

Influência do cólon na regeneração do fígado de ratos submetidos à hepatectomia e colectomia

Influence of the colon in liver regeneration of rats submitted to hepatectomy and colectomy

MARÍLIA CARVALHO MOREIRA¹; ÍTALO MEDEIROS AZEVEDO¹; CLÁUDIA NUNES OLIVEIRA¹; ALDO DA CUNHA MEDEIROS, ECBC-RN¹.

R E S U M O

Objetivo: avaliar se a colectomia, associada à hepatectomia 70%, influencia a regeneração do fígado em ratos. **Métodos:** foram utilizados 18 ratos Wistar distribuídos em três grupos de seis animais cada. No grupo I (sham) foi realizada laparotomia; no grupo II colectomia + hepatectomia 70%; no grupo III apenas hepatectomia 70%. No sexto dia pós-operatório foi colhido sangue por punção cardíaca, sob anestesia, seguido de eutanásia. Foram realizadas dosagens séricas de aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), albumina e fosfatase alcalina (FA), fator de crescimento de hepatócitos (HGF) e fator de crescimento transformador- α (TGF- α). A regeneração do fígado foi calculada pela fórmula: razão peso do fígado por 100g do peso corporal no momento da eutanásia/peso do fígado no pré-operatório projetado por 100g de peso corporal $\times 100$. **Resultados:** Os níveis de ALT e AST foram significativamente menores no grupo II quando comparados com o grupo III ($p < 0,001$). A albuminemia mostrou níveis significativamente mais elevados no grupo II. Os níveis de HGF e TGF- α no grupo II foram significativamente mais elevados que no grupo III. O percentual de regeneração hepática foi significativamente mais elevado no grupo II do que no grupo III. **Conclusão:** o estudo demonstrou que a colectomia realizada simultaneamente à hepatectomia 70% influenciou positivamente na regeneração do fígado em ratos. Pesquisas adicionais são necessárias para revelar os mecanismos moleculares deste efeito e para caracterizar a influência do cólon na fisiologia do fígado.

Descritores: Regeneração Hepática. Colectomia. Hepatectomia. Ratos.

INTRODUÇÃO

O fígado é um dos órgãos mais complexos do corpo humano. Sua massa é mensurada em uma proporção com o peso corporal dos indivíduos¹, e esta razão é restaurada após uma ressecção hepática². Metade de todos os pacientes com câncer colorretal desenvolve metástases hepáticas no decurso dessa doença³. Pacientes com metástases podem se beneficiar com a ressecção hepática, pois proporciona uma oportunidade para a cura⁴, sendo a segmentectomia isolada e a lobectomia as intervenções cirúrgicas mais comuns. Os resultados têm sido relativamente bons, desde que a margem de segurança da ressecção e a reserva funcional hepática sejam adequadas⁵. Tem sido relatado que a sobrevivência em longo prazo após ressecção hepática para metástases colorretais tem melhorado significativamente nos últimos anos⁶. Estes fatos justificam o estudo da regeneração hepática na vigência de colectomia simultânea, pela alta incidência da doença colorretal com metástases e pela frequência com que essas operações são realizadas no mesmo tempo operatório.

A regeneração do fígado tem sido objeto de es-

tudos ao longo dos anos. Todavia os mecanismos pelos quais o órgão é estimulado à replicação e a relação entre as células e citocinas ainda não foram totalmente elucidados. Fatores nutricionais e outros têm sido avaliados, todos demonstrando alguma influência no processo de regeneração⁷⁻⁹. Novos conhecimentos têm surgido sobre a regeneração hepática, dando ênfase à atuação de fatores de crescimento e outras citocinas^{10,11}. Em modelos animais, os mecanismos de regeneração hepática têm sido investigados em detalhes. Os hepatócitos expressam precocemente o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e a interleucina-6 (IL-6), produzidos principalmente pelas células de Kupffer, e a proliferação e o crescimento de hepatócitos são induzidos principalmente em resposta ao fator de crescimento transformador- α (TGF- α) e ao fator de crescimento hepatócitos (HGF), entre outros¹⁰.

Um dos primeiros estudos a investigar a participação do cólon na regeneração hepática analisou o efeito da ileocolectomia associada a hepatectomia a 50% na resposta regenerativa, onde foram avaliadas a atividade de timidina-quinase e as figuras de mitose, como marcadores de regeneração. Este procedimento cirúrgico gerou

1 - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Natal, RN, Brasil.

uma resposta regenerativa significativamente maior do que somente a hepatectomia ou após hepatectomia com ressecção do íleo, quando foram comparados entre si¹². Moser *et al.*¹³, em 2006, estudaram a participação de fatores genéticos na regeneração hepática após colectomia. Entretanto, estudo de Hachiya *et al.*¹⁴, em 2008, concluiu pela redução no processo de regeneração hepática após ressecção sincrônica do fígado e cólon em ratos.

Diante da controvérsia, procuramos contribuir com o tema. O objetivo do presente estudo foi examinar a influência da ressecção extensa do cólon na função e regeneração do fígado em modelo experimental em ratos.

MÉTODOS

O Comitê institucional de Ética no Uso de Animais aprovou o projeto de pesquisa sob protocolo no 054-10. O cuidado com o uso dos animais seguiu os padrões da legislação brasileira para o uso científico de animais (Lei 11.794/2008, CONCEA).

Foram utilizados 18 ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) machos, adultos com peso de 294 ± 13 g, fornecidos pelo biotério do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN). Os animais foram mantidos em gaiolas individuais de polipropileno com ciclos de 12 horas claro-escuro, umidade e temperatura controladas, com acesso "ad libitum" à água e ração para roedores. Por sete dias, que antecederam ao experimento, permaneceram no laboratório para aclimação. Um dia antes das intervenções cirúrgicas ingeriram apenas água, sendo então divididos aleatoriamente em três grupos com seis ratos cada: no grupo I (sham) foi realizada laparotomia; no grupo II colectomia + hepatectomia 70%; no grupo III apenas hepatectomia 70%. Todos os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de cetamina (70mg/kg) e xilazina (10mg/kg), e operados com técnica asséptica após tricotomia da parede abdominal e antissepsia com álcool etílico 70%.

Os animais do grupo II, hepatectomia a 70% + colectomia, foram submetidos à laparotomia mediana, através da qual se realizou a ressecção de todo o ceco e 5cm do cólon proximal, procedendo-se à anastomose término-terminal íleo-cólica, em plano único, com fio de polipropileno 6-0, com pontos simples separados, com auxílio

de microscópio cirúrgico DFV (São Paulo, Brasil), aumento 10x. Concomitantemente, foram ressecados os lobos esquerdo e mediano do fígado (hepatectomia 70%). No grupo III, hepatectomia, os animais foram submetidos à ressecção dos lobos esquerdo e mediano do fígado (hepatectomia 70%). No grupo sham, procedeu-se à laparotomia mediana e leve manipulação do ceco e fígado nas mesmas condições de anestesia e antissepsia. Após conferida a hemostasia em todos os animais, a incisão abdominal foi suturada em dois planos com fio de nylon 4-0. Terminadas as intervenções cirúrgicas, o controle da dor pós-operatória foi feito com meperidina intramuscular na dose de 10mg/Kg, uma vez ao dia, nos três primeiros dias. Os animais permaneceram em observação por seis dias, durante os quais foram observados os parâmetros de perda de peso através da pesagem em balança digital, com sensibilidade para variação a partir de um grama.

Os animais receberam apenas água nas primeiras 24 horas do pós-operatório, seguido de dieta sólida até a eutanásia e, no período de observação, foram mantidos em sala de controle pós-operatório. No sexto dia pós-operatório os animais foram pesados e anestesiados com a mesma técnica antes descrita, e colhidas amostras de 5ml de sangue, por punção cardíaca, para realização de exames laboratoriais, e submetidos à eutanásia com superdose de anestésico (thiopental sódico 100mg/Kg intraperitoneal). O fígado remanescente (lobo direito) foi ressecado, lavado com solução salina 0,9% e pesado em balança de precisão. No grupo sham o fígado completo foi pesado.

Dosagens séricas

O soro de sangue total colhido dos animais no sexto dia pós-operatório foi processado por centrifugação a 3000rpm por dez minutos, e estocado a -40°C até dosagem. Foram dosados os níveis séricos de aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), albumina e fosfatase alcalina (FA) em todos os animais com kits Wiener, Autoanalisador Konelab, Finland. O método ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) foi usado para dosagem do fator de crescimento de hepatócitos (HGF) e do fator de crescimento transformador- α (TGF- α) utilizando Kits ABCAM, (Massachusetts, USA) e leitora de microplacas (BioTek, Vermont USA).

Cálculo da regeneração hepática

Inicialmente foi calculada a razão massa hepática/massa corporal dos animais do grupo sham (RMHMC). Após o período de observação os ratos foram pesados (B) em balança de precisão, o fígado foi totalmente removido e igualmente pesado (A). Os dados adquiridos foram expressos como porcentagem da razão de A para B, multiplicada por 100, calculada pela fórmula: $RMHMC = (Massa\ hepática / Massa\ corporal) \times 100$.

Essa razão estabeleceu o percentual que o fígado representa sobre a massa corporal de cada animal. As alterações na RMHMC dos animais dos grupos estudados foram avaliadas como grau de regeneração hepática. A Regeneração hepática (RH) foi definida como: $RH = ([RMHMC_{euta} - RHMC_{pós}] / RHMC_{pós}) \times 100$. Onde: RH é Percentual de regeneração hepática; $RMHMC_{euta}$ é Razão de Massa Hepática com relação à Massa Corporal na eutanásia (após período de observação); $RMHMC_{pós}$ é Razão de Massa Hepática com relação à Massa Corporal no pós-operatório imediato (logo após a hepatectomia).

Análise estatística

O teste ANOVA seguido do teste de Tukey foi usado para comparar os parâmetros de dosagens laboratoriais entre os grupos. Para avaliar a diferença entre

as médias da regeneração hepática entre os grupos, utilizou-se o teste t de Student. Para todos os testes adotou-se o nível de significância de 5%, utilizando o pacote estatístico SPSS®21.

RESULTADOS

Todos os animais sobreviveram aos experimentos e não houve diferença significativa na evolução de seus pesos corporais, comparando os grupos. As dosagens bioquímicas demonstraram, no sexto dia pós-operatório, níveis significativamente mais elevados de ALT nos animais submetidos a hepatectomia 70% + colectomia quando comparado com o grupo sham ($p < 0,01$). Entretanto, os níveis de ALT, AST e FA no grupo de animais submetidos apenas à hepatectomia 70% mostraram-se significativamente mais elevados do que no grupo hepatectomia 70% + colectomia ($p < 0,01$). A albuminemia mostrou-se significativamente maior nos ratos dos grupos sham e hepatectomia 70% + colectomia do que no grupo hepatectomia ($p < 0,01$). Não houve diferença significativa entre os níveis de albuminemia dos grupos sham e hepatectomia 70% + colectomia ($p > 0,05$). Os valores dos dados bioquímicos estão resumidos na tabela 1.

Tabela 1. Valores de dados bioquímicos e respectiva interpretação estatística.

	Sham	Hepatectomia 70% + colectomia	Hepatectomia 70%
ALT(ui/l)	46,6±3,01 ^a	128,7±5,1 ^a	208,4±19,3 ^a
AST (ui/l)	50,05±2,17 ^a	49,1±2,04 ^b	69,7±2,7 ^{ab}
F A (ui/l)	154,6±15,3 ^a	161,5±6,1 ^b	211,6±13,7 ^{ab}
Albumina (g/l)	4,6±0,4 ^a	4,1±0,2 ^b	3,4±0,3 ^{ab}

Teste de Tukey: Valores de média±dp seguidos de mesma letra têm diferenças estatisticamente significantes com $p < 0,01$. AST, Aspartato aminotransferase; ALT, Alanina aminotransferase; FA, Fosfatase alcalina.

Observa-se na tabela 2 que os valores das dosagens do HGF e do TGF- α dos animais do grupo submetido a hepatectomia 70% + colectomia foram significativamente maiores do que nos ratos dos grupos sham e hepatectomia 70% ($p < 0,01$).

O cálculo do percentual de regeneração hepática revelou que nos animais do grupo hepatectomia 70% + colectomia ocorreu regeneração significativamente maior do que nos animais submetidos a hepatectomia isolada ($p = 0,003$). Os dados estão resumidos na tabela 3.

Tabela 2. Valores de dados dos fatores de crescimento e respectiva interpretação estatística.

	Sham	Hepatectomia 70% + colectomia	Hepatectomia 70%
HGF (Fator de crescimento de hepatócitos) pg/ml	282,8±13,3 ^a	408±18,2 ^a	360±58,6 ^a
TGF- α (Fator de crescimento transformador- α) ng/ml	0,93±0,1 ^a	3,8±0,3 ^a	2,3±0,4 ^a

Teste de Tukey: Valores de média \pm dp seguidos de mesma letra têm diferenças estatisticamente significantes com $p < 0,01$.

Tabela 3. Dados descritivos e teste inferencial da regeneração hepática.

	Grupos		p-valor
	Hepatectomia 70%	Hepatectomia 70%+colectomia	
Regeneração (%)	18,8±8,90	52,7±16,32	0,003

Média \pm desvio padrão (teste t de Student).

DISCUSSÃO

A regeneração hepática é um tema muito complexo e que desperta grande interesse devido à forma como acontece, através interações celulares, mecanismos humorais, moleculares e influência de órgãos do sistema porta, que ainda não foram integralmente elucidados. Em estudo anterior, demonstramos que o íleo atua positivamente nos parâmetros de regeneração hepática em ratos¹⁵.

O presente estudo mostrou que os animais submetidos a hepatectomia 70% simultânea a uma ressecção do ceco e parte do cólon tiveram regeneração hepática significativamente melhor durante o período de observação do que os animais submetidos à hepatectomia 70% isolada. A ressecção hepática 70% simultânea à colectomia não aumentou o risco de complicações pós-operatórias e todos os ratos sobreviveram até o final dos experimentos. Nossos resultados sugerem que a ressecção simultânea do cólon e do fígado contribuiu para melhorar os parâmetros de regeneração hepática avaliada no sexto dia pós-operatório e, ao mesmo tempo, as provas de lesão e função hepática tiveram níveis mais favoráveis do que nos animais com hepatectomia isolada. Hachiya *et al.*¹⁴ realizaram uma ileocolectomia simultaneamente à hepatectomia em ratos e concluíram que houve redução na regeneração e comprometimento na função das células endoteliais no fígado remanescente.

Uma crítica que pode ser feita ao seu modelo, é que foi acrescentada ressecção de íleo aos animais. Sabidamente, o íleo é essencial ao processo de regeneração hepática¹⁵. Estudo em ratos submetidos à hepatectomia e ressecção simultânea de segmento de apenas 1cm do cólon concluiu que houve maior grau de regeneração hepática do que nos animais submetidos a hepatectomia isolada¹⁶. Percebe-se que o tema é controverso, os estudos são escassos na literatura e a metodologia muito variada.

Analizamos indiretamente o grau de comprometimento hepático devido à injúria provocada pelas intervenções no fígado e no cólon, através dos marcadores ALT, AST, FA e albumina. Tratando-se de uma enzima citoplasmática e mitocondrial, a AST é encontrada em muitos órgãos além do fígado, incluindo coração, músculo esquelético, rins e tecidos cerebrais. Entretanto, a ALT é citoplasmática, principalmente encontrada no fígado e mais específica do que a AST¹⁷. As transaminases séricas são sensíveis na demonstração de danos aos hepatócitos e independente de fatores etiológicos, seus valores permanecem em níveis elevados enquanto as lesões hepáticas persistem¹⁷. Na tabela 1 observa-se que os níveis de ALT foram mais elevados no grupo hepatectomia + colectomia em relação ao sham, e esse nível sérico foi significativamente menor do que no grupo hepatectomia isolada. No que diz respeito à AST, FA e albumina, seus níveis séricos não tiveram diferença significativa comparando os grupos hepatectomia + colectomia e sham.

Esses dados são relevantes, pois podem significar que a ausência do cólon deve ter exercido um efeito protetor hepático e influenciou positivamente na regeneração do fígado.

Para o cálculo do percentual de regeneração hepática optou-se por comparar apenas os dois grupos com hepatectomia, pois no grupo sham não houve intervenção no fígado e a regeneração hepática foi considerada nula.

Existem muitos fatores de crescimento produzidos pelos hepatócitos durante a regeneração¹⁸. O TGF- α tem demonstrado ser mitogênico para os hepatócitos em culturas, sendo mais ativo que outros fatores de crescimento, que são mitogênicos para vários tipos de células não parenquimatosas, especialmente as células endoteliais. Camundongos deficientes em TGF- α têm

uma resposta normal em termos de regeneração hepática após hepatectomia¹⁹. É bem conhecido que o HGF é um potente fator de proliferação de hepatócitos¹⁰. No presente estudo, a associação da colectomia com a hepatectomia teve uma relação positiva com os níveis séricos de HGF e TGF- α no sexto dia pós-operatório, coincidindo com maior percentual de regeneração hepática do que no grupo de animais submetidos à hepatectomia isolada. Esses achados são consistentes com resultados de outros autores²⁰.

Nosso estudo demonstrou que a colectomia influenciou positivamente na regeneração do fígado após hepatectomia 70% em ratos. Pesquisas adicionais são necessárias para revelar os mecanismos moleculares deste efeito e para caracterizar a influência do cólon em outros parâmetros da fisiologia do fígado.

ABSTRACT

Objective: to evaluate whether colectomy, associated with 70% hepatectomy, influences liver regeneration in rats. **Methods:** we distributed 18 Wistar rats in three groups of six animals each. In group I (sham), we performed laparotomy; In group II, colectomy + 70% hepatectomy; In group III, only 70% hepatectomy. On the 6th postoperative day, we collected blood by cardiac puncture under anesthesia, followed by euthanasia. We performed serum dosages of aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), albumin and alkaline phosphatase (AF), hepatocyte growth factor (HGF) and transforming growth factor- α (TGF- α). We calculated liver regeneration by the formula: liver weight ratio per 100g body weight at the time of euthanasia / liver weight preoperatively projected for 100g body weight \times 100. **Results:** ALT and AST levels were significantly lower in group II when compared with group III ($p < 0.001$). Albuminemia showed significantly higher levels in group II. Levels of HGF and TGF- α in group II were significantly higher than in group III. The percentage of hepatic regeneration was significantly higher in group II than in group III. **Conclusion:** Colectomy performed simultaneously with 70% hepatectomy had a positive influence on liver regeneration in rats. Further research is needed to reveal the molecular mechanisms of this effect and to characterize the colon influence in liver physiology.

Keywords: Liver Regeneration. Colectomy. Hepatectomy. Rats.

REFERÊNCIAS

1. Tarlós MR, Ramalho FS, Ramalho LN, Castro-e-Silva T, Brandão DF, Ferreira J, et al. Cellular aspects of liver regeneration. *Acta Cir Bras.* 2006;21(Suppl. 1):63-6.
2. Fausto N. Liver regeneration. *J Hepatol.* 2000;32(Suppl. 1):19-31.
3. Faivre J, Manfredi S, Bouvier AM. [Epidemiology of colorectal cancer liver metastases]. *Bull Acad Natl Med.* 2003;187(5):815-22. French.
4. Wicherts DA, Miller R, de Haas RJ, Bitsakou G, Vibert E, Veilhan LA, et al. Long-term results of two-stage hepatectomy for irresectable colorectal cancer liver metastases. *Ann Surg.* 2008;248(6):994-1005.
5. Inoue Y, Hayashi M, Komeda K, Masubuchi S, Yamamoto M, Yamana H, et al. Resection margin with anatomic or nonanatomic hepatectomy for liver metastasis from colorectal cancer. *J Gastrointest Surg.* 2012;16(6):1171-80.
6. Tomlinson JS, Jarnagin WR, DeMatteo RP, Fong Y, Kornprat P, Gonen M, et al. Actual 10-year survival after resection of colorectal liver metastases defines cure. *J Clin Oncol.* 2007;25(29):4575-80.
7. Silva RM, Malafaia O, Torres OJ, Czczko NG, Marinho Jr CH, Kozłowski RK. Evaluation of liver regeneration diet supplemented with omega-3 fatty acids: experimental study in rats. *Rev Col Bras Cir.* 2015;42(6):393-7.
8. Toderke EL, Baretta GAP, Gama Filho OP, Matias

- JEF. Sirolimus influence on hepatectomy-induced liver regeneration in rats. *Rev Col Bras Cir.* 2014;41(3):203-7.
9. Salomão LS, Young SB, Galhardo MA, Pereira LA, Pires AR, Boaventura GT, et al. Evaluation of liver regeneration by modulation with ischemic preconditioning after ischemia and reperfusion and partial hepatectomy. *Rev Col Bras Cir.* 2012;39(3):211-5.
 10. Fausto N, Campbell JS, Riehle KJ. Liver regeneration. *Hepatology.* 2006;43(2 Suppl 1):S45-53.
 11. Jesus RP, Waitzberg DL, Campos FG. Regeneração hepática: papel dos fatores de crescimento e nutrientes. *Rev Assoc Med Bras.* 2000;46(3):242-54.
 12. Kahn D, Von Sömmogy S, Hickman R, Terblanche J. Ileocolectomy enhances the regenerative response after partial hepatectomy in the pig. *S Afr J Surg.* 1990;28(1):11-3.
 13. Moser MJ, Gong Y, Zhang MN, Lipschitz J, Cohen A, Minuk GY. The effects of colectomy on immediate-early proto-oncogene expression and hepatic regeneration in the rat. *Dig Dis Sci.* 2006;51(7):1179-82.
 14. Hachiya Y, Chijiwa K, Noshiro H, Tanaka M. Impaired liver regeneration after synchronous liver and colon resection in rats. *Hepatogastroenterology.* 2008;55(82-83):641-6.
 15. Medeiros AC, Azevedo AC, Oséas JM, Gomes MD, Oliveira FG, Rocha KB, et al. The ileum positively regulates hepatic regeneration in rats. *Acta Cir Bras.* 2014;29(2):93-8.
 16. Sasanuma H, Mortensen FV, Knudsen AR, Funch-Jensen P, Okada M, Nagai H, et al. Increased liver regeneration rate and decreased liver function after synchronous liver and colon resection in rats. *Ann Surg Innov Res.* 2009;3(1):1-7.
 17. McGill MR. The past and present of serum aminotransferases and the future of liver injury biomarkers. *EXCLI J.* 2016;15(6):817-28.
 18. Matsumoto K, Miyake Y, Umeda Y, Matsushita H, Matsuda H, Takaki A, et al. Serial changes of serum growth factor levels and liver regeneration after partial hepatectomy in healthy humans. *Int J Mol Sci.* 2013;14(10):20877-89.
 19. Russell WE, Kaufmann WK, Sitaric S, Luetkeke NC, Lee DC. Liver regeneration and hepatocarcinogenesis in transforming growth factor-alpha-targeted mice. *Mol Carcinog.* 1996;15(3):183-9.
 20. Efimova EA, Glanemann M, Nussler AK, Schumacher G, Settmacher U, Jonas S, et al. Changes in serum levels of growth factors in healthy individuals after living related liver donation. *Transplant Proc.* 2005;37(2):1074-5.

Recebido em: 24/04/2017

Aceito para publicação em: 01/06/2017

Conflito de interesse: nenhum.

Fonte de financiamento: Conselho Nacional de desenvolvimento Científico e Tecnológico Protocolo nº 4449083/2014-4.

Endereço para correspondência:

Marília Carvalho Moreira

E-mail: mariliarn@gmail.com / cirurgex.ufrn@gmail.com