redução do fígado para transplante em pacientes pediátricos², para dividir o fígado em dois enxertos³ e, mais recentemente, utilizada no transplante de fígado intervivos⁴.

Os bons resultados em hepatectomias extensas são constantes graças às técnicas operatórias e manejo perioperatório mais aprimorados, bem como à capacidade de regeneração do fígado⁵.

O fígado tem uma grande capacidade de regeneração tecidual, mesmo após grande perda de substância, e a habilidade, em alguns casos, de absorver grandes traumas. A regeneração hepática no homem se completa em três meses e no rato, em 7 a 10 dias, estabelecendo-se assim como um excelente modelo experimental^{6,7}.

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 crescimento⁵.

A administração de aminoácidos, entre eles a L-arginina, tem mostrado efeitos favoráveis na regeneração hepática de animais. A L-arginina é considerada aminoácido condicionalmente essencial, uma vez que as necessidades tornam-se aumentadas durante o estresse metabólico. Possui importante função na barreira intestinal pela atuação nos mecanismos imunológicos e não imunológicos responsáveis pela manutenção da integridade desta barreira^{8,9}.

O efeito positivo da suplementação com aminoácidos, deve-se ao fato de participarem dos processos de ureagênese, gliconeogênese e síntese de proteínas. O fígado responde às dietas enriquecidas com esses aminoácidos pelo aumento da atividade transmembrana, favorecendo as funções do sistema hepático, durante o estado de hipercatabolismo¹⁰.

Dessa maneira, é interessante que se pesquise a relação da regeneração hepática com o uso suplementar da imunonutrição formulada com L-arginina. Os aspectos de regulação fisiológica da suplementação têm se mostrado promissores no prognóstico do hepatectomizado, contribuindo de forma significativa no tratamento de doenças do fígado.

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

MÉTODOS

O estudo foi realizado no Laboratório de Cirurgia Experimental do Maranhão (Lab-LACEMA-UFMA), da Universidade Federal do Maranhão, Brasil. Foram obedecidos os princípios éticos de pesquisa em animais da Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório e respeitadas as normas exigidas pela Lei Arouca¹⁹ nº 11794/2008, que regulamenta o uso científico de animais no Brasil. Tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal do Curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual do Maranhão, conforme protocolo nº 036/2012. O financiamento da pesquisa foi feito pelos próprios pesquisadores, sem conflitos de interesse.

Este artigo segue as normas para apresentação de documentos científicos e de referências bibliográficas da Revista de Pesquisa em Saúde do Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão –HUUFMA.

Foram utilizados 36 ratos (*Rattus norvegicus albinus*, *Rodentia mammalia*), da linhagem Wistar, machos, pesando entre 195 e 330 gramas. Os animais ficaram acomodados em nove gaiolas (caixas de polipropileno) de 0,15m² forradas com maravalha, com quatro animais por gaiola. Foram mantidos com água e ração padrão para a espécie (Purina® Labina) e passaram por um período de adaptação de sete dias sob temperatura de 23 ± 2°C, com ausência de ruídos e ciclo claro/escuro de 12 horas. Os ratos foram randomizados em dois grupos, cada um com 18 animais. O primeiro, foi definido como controle e o segundo, recebeu L-arginina. Ambos foram subdivididos em três subgrupos: morte em 24h, 72h e sete dias.

No grupo controle os animais receberam nutrição por via oral e água oferecida livremente, acrescida de infusão de soro fisiológico(1mL/100g) por

gavagem (Figura 1). No segundo grupo, além de serem alimentados com ração, foi administrada 15 minutos antes do procedimento cirúrgico 1mL/100g de solução de L-arginina 10% e uma dose igual a cada 24 horas até a data da morte, administrada por gavagem para garantir o recebimento total do nutriente.

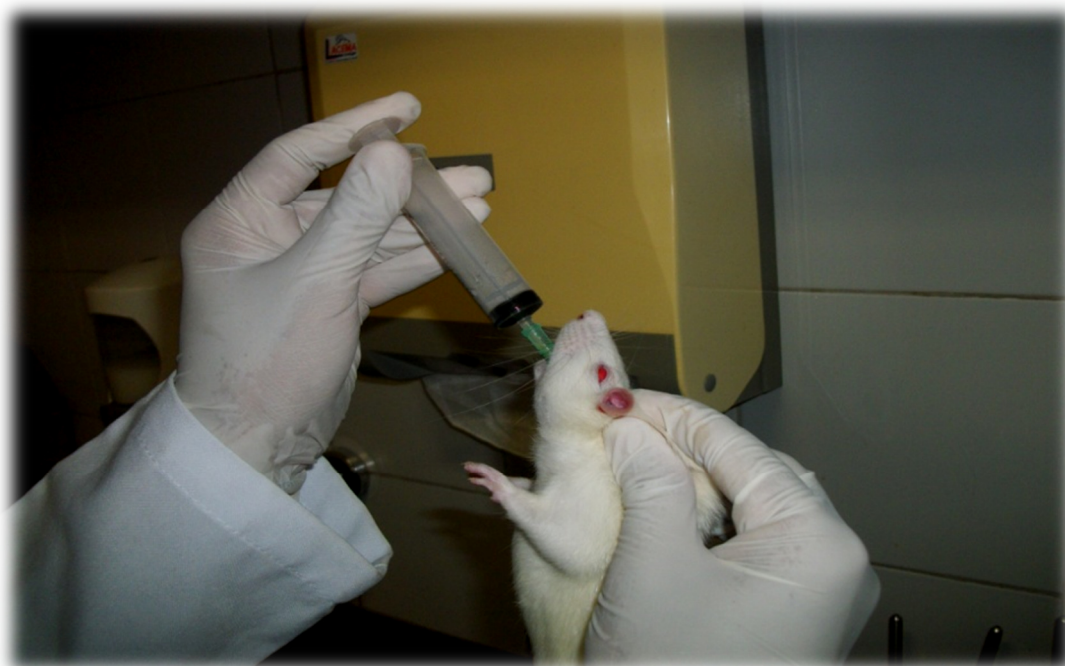


Figura 1 – Alimentação por gavagem

Procedimento anestésico

Os animais ficaram em jejum por 6 h antes do procedimento. A anestesia foi realizada após pesagem em balança eletrônica digital. Os animais foram contidos manualmente e submetidos à anestesia intramuscular com 40 mg/Kg de ketamina a 5% e 10 mg/Kg de xilazina a 2%, sendo a aplicação realizada na face posterior da coxa direita do animal (Figura 2). O rato foi considerado anestesiado quando se apresentou imóvel, com reflexos interdigitais e corneanos abolidos, respiração

normal e extremidades rosadas de acordo com o procedimento proposto por White, Johnston e Eger¹¹.



Figura 2 – Procedimento anestésico

Procedimento cirúrgico

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 foi definido a média de peso. Posteriormente foram anestesiados e sacrificados, tendo seus fígados retirados para pesagem e definida a proporção rato/fígado.

Após a anestesia, cada animal foi posicionado em decúbito dorsal e imobilizado em prancha de madeira (20 x 30 cm) com contenção dos membros anteriores e posteriores. Realizou-se a epilação da região ventral superior do abdome (4,0 cm²), antissepsia da região abdominal com povinilpirrolidona-iodo

(PVPI) e a colocação de campo fenestrado estéril sobre o animal, expondo o campo operatório.

Em seguida, foi realizada laparotomia mediana cerca de 4 cm de comprimento para dar acesso à cavidade abdominal (Figura 3). Após realização do inventário da cavidade, localizou-se o fígado e em seguida fez-se ressecção do ligamento hepático. Seguiu-se a ligadura do pedículo vascular para os lóbulos mediano e lateral esquerdo com fio de algodão 4-0 e posterior ressecção em bloco dos mesmos, resultando em hepatectomia parcial de aproximadamente 60%.

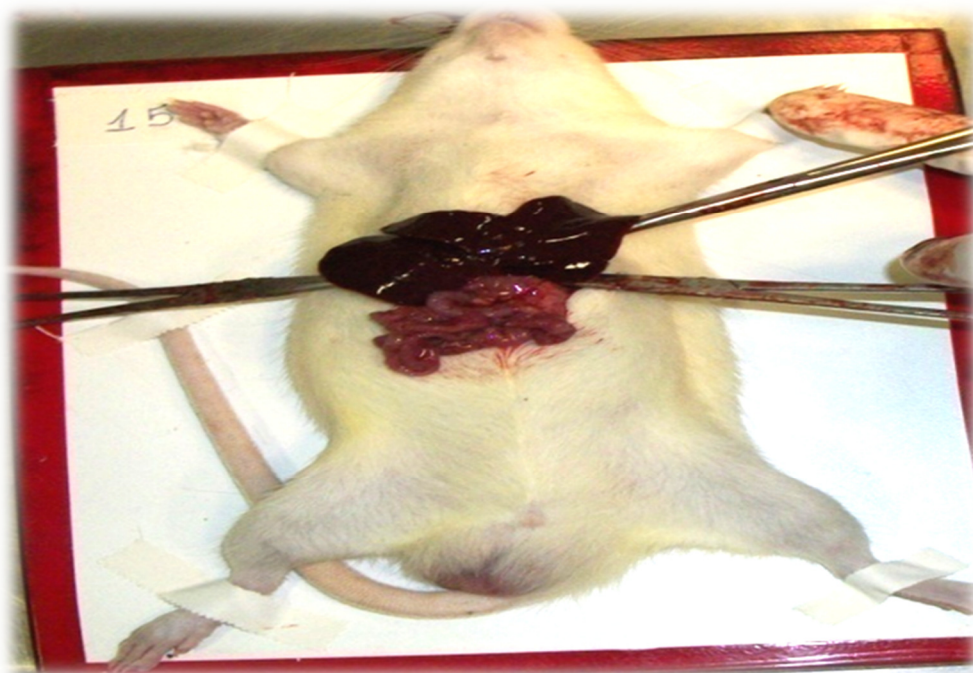


Figura 3 - Laparotomia mediana com exposição do fígado

A hemostasia foi cuidadosamente averiguada e então realizou-se a síntese da parede abdominal com fio de náilon 4-0 (MONONYLON®Ethicon), de agulha cortante com 2,0 cm, em dois planos, musculoaponeurótico e cutâneo, com sutura contínua. A ferida foi limpa com gaze embebida em solução de cloreto de sódio a 0,9% e em seguida com povinilpirrolidona-iodo.

O fígado retirado (60%) foi pesado em balança de precisão. O cálculo da taxa de regeneração baseada no peso foi feito através da fórmula de KWON e cols¹² : % de regeneração = $D/E \times 100$

Onde $E = R/0,7$ D= peso do fígado por 100 g do peso do animal no dia do sacrifício e E = representa a estimativa do fígado ressecado por 100 g antes da hepatectomia, que é calculada pelo peso do fígado ressecado (R).

A analgesia pós-operatória foi feita com aplicação de 0,1mL de dipirona 500mg/mL, intramuscular na região posterior da pata traseira esquerda. Após o procedimento cirúrgico, os animais aguardaram recuperação em condições adequadas.

Seis horas após o ato cirúrgico, os ratos tiveram livre acesso à água e após 12 horas à alimentação, acondicionados nas mesmas condições de temperatura e luminosidade do pré-operatório

Coleta de material

Nos períodos estabelecidos (24h, 72h e sete dias) procedeu-se sob as mesmas condições anestésicas, a abertura da cavidade abdominal foi realizada mediante duas incisões transversais e outra longitudinal paralela 1cm à esquerda da cicatriz mediana decorrente do ato operatório prévio, a fim de não alterar as possíveis aderências das estruturas abdominais à parede.

A coleta sanguínea se deu através da punção da veia cava caudal colhendo-se 4mL de sangue e colocado em tubo de ensaio sem anticoagulante para dosagem de: aspartato aminotransferase(AST), alanina aminotransferase, (ALT), gama-glutamiltanspeptidase (GGT) fosfatase alcalina (ALP), bilirrubinas totais, bilirrubina

indireta, bilirrubina direta, proteínas totais, albumina e globulina. Todos os exames foram realizados no Laboratório Cernitas em São Luis, MA.

A morte do animal deu-se por exsanguinação e naqueles em que ela não ocorreu após tal procedimento, realizou-se overdose anestésica com quatro vezes o valor da dose para indução anestésica.

Avaliação histológica

A avaliação histológica foi realizada com peças cirúrgicas imersas em formaldeído a 10%, obtendo-se cortes que foram corados pela Hematoxilina-Eosina. As amostragens macroscópicas foram padronizadas para todos os espécimes, realizando-se cortes transversais na porção média do fragmento hepático. Após desidratação, diafanização e emblocamento dos tecidos em parafina, foram realizadas microtomias de 4 μ m. Análise de 10 campos de grande aumento com objetiva de 40x (aumento de 400x). Foram avaliados pelo menos dois níveis, tendo sido considerada média dos campos avaliados. O microscópio utilizado foi OLYMPUS CX31. A análise foi realizada por um único patologista sem conhecimento dos grupos em estudo, no serviço de Anatomia Patológica do Hospital São Domingos.

Análise estatística

Os dados foram avaliados pelo programa *SPSS for Windows 17.0* (2007). Inicialmente, foi feito o teste de normalidade de Shapiro-Wilk e somente as variáveis Peso inicial e final do rato, peso inicial e final do fígado e percentual rato fígado final apresentaram distribuição normal ($p > 0,05$). Nestas, 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 sem distribuição normal foram aplicados os teste não paramétricos de Mann-Whitney para avaliar o efeito do grupo e o teste Kruskal-Wallis para avaliar o do tempo. O nível de significância para se rejeitar a hipótese de nulidade foi de 5%, ou seja, considerou-se como estatisticamente significante valor de $p < 0,05$.

RESULTADOS

Todos os 36 animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico proposto. No grupo arginina, dois animais morreram nas primeiras 24 horas após operação, antes do tempo previsto para seu grupo, relacionada à indução anestésica. Os animais nesse contexto foram retirados da análise.

Os animais apresentaram peso inicial (animal e fígado) equivalente nos dois grupos .

Ganho ponderal do fígado

Quanto ao aumento do peso do fígado no último dia do experimento comparado ao dia da intervenção cirúrgica, não apresentou dados estatisticamente significantes (Tabela 1).

Tabela 1 - Avaliação final do peso dos ratos e fígados em relação ao tempo e ao grupo

Tempo	Grupo	N	Peso final rato (g)	Peso final fígado(g)
24 h	Controle	6.0	223.8 a	5.0 a
	Arginina	6.0	250.7 a	4.4 a
	Valor de p		0.052	0.535
72 h	Controle	6.0	249.5 a	10.3 a
	Arginina	5.0	275.8 a	9.9 a
	Valor de p		0.161	0.681
7 dias	Controle	6.0	249.5 a	10.3 a
	Arginina	5.0	275.8 a	9.9 a
	Valor de p		0.161	0.681

g = gramas

a,b Letras diferentes significa $p < 0,05$ em relação ao grupo

P = nível de significância estatística ; Teste de MANOVA

A avaliação de regeneração em relação ao tempo de sacrifício foi significativamente relevante no grupo L-arginina para 24 horas ($P < 0,05$). O percentual de regeneração teve $p < 0,05$ para o grupo Controle (Tabela 2).

Tabela 2 - Análise da % regeneração hepática

Grupo	Tempo	N	Mediana	P
Controle		16	112.5 A	0.015
	24 h	4	61.3 a	
	72 h	6	161.5 a	
	7 dias	6	109.5 a	
Arginina		16	85.3 B	0.008
	24 h	6	50.3 b	
	72 h	5	93.3 a	
	7 dias	5	104.9 a	

A,B Letras diferentes significa $p < 0,05$ para grupo

a,b Letras diferentes significa $p < 0,05$ para tempo dentro de grupo

P=nível de significância estatística ; Teste de MANOVA

Análise laboratorial

Na avaliação da função e lesão hepática apenas ALP, mostrou-se substancialmente maior no grupo arginina, sendo estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Avaliando as alterações laboratoriais intragrupos alguns resultados chamam atenção. No grupo controle exames relacionados à função hepática (Tabela 3) não apresentou variação com significância. No entanto a AST apresentou valores importantes nas primeiras 24 horas.

Não houve alterações da função hepática relacionada ao tempo. No entanto AST, com valores mais elevados em 72 horas de hepatectomia. A globulina

apresentou alteração importante aos sete dias ($p < 0,05$) no grupo L-arginina (Tabela 3).

Tabela 3- Avaliação das provas de função e lesão hepática em relação ao tempo - intragrupos e intergrupos.

Variáveis	Controle				L-arginina				P(intergrupos)
	24h	72h	7dias	p(intragrupo)	24h	72h	7dias	p(intragrupo)	
AST	6	6	6	0,052	6	5	5	0,060	0,281
ALT	6	6	6	0,522	6	5	5	0,390	0,574
GAMA GT	6	6	6	0,944	6	5	5	0,355	0,67
ALP	6	6	6	0,169	6	5	5	0,058	0,042
Bilirrubina total	6	6	6	0,210	6	5	5	0,848	0,572
Bilirrubina indireta	6	6	6	0,815	6	5	5	0,796	0,986
Bilirrubina direta	6	5	6	0,405	6	5	5	0,950	0,631
Proteínas totais	6	6	6	0,741	6	5	5	0,099	0,154
Albumina	6	6	6	0,758	6	5	5	0,500	0,181
Globulina	6	6	6	0,159	6	5	5	0,009	0,551

P=nível de significância estatística ; Teste de Mann-Whitney

Análise anatomopatológica

A avaliação de regeneração do fígado utilizando o número de mitose das células hepáticas (Tabela 4), mostrou que em ambos os grupos obteve-se resultados semelhantes ($p > 0,05$).

A avaliação de mitose em relação do tempo de sacrifício evidenciou no grupo controle não existir diferença intragrupo. No entanto no grupo L-arginina houve significativamente mais mitose nas 24 h iniciais do que em 72 h e sete dias ($p < 0,05$) (Figura 4).

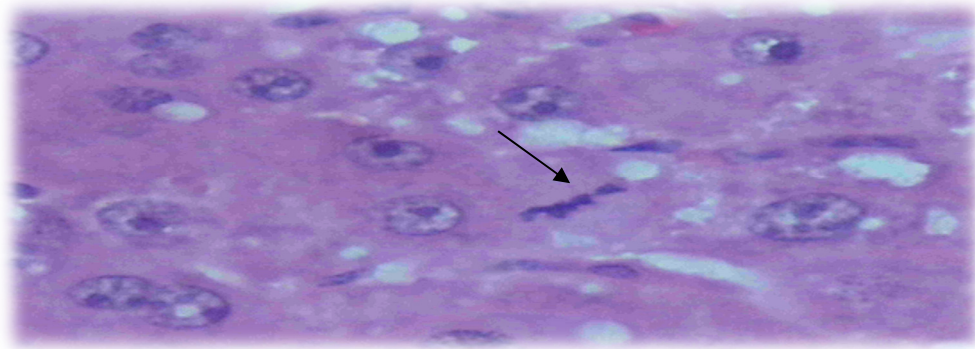


Figura 4 – Fotomicrografia de corte hepático do grupo L-arginina com coloração HE, aumento 400x - presença de mitose (seta).

Tabela 4 - Análise da mitose

Grupo	Tempo	N	Mediana	P
Controle		18	4.0 A	0.903
	24 h	6	7.5 a	0.069
	72 h	6	10.5 a	
	7 dias	6	2.0 a	
Arginina		16	8.0 A	
	24 h	6	6.0 ab	0.036
	72 h	5	10.0 a	
	7 dias	5	2.0 b	

A Letras iguais significa $p \geq 0,05$ para grupo

a,b Letras diferentes significa $p < 0,05$ para tempo dentro de grupo

P=nível de significância estatística , Teste de Mann-Whitney

DISCUSSÃO

Trabalhos recentes demonstraram o efeito favorável da administração de aminoácidos na regeneração hepática em animais de experimentação¹³. A suplementação da dieta com L-arginina foi definida pelas propriedades de cicatrização e pelo papel importante nas atividades biológicas, funções metabólicas e imunológicas. O organismo, sob condições de trauma grave, necessita de maior quantidade de nutriente, que passa a ser classificado como aminoácido condicionalmente essencial.

Kurokawa *et al.*⁵ avaliou o efeito da L-arginina sobre a regeneração do peso hepático em ratos hepatectomizados a 70 %. Em relação ao peso não foi observada diferença nos grupos do trabalho, mas em relação ao antígeno de proliferação celular nuclear os resultados foram muito positivos para L-arginina.

Neste trabalho ao avaliar regeneração pelo peso do animal, não se conseguiu confirmar o benefício da L-arginina na regeneração hepática em relação ao grupo controle. O grupo controle teve resultado melhor que a L-arginina até o período estudado. Em relação ao dia de sacrifício dos animais (24 h, 72 h e sete dias), foi observado efeito importante da suplementação de L-arginina nas primeiras 24 h, com significância estatística ($p=0,03$), levando à compreensão de que L-arginina pode favorecer a regeneração hepática apenas nas primeiras 24 horas de pós-operatório. O grupo controle não apresentou diferenças de regeneração entre os períodos estudados.

Ressecções extensas do fígado podem acarretar em insuficiência hepática aguda. Em estudos realizados com hepatectomia a 70%, as provas de função hepática permanecem dentro dos limites da normalidade. Em uma avaliação de regeneração hepática após hipertensão portal, mostrou que houve alteração

hepática no fígado remanescente relacionada aos níveis de colesterol, proteínas totais, albumina e globulina e tempo de atividade protrombinica (TAP). As transaminases ALT e AST, fosfatase alcalina, a gama glutamiltranspeptidase (GGT), a glicemia, TTPA (Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada), bem como a excreção de bilirrubinas apresentaram valores dentro dos parâmetros normais¹⁵.

Alguns estudos têm relatado que os lobos hepáticos residuais pós-hepatectomia, apesar do processo de regeneração em curso, mantêm todas as funções hepáticas necessárias para manter a homeostase orgânica em níveis normais¹⁶.

Quando comparado os grupos controle e arginina deste trabalho, apenas é observado significativa diferença ($p < 0,05$) para ALP. Ela mostrou-se mais elevada nos ratos que foram suplementados com L-Arginina. AST, ALT, bilirrubinas foram comparáveis. Ainda, quando analisado os mesmos exames nos períodos do estudo (24 h, 72 h e sete dias) a globulina teve aumento significativo nos animais sacrificados no sétimo dia pós hepatectomia.

O aumento progressivo do fígado se deve a dois picos de mitoses, encontrados normalmente durante o processo de regeneração. O primeiro ocorre nas primeiras 24h após a hepatectomia e está relacionado exclusivamente aos hepatócitos¹². 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%¹⁷. Em seu estudo, testando o efeito do Tacrolimus sobre a regeneração hepática, Gama-Filho et al.¹⁸ encontraram diferença estatística inter e intragrupos 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 intragrupo (grupo L-arginina) apenas nas 24h de experimento ($p < 0,05$). No controle não foi observado diferença entre os subgrupos.

CONCLUSÃO

A avaliação de regeneração hepática em ratos submetidos à hepatectomia de aproximadamente 60% com suplementação de L-arginina foi:

- Avaliando-se a regeneração hepática pelo peso do fígado não se observa benefício com o uso de L-arginina. O grupo controle teve maior taxa regeneração. No entanto nas primeiras 24 h a L- arginina consegue favorecer substancialmente a regeneração hepática.
- Utilização de parâmetros laboratoriais não foi observada diferenças em relação à suplementação de L- arginina.
- A mitose celular foi significativamente maior nas primeiras 24 h de hepatectomia em animais suplementados com L-arginina.

REFERÊNCIAS

1. Buell JF, Rosen S, Yoshida A, Labow D, Limsrichamrern S, Cronin DC et al. Hepatic resection: effective treatment for primary and secondary tumors. *Surgery*, 2000; 128(4):686-693.
2. de Hemptinne B, Salizzoni M, Yandza TC, de Ville de Goyet J, Tan KC, Kestens PJ et al. Indication, technique and results of liver graft volume reduction before orthotopic transplantation in children. *Transplant Proc*, 1987; 19(5):3549-3551.
3. Bismuth H, Morino M, Castaing D, Gillon MC, Descorps Declere A, Saliba F et al. Emergency orthotopic liver transplantation in two patients using one donor liver. *Br J Sur*, 1989; 76(7):722-724.
4. Raia S, Nery JR, Mies S. Liver transplantation from liver donors. *Lancet*, 1989; 2(8661):497.
5. 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
6. Torres, O. J. T *et al.* Hepatectomia central. ABCD. Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva, 2005; v. 18, p. 30-32.
7. Torres, O. J. T *et al.* Ressecções hepáticas: experiência inicial e resultados cirúrgicos a médio prazo. ABCD. Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva, 2004; v 17, p. 3-7.
8. Wu, G.; Bazer, F.W.; Davis, T.A.; Kim, S.W.; LI, P.; Rhoads, J.M.; Sateerfield, M.C.; Smith, S.B.; Spencer, T.E.; Yin, Y. Arginine metabolism and nutrition in growth, health and disease. *Amino Acids.*, 2009; v.37, p. 153-168.
9. Choi, B.S.; Martinez-falero, I.C.; Corset, C.; Munder, M.; Modolell, M.; Muller, I.; Kropf, P. Differential impact of L-arginine deprivation on the activation and effector functions of T cells and macrophages. *J. Leukoc. Biol.*, 2009; v.85, p. 268-277.
10. Sales, R.P. *et al*; Efeitos da suplementação aguda de aspartato de arginina na fadiga muscular em voluntários treinados. *Revista Brasileira Medicina Esporte*, 2005; v. 11, p. 347 – 351.
11. White, P.F.; Johnston, R.R.; Eger, E.I. 2nd Determination of anesthetic requirement in rats. *Anesthesiology*, 1974; v. 40, p. 52 – 57.

12. Kwon, M.D. *et al.* Effect of Administration of Fibronectin or Aprotinin on Liver Regeneration After Experimental Hepatectomy. *Annals of surgery.*, 1989; v. 211, p. 295 – 300.
13. Godoy, J. L. Matias, J. E .F. Coelho, J. C. U. Regeneração hepática: o mito de Prometeu revisado. *Jornal Brasileiro de Transplante*, 2006; v. 9, p. 535 – 539.
14. Taha, M. O. *et al.* L-Arginine Supplementation Protects Against Hepatic Ischemia–Reperfusion Lesions in Rabbits. *Transplantation Proceedings*, 2009; v. 41, p. 816–819.
15. Aguiar, L. R. F. *et al.* Regeneração do Fígado após hepatectomia parcial em ratos submetidos à Hipertensão portal pós-hepática. *ABCD Arquivo Brasileiro Cirurgia Digestiva*, 2011; v. 24, p. 144-151.
16. MELO, J.U.S. *et al.* Efeitos dos ácidos graxos sobre a regeneração hepática em ratos. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões*, 2010; v.37, p.351-357.
17. Koniaris LG, Mckillop IH, Schwartz SI, Zimmers TA. Liver regeneration. *J Am Coll Surg.* 2003;197(4):634-59.
18. Gama Filho, O. *et al.* Imunossupressão com tacrolimus favorece a regeneração hepática induzida por hepatectomia ampla em ratos. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões*, 2010; v. 37, p. 218-225.

APÊNDICE**FICHA PROTOCOLO****Identificação**

RATO: _____

GAIOLA Nº: _____

GRUPO: () L- ARGININA () CONTROLE

DIA DO SACRÍFÍCIO () 24 HORAS () 72 HORAS () SETE DIAS

Anestesia

INDUÇÃO ANESTÉSICA: _____ MANUTENÇÃO: _____ DOSE: _____

COMPLICAÇÃO ANESTÉSICA: () SIM () NÃO

Cirurgia

DATA: / /

COMPLICAÇÕES: _____

Pesagem

PESO INICIAL DO RATO

PESO FINAL DO RATO

PESO INICIAL DO FÍGADO:

PESO FINAL DO FÍGADO

PRODUTO DA HEPATECTOMIA:

% DE REGENERAÇÃO POR KWON:

Exames laboratoriais

Aspartatoaminotransferase (AST) Alanina Aminotransferase (ALT)

Gama-Glutamiltranspeptidase (GGT) Fosfatase Alcalina (ALP)

Bilirrubinas Totais Bilirrubina Indireta Bilirrubina Direta

Proteínas Totais Albumina Globulina

Glicemia UréiaCreatinina

Anatomopatológico**Nº de mitose****Óbito**

() Não () Sim

DATA DO ÓBITO: / /

CAUSA: _____

ANEXO



Universidade Estadual do Maranhão

DECLARAÇÃO

Declaramos aos devidos fins que o projeto intitulado “**Avaliação da regeneração hepática por estudo experimental com uso de imunonutrição suplementada com L-Arginina, L-Glutamina e Ômega 3**” de autoria de **Cibelle Ribeiro Magalhães, Widlani Sousa Montenegro e Rosilda Mendes da Silva**, sob a orientação do Prof. Dr. Orlando Jorge Martins Torres e colaboração de Gustavo Dias Nascimento, Klécio Holanda Leal de Freitas e Julieth Ferreira de Sousa, foi submetido ao Comitê de Ética e Experimentação Animal do Curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual do Maranhão, conforme protocolo nº. 036/2012, sendo aprovado por atender as normas da Resolução do CFMV nº. 879/2008 e a Lei nº. 11794/2008, que tratam dos procedimentos Éticos na Experimentação Animal.

São Luís – MA, 08 de março de 2013.

A handwritten signature in cursive script, appearing to read "Alana", is written above a horizontal line.

Prof.^a Dr.^a Alana Lislea de Sousa
Presidente do CEEA/CMV/UEMA