

# REPERCUSSÕES TEMPORAIS DA LIGADURA DO DUCTO BILIAR PRINCIPAL EM RATOS WISTAR<sup>1</sup>

Eugenio Lincoln Campos Maia<sup>2</sup>

Sérgio Botelho Guimarães<sup>3</sup>

Ana Cristina Sociro Maia<sup>4</sup>

Juliana Sociro Maia<sup>5</sup>

Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos<sup>6</sup>

Maia ELC, Guimarães SB, Maia ACS, Maia JS, Vasconcelos PRL. Repercussões temporais da ligadura do ducto biliar principal em ratos Wistar. Acta Cir Bras [serial online] 2003 Jan-Fev;18(1). Disponível em URL: <http://www.scielo.br/acb>.

**RESUMO – Objetivo:** Objetivou-se investigar os efeitos temporais da ligadura do ducto biliar principal, em ratos Wistar. **Métodos:** Utilizaram-se 48 ratos machos distribuídos em 2 grupos e redistribuídos em 4 subgrupos (n=06), identificados pelo tempo estipulado para a coleta das amostras (12, 24, 48 e 168 horas). Após laparotomia, os animais foram submetidos à dissecação e passagem de dois fios circundando o ducto biliar principal, sem ligadura (Grupo 1) e com ligadura (Grupo 2). **Resultados:** As concentrações das bilirrubinas séricas (total, direta e indireta) quando comparadas ao respectivo grupo controle, aumentaram ( $p < 0,05$ ) nos animais do grupo 2, nos tempos 24, 48 e 168 horas. As concentrações de proteína C reativa e fosfatase alcalina aumentaram ( $p < 0,05$ ) no grupo 2 no tempo 24 horas e nos tempos 24 e 48 horas, respectivamente. Concentrações de albumina e gama-glutamil transferase, não apresentaram diferenças significantes nos dois grupos. Foram observadas, no exame histopatológico, hiperplasia ductal, pericolangite e colangite no grupo 2 e pericolangite no grupo 1. **Conclusões:** A ligadura do ducto biliar principal induz aumento das concentrações séricas de bilirrubinas, proteína C reativa e fosfatase alcalina. Hiperplasia ductal, pericolangite e colangite são as principais alterações histológicas encontradas nos fígados dos ratos submetidos à ligadura do ducto biliar principal.

**DESCRITORES** – Obstrução das vias biliares extrahepáticas. Colestase. Modelos animais. Ratos.

## INTRODUÇÃO

A conduta terapêutica nas obstruções e os estreitamentos das vias biliares extra-hepáticas representam difíceis desafios ao jovem cirurgião. Cerca de oitenta

por cento dessas lesões ocorrem após o manuseio dos ductos biliares extra-hepáticos durante operações de colecistectomias ou outras operações abdominais altas, incluindo gastrectomias, *shunt* porto-cava, procedimentos sobre o duodeno, pâncreas, papila de Water e

1. Trabalho realizado no Laboratório de Cirurgia Experimental (LABCEX), Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Cirurgia, Faculdade de Medicina, Departamento de Cirurgia da Universidade Federal do Ceará (UFC).
2. Professor Adjunto de Cirurgia, e Mestrando em Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia, UFC.
3. Mestre em Cirurgia, Professor Adjunto do Departamento de Cirurgia, UFC, Vice-Coordenador de Graduação (Faculdade de Medicina – UFC).
4. Estudante de Medicina (UFC).
5. Estudante de Odontologia (UFC).
6. Professor Doutor (*PhD*), Coordenador do Curso de Pós-Graduação *stricto sensu* em Cirurgia da Faculdade de Medicina (UFC).

o próprio fígado<sup>1</sup>. Além das causas iatrogênicas, as obstruções biliares extra-hepáticas podem ser conseqüências de coledocolitíase; colangite esclerosante; atresias das vias biliares; pancreatite crônica; tumor de estômago; tumor de duodeno, tumor de cabeça de pâncreas, tumor da papila de Water; tumor da vesícula biliar; ascaridíase ductal e compressões extrínsecas<sup>2</sup>.

A icterícia é a conseqüência mais visível da obstrução biliar extra-hepática e se manifesta quando a bilirrubinemia atinge os 3,5 mg./dl<sup>3</sup>. Outros eventos metabólicos, bioquímicos e histológicos estão relacionados com a obstrução biliar extra-hepática. Redução na síntese de albumina, aumento da proteína C reativa e enzimas hepáticas são outras conseqüências do estresse imposto pela obstrução biliar<sup>4</sup>.

Este estudo pretende contribuir, através das análises dos principais marcadores bioquímicos e morfológicos da colestase, para a definição da importância de cada um deles no diagnóstico e na evolução das obstruções biliares extra-hepáticas.

## MÉTODOS

A pesquisa foi realizada de acordo com as Normas Internacionais para a Pesquisa Biomédica e com a Lei Federal n.º 6. de 08 de maio de 1979. Foram utilizados quarenta e oito (48) ratos (*Mammalia Rodentia, Muridae, Rattus Norvegicus Albinus*), da linhagem Wistar, machos, adultos, com peso entre 250 a 300g, procedentes do Biotério Central do Laboratório de Cirurgia Experimental (LABCEX) do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará. Os animais foram distribuídos em dois grupos (1 e 2), cada um com quatro subgrupos de seis animais.

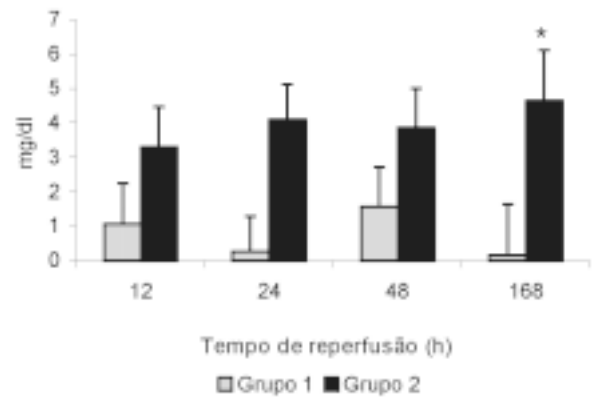
Os animais do grupo 1 foram laparotomizados e submetidos a dissecação e a passagem de dois fios circundando o ducto biliar principal, sem ligadura. No grupo 2 foi realizada a ligadura do ducto biliar principal. Seguiu-se a reoperação e coleta das amostras, nos intervalos pré-estabelecidos (12, 24, 48 e 168 horas após a operação inicial). A coleta de sangue foi feita em todos os animais, enquanto que para a amostra do tecido hepático o animal foi escolhido ao acaso (um rato de cada subgrupo).

As amostras de sangue foram processadas por automação e analisadas para a determinação das concentrações séricas das bilirrubinas (total, direta e indireta), da albumina, da proteína C reativa, da fosfatase alcalina e da gamaglutamil transferase. As lâminas histológicas foram confeccionadas de forma automatizada, com cortes padronizados em 5 (cinco) micra e coradas por hematoxilina-eosina. A análise

estatística dos resultados foi realizada através do teste de Mann-Whitney, utilizando o MINITAB STATISTICAL SOFTWARE para Windows 95, 98, 2000 e NT Versão 13, 2000.

## RESULTADOS

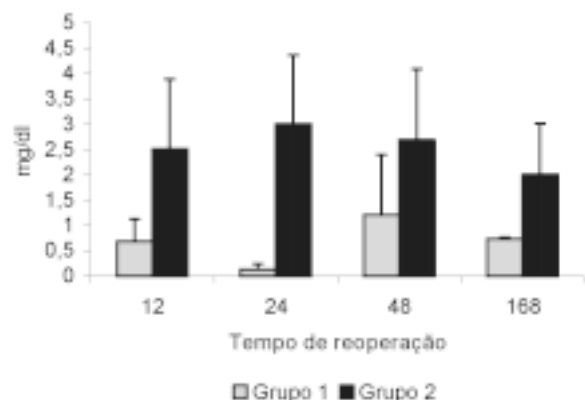
No presente estudo observou-se elevação significativa da bilirrubinemia total ( $p < 0,005$ ) nos tempos de 24, 48 e 168 horas (Figura 1).



●  $p < 0,005$  (Teste de Mann-Whitney)

FIGURA 1 – Concentrações séricas de bilirrubina total.

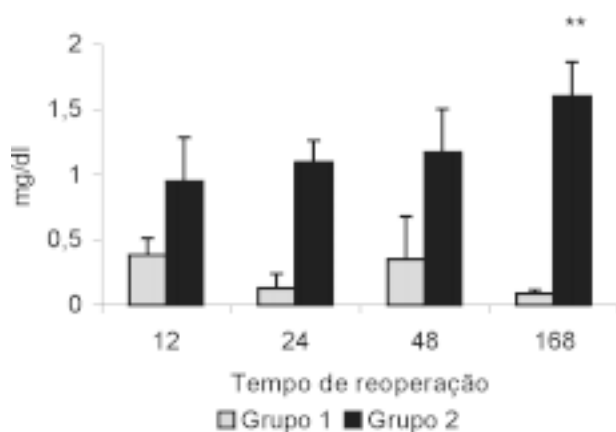
A bilirrubina direta aumentou nos tempos 24 e 48 ( $p < 0,05$ ) e 168 ( $p < 0,01$ ) horas, dos animais do grupo 2, quando comparados aos respectivos controles (Figura 2).



\*  $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$  (Teste de Mann-Whitney)

FIGURA 2 – Concentrações séricas de bilirrubina direta.

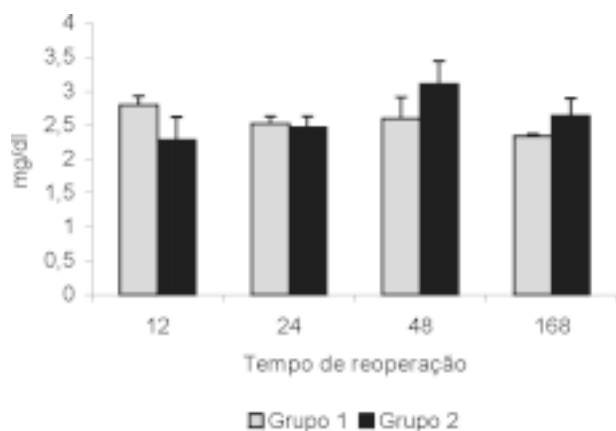
A fração indireta da bilirrubina também aumentou nos tempos 24 ( $p < 0,01$ ), 48 ( $p < 0,05$ ), e 168 ( $p < 0,01$ ) horas, nos animais obstruídos, porém, em números absolutos, houve predomínio da elevação da fração direta da bilirrubina sobre a indireta, em todos os sub-grupos estudados (Figura 3).



\*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$  (Teste de Mann-Whitney)

FIGURA 3 – Concentrações séricas de bilirrubina indireta.

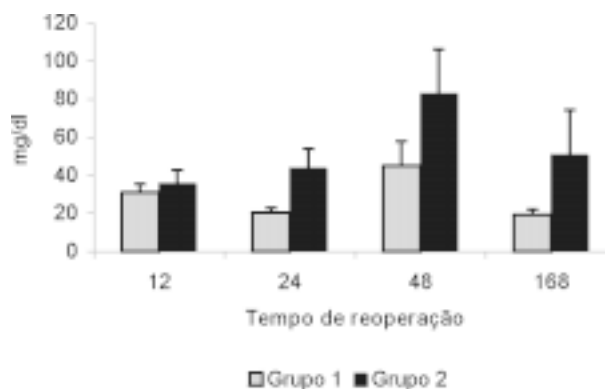
As concentrações séricas da albumina não se modificaram, nos tempos estudados, em nenhum dos dois grupos (Figura 4).



(Teste de Mann-Whitney)

FIGURA 4 - Concentrações séricas de albumina.

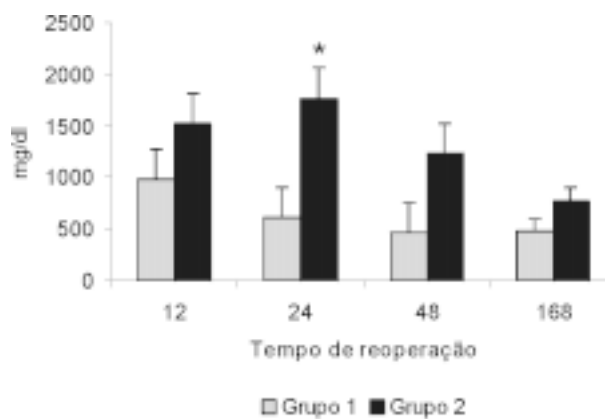
A concentração sérica da proteína C reativa aumentou nos dois grupos, com predomínio dos valores do grupo 2 e com significância estatística no tempo de 24 horas pós ligadura ( $p < 0,05$ ), quando comparado com o respectivo controle (Figura 5).



$p < 0,05$  (Teste de Mann-Whitney)

FIGURA 5 – Concentrações séricas da proteína C reativa.

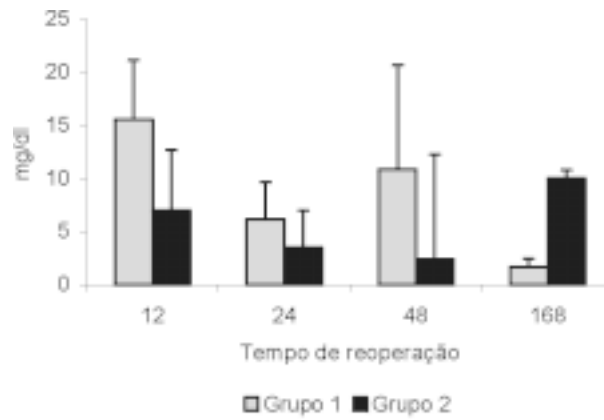
As concentrações séricas de fosfatase alcalina aumentaram em ambos os grupos de animais e de forma mais intensa nos que foram submetidos a ligadura da via biliar extra-hepática e em especial nos sub-grupos de 12 e 24 horas do grupo 1, mostrando níveis acima de 1500 UI/l e significância estatística ( $p < 0,05$ ), no sub-grupo 24 horas (Figura 6).



•  $p < 0,05$  (Teste de Mann-Whitney)

FIGURA 6 – Concentrações séricas de fosfatase alcalina.

As concentrações séricas da gamaglutamil transferase dos animais estudados, não apresentaram diferenças estatísticas significantes entre os dois grupos de animais estudados (Figura 7).



(Teste de Mann-Whitney)

FIGURA 7 – Concentrações séricas da gamaglutamil transferase.

As observações morfológicas estão na Tabela 1.

TABELA 1 – Alterações morfológicas no parênquima hepático (ratos Wistar).

Alterações morfológicas no parênquima hepático								
Tempo de reoperação (horas)								
	12		24		48		168	
	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 1	Grupo 2
Hiperplasia ductal	-	-	-	-	-	-	-	+++
Colangite	-	+	-	-	-	-	-	+
Pericolangite	++	+	-	+	-	+	-	+
Grupo 1 – Operação simulada					Grupo 2 – Dupla ligadura			
<b>Legenda:</b>	(-)		(+)		(++)		(+++)	
	Negativa		Discreta		Moderada		Acentuada	

## DISCUSSÃO

Corlette<sup>5</sup> *et al.* (1976) realizando experimentos com ratos Wistar, obstruindo a via biliar extra hepática, obtiveram elevação da bilirrubinemia após uma hora e da fosfatase alcalina após quatro horas do início da obstrução. Outros pesquisadores também demonstraram aumentos significantes da bilirrubinemia decorrentes da ligadura do ducto biliar comum, em ratos, em diversos intervalos, variando de 5 a 20 dias<sup>6</sup>.

No presente estudo, as concentrações séricas da bilirrubina total, repetindo os resultados obtidos pelos autores citados, também se elevaram nos animais submetidos à ligadura do ducto biliar principal (grupo 2), quando comparados com seus respectivos controles, que apresentaram níveis séricos de bilirrubina

total em concentrações inferiores a 1,56 mg/dl (Figura 1). As elevações da bilirrubinemia total tiveram significância estatística nos tempos de 24 ( $p < 0,005$ ), 48 ( $p < 0,005$ ), e 168 ( $p < 0,005$ ) horas. O aumento da bilirrubina pode ser explicado pela obstrução biliar extra-hepática, com refluxo da bile para dentro do sangue (colestase)<sup>7</sup>. O aumento significativo das frações direta e indireta da bilirrubina (Figura 3 e 4), nos animais obstruídos, com predomínio da elevação da fração direta da bilirrubina sobre a indireta, em números absolutos, em todos os sub-grupos estudados é explicado pela impossibilidade de eliminação normal da bilirrubina direta através do ducto biliar principal e ausência de alterações importantes no metabolismo hepático da bilirrubina, justificadas pela ausência de alterações severas na

morfologia hepática (Tabela 1) Não foi possível identificar, na literatura, trabalhos relatando alterações dos valores das bilirrubinas direta e indireta em ratos ou outros animais de laboratório.

Gouma<sup>8</sup> *et al.* (1986), em experimento realizado em ratos submetidos a ligaduras do ducto biliar principal encontraram, após três semanas da operação, reduções significantes ( $p < 0,001$ ) nas concentrações séricas da albumina.

Krahenbuhl<sup>9</sup> *et al.* (1995), analisando as concentrações da albumina em ratos que sofreram ligadura do ducto biliar extra-hepático, comprovaram que as concentrações séricas desta diminuem significativamente duas semanas e quatro semanas pós ligadura, quando comparadas com os controles.

Hiraziwa<sup>10</sup> *et al.*, (1997), ao desenvolverem técnica para indução de icterícia obstrutiva em rato, concluíram que a redução da concentração sérica da albumina se inicia após sete dias da obstrução biliar.

Neste experimento, as concentrações séricas da albumina não se modificaram, nos tempos estudados, em nenhum dos dois grupos (Figura 4). É possível que esse fato possa ser justificado pelo breve tempo do estudo (168 horas).

A proteína C reativa é uma proteína de fase aguda<sup>11</sup>, que tem sido utilizada na prática médica como marcador diagnóstico para as mais diversas circunstâncias. Estudo experimental realizado por Kimura<sup>12</sup> *et al.*, (1992) concluiu que o aumento da síntese protéica hepática observado em ratos com icterícia obstrutiva, corresponde, nas primeiras setenta e duas horas, a elevação da produção hepática de proteínas de fase aguda positiva. Justifica-se, assim, o aumento da concentração sérica da proteína C reativa com predomínio dos valores do grupo 2 e com significância estatística no tempo de 24 horas pós ligadura ( $p < 0,05$ ), quando comparado com o respectivo controle, nos dois grupos estudados, no presente trabalho (Figura 5).

A elevação das concentrações séricas de fosfatase alcalina tem sido motivo de grande número de publicações clínicas de experimentos. Picinato<sup>13</sup> *et al.* (1992) mostraram níveis séricos de fosfatase alcalina significativamente aumentados 24 horas após a dupla ligadura em relação aos controles (não ligados). Nos tempos de 48 e 168 horas as elevações não tiveram significância estatística. Castro e Silva Jr.<sup>14</sup> *et al.*, (1993), após 1, 7 e 14 dias da indução da colestase extra-hepática em ratos encontrou valores elevados de fosfatase alcalina, indicando que esta é uma enzima ideal como indicador de colestase.

Neste trabalho experimental, as concentrações séricas de fosfatase alcalina aumentam em ambos os grupos de animais e de forma mais intensa nos que

foram submetidos a ligadura da via biliar extra-hepática e em especial nos sub-grupos de 12 e 24 horas do grupo 1, mostrando níveis acima de 1500 UI/l e significância estatística no sub-grupo 24 horas ( $p < 0,05$ ). Os resultados obtidos nas amostras de 48 e 168 horas são decrescentes. É possível afirmar, com base nos resultados encontrados, que as concentrações séricas da fosfatase alcalina aumentam nas primeiras 24 horas após trauma e principalmente ligadura da via biliar extra-hepática, e têm comportamento decrescente nos sub-grupos 48 e 168 horas dos animais submetidos a bloqueio do fluxo biliar.

Picinato<sup>13</sup> *et al.*, (1992) estudando comparativamente animais submetidos a ligadura do ducto biliar principal ( $n = 60$ ) com operação simulada, observaram que as concentrações séricas da gamaglutamil transferase aumentam significativamente nas primeiras 24 horas pós ligadura e diminuem nos tempos seguintes (48 e 168 horas). Castro e Sousa Jr.<sup>14</sup> *et al.*, (1993) avaliaram a sensibilidade da gamaglutamil transferase como indicador da colestase extra-hepática em ratos, induzida por ligadura do ducto biliar, e encontraram concentrações séricas de  $8 \pm 5$ ;  $24 \pm 10$  e  $24 \pm 9$  (UI/l).

Neste trabalho, as concentrações séricas da gamaglutamil transferase dos animais estudados não apresentam diferenças estatísticas significantes entre os dois grupos de animais estudados (ligadura / operação simulada), o que demonstra não ser a GGT um marcador específico da colestase.

Kouturas<sup>6</sup> *et al.* (1984), trabalhando com ratos submetidos à obstrução biliar demonstraram a existência de inflamação dos espaços-porta e hiperplasia ductal, 5, 10, 15 e 30 dias após a operação. Ramm<sup>15</sup> *et al.* (2000), utilizando modelo reversível de icterícia obstrutiva, estudaram as alterações histopatológicas do parênquima hepático e observaram que a colestase produziu hiperplasia dos ductos biliares.

Os autores citados demonstraram que a obstrução biliar extra-hepática por ligadura do ducto biliar principal, em ratos, induziu alterações na morfologia hepática. Esses achados também foram identificados no presente estudo: hiperplasia ductal de leve a acentuada, pericolangite discreta e colangite discreta (Tabela 1). A hiperplasia ductal foi diagnosticada nos sub-grupos 48 (moderada) e 168 (acentuada) horas do grupo 2. A pericolangite foi identificada em todos os tempos do grupo 2 (discreta) e no sub-grupo 12 horas do grupo 1 (discreta) e a colangite no sub-grupos 12 e 128 horas do grupo 2 (discreta).

## CONCLUSÕES

1. As concentrações séricas das bilirrubinas, proteína C reativa e fosfatase alcalina aumentam nos animais submetidos à ligadura do ducto biliar principal.

2. Hiperplasia ductal, pericolangite e colangite são as principais alterações histológicas encontradas nos fígados dos ratos submetidos à ligadura do ducto biliar principal.

## REFERÊNCIAS

1. Bismuth H, Lazorthes F. Operative injuries of the common biliary duct. *J Chir* 1981; 118 (10): 601-9.
2. Boyer T D. Cirrose hepática e suas principais seqüelas. In: Wingaarden JB, Smith Jr LH, Mennet JC. Tratado de medicina interna. 19ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara-Koogan; 1993. p 804-13.
3. Frank BB. Clinical evaluation of jaundice: a guideline of the patient care committee of the American Gastroenterological Association. *J Am Med Assoc* 1989; 262: 3031-4.
4. Bodily KO, Fitz JG. Approach to the patient with suspected liver disease. In: Grendel JH, McQuaid KR, Friedman S L. Current diagnosis and treatment in gastroenterology. New York: Lange Medical Book; 1995. p 461-74.
5. Corlette MB, Mendes-Monteroi AC, Bismuth AC, Morin J. Transient bile duct obstruction: response of serum bilirubin and alkaline phosphatase levels in the rat. *Arch Surg* 1976; 111 (9): 1017-20.
6. Kounturas J, Billing BH, Scjheuer PJ. Prolonged bile duct obstruction: a new experimental model for cirrhosis in the rat. *Br J Exp Pathol* 1984; 65:305-11.
7. Malet PF, Soloway RD. Doença da vesícula e dos ductos biliares. In: Windaarden JB, Smith Jr LH, Mennet JC. Tratado de medicina interna. 19ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara-Koogan; 1993. p 822-35.
8. Gouma DJ, Roughneen PT, Kumar S, Moody FG, Rowlands BJ. Changes in nutritional status associated with obstructive jaundice and biliary drainage in rats. *Am J Clin Nutr* 1986; 44 (3): 362-9.
9. Krahenbuhl S, Marti U, Grant I, Garlick PJ, Ballmer PE. Characterization of mechanism causing by hypoalbuminemia in rats with long-term bile duct ligation. *J Hepatol* 1995; 23 (1): 79-86.
10. Hirazawa K, Oka Y, Myiahara M, Hazama S, Suzuki T. New technique for inducing reversible obstructive jaundice in the rat. *Eur Surg Res* 1997; 29:195-201.
11. Pepys MB. C-reactive protein fifty years. *Lancet* 1981; 1(8221): 653-7.
12. Kimura F, Miyazaaki M, Suwa T, Hayashida K, Ito H, Kaiho T. Hepatic protein synthesis and cytokines in obstructive jaundice. *Nippon Shokakibyo Gakkai Zasshi* 1992; 89 (11): 2673-81.
13. Picinato MANC, Castro e Silva Jr O, Oliveira W, Souza MEJ, Franco CFF, Ceneviva R. Níveis séricos de gama-glutamil transpeptidase e fosfatase alcalina na obstrução biliar extra-hepática em ratos. *Medicina* 1992; 25:320-3.
14. Castro e Silva Jr O, Coelho AFB, Souza MEJ, Picinato MANC, Franco CFF, Vanni JC, Ceneviva R. Sensibilidade da fosfatase alcalina e gama-glutamil transferase como marcador da obstrução biliar extra-hepática em ratos. *Medicina* 1993; 26: 41-4.
15. Ramm GA, Carr SC, Bridle KR, Li L, Britton RS, Crawford DH, Vogler CA, Bacon BR, Tracy TF. Morphology of liver repair following cholestasis liver injury: resolution of ductal hyperplasia, matrix deposition and regression of myofibroblasts. *Liver* 2000; 20 (5):387-96.

Maia ELC, Guimarães SB, Maia ACS, Maia JS, Vasconcelos PRL. Temporal effects of common bile duct ligation in Wistar rats. *Acta Cir Bras* [serial online] 2003 Jan-Feb;18(1). Available from URL: <http://www.scielo.br/acb>.

**ABSTRACT – Purpose:** An experimental study has been conducted to investigate the effects of common bile duct obstruction in rats. **Methods:** Forty-eight male Wistar rats were distributed into two groups: Group 1 (Control) and Group 2 (Experiment). Each group was divided into 4 subgroups (n=6). Group 1 animals were submitted to laparotomy, dissection and passage of double sutures around common bile duct without ligature. Group 2 rats were submitted to ligation of main bile duct, following previous laparotomy. Blood and liver samples were collected 12, 24, 48 and 168 hours later. **Results:** Serum bilirubin concentrations (total, direct and indirect) were significantly increased ( $p < 0.05$ ) in 24, 48 and 168 hours subgroups (Group 2 rats) when compared to Group 1 (control) animals. C reactive protein concentrations were significantly increased ( $p < 0,05$ ) in experiment in subgroup 24 hours. Albumin and gamaglutamil transferase concentrations were similar in both groups. Histological examination of liver disclosed duct hiperplasia, pericholangitis and pericholangitis. **Conclusions:** Common bile duct ligation, in Wistar rats, leads to increased serum concentrations of bilirubin, C reactive protein and alkaline phosphatase. Ductal hyperplasia, cholangitis and pericholangitis are the main histological findings in rats subjected to common bile duct ligation.

**KEY WORDS** - Bile duct obstruction, extrahepatic. Cholestasis. Models, animal. Rats.

*Correspondência:*

Eugenio Lincoln Campos Maia  
Departamento de Cirurgia – Rua Prof. Costa Mendes, 1608/ 3º andar  
60430-140 Fortaleza - Ceará  
Tel: (85)288-8063 – Fax: (85)288-8064  
[eugenioamaia@secrel.com.br](mailto:eugenioamaia@secrel.com.br)

Conflito de interesse: nenhum  
Fonte de financiamento: nenhuma

Data do recebimento: 21/09/2002  
Data da revisão: 08/10/2002  
Data da aprovação: 01/11/2002