

Estudos sobre a regeneração do fígado—Variação do volume nuclear das células hepáticas em repouso divisional (*)

pelos

Drs. Fernando Ubatuba e Jorge Costa de Moraes

(Com 2 figuras no texto)

O crescimento acentuadamente rápido do tecido remanescente, após excisão parcial do parenquima hepático é um dos exemplos mais característicos da capacidade regenerativa dos tecidos adultos, diferenciados. Após ablação de 2/3 do órgão, o crescimento do tecido remanescente se dá em ritmo elevado, que ultrapassa mesmo o observado para os tumores malignos (BASHFORD 1911), só sendo comparável, ao crescimento dos tecidos cultivados artificialmente "in vitro" ou ao dos embriões de galinha de 8 a 10 dias (MURRAY, 1926). Os aspectos particulares desse crescimento do fígado em restauração foram bem analisados experimentalmente por diferentes autores (FISHBACK, 1929; HIGGINS & ANDERSON, 1931; BRUES e col. 1936).

À hipertrofia observada nas primeiras horas da regeneração segue-se uma fase de hiperplasia caracterizada por intensa atividade mitótica do tecido residual; é de notar-se porém, a ausência de sinais de dediferenciação, de modo que o processo de regeneração não desajusta a estrutura típica do órgão e das porções néo-formadas. Contrariamente ao que se dá no desenvolvimento em bionário, as células dos canalículos biliares contribuem escassamente para o aumento do número de células hepáticas; o aumento celular se dá quase que exclusivamente às expensas de sucessivas divisões mitóticas da própria célula hepática fundamental.

Se bem que ainda não se conheçam os fatores determinantes dos processos de regeneração tissular em geral, no caso particular do fígado as características de plurivalência funcional da célula hepática dificultam sobremodo

(*) Trabalho da Secção de Endocrinologia.

a análise do processo. É bem possível que fatores ligados à própria célula hepática entrem em causa, se bem que o desencadeamento do processo possa ser considerado como devido a fatores estimulantes extrínsecos ao órgão e que seus efeitos em condições normais sejam contrabalançados pela atividade celular; pode admitir-se a existência de um equilíbrio dinâmico, capaz de ser rompido biunivocamente pelas modificações tanto da atividade celular quanto por fator estimulante extrahepático. Encarando-se a regeneração por este aspecto seria necessário estabelecer previamente um critério de análise que nos permitisse verificar a influência de diferentes condições experimentais sobre a marcha do processo de recomposição. Dentre os diferentes caracteres passíveis de serem utilizados nessas condições, pareceu-nos que um critério morfológico deva ser suficiente, uma vez que durante a regeneração as modificações celulares são bem típicas, especialmente as modificações nucleares.

No caso particular do fígado a relação nucleo-plasmática perde parte da sua significação, tratando-se de células com elevado conteúdo de reservas (glicogênio e lípidos) o que não nos permite uma avaliação segura do verdadeiro conteúdo citoplasmático da célula. Se bem que o volume nuclear possa também sofrer variações de idêntica natureza, parece-nos que essas variações não dependem de fatores de reserva nuclear, provavelmente muito escassos nos núcleos. Todavia, para a utilização das variações do volume nuclear como critério para se acompanhar o processo de restauração, é necessário levar-se em conta a variação de volume nuclear que existe no órgão normal, a qual se estende numa extensa gama de valores.

Apresentamos neste trabalho uma análise da variação dos volumes nucleares das células hepáticas mono e binucleadas durante as fases críticas do processo regenerativo do fígado de ratos parcialmente hepatectomizados.

MATERIAL E METODOS

Foram utilizados ratos albinos machos de peso compreendido entre 100 e 250g, num total de 56 animais. A hepatectomia foi praticada segundo técnica previamente descrita (UBATUBA & VIEIRA, 1944).

Os animais foram anestesiados pela avertina na dose de 20 mg/100 g. de peso corporal (intraperitônio). O material retirado para fixação e análise histo-citológica foi obtido sempre do mesmo lobo remanescente do fígado de cada rato, excisando-se do bordo para o interior do lobo. Fragmentos do material foram fixados em Bouin, Helly e Sublimado-alcool (S. A.) 1:1. O S. A. mostrou-se excelente fixador nuclear porém fixando mal o citoplasma. Experimentamos também o fixador de Stieve, rotineiramente utilizado no la-

boratório para testículo de mamíferos; este fixador é superior ao S. A. em relação ao citoplasma e igualmente bom para o núcleo. O material desidratado e incluído em parafina foi cortado a 5-10 μ e corado pela hematoxilina ferrica ou pela fucsina de Feulgen. Para o Feulgen, a hidrólise em HCl N por 4 minutos é suficiente para o material fixado em S. A. ou Stieve. Após hidrólise a 60°C as lâminas foram coradas na fucsina (descorada por adsorção em carvão animal) por 30 a 60 minutos, lavadas em bissulfito e contrastadas em fastgreen F.C.F. por 1 a 2 minutos. As estruturas acromáticas da figura de mitose foram coradas pelas hematoxilina fosfotungstica de Mallory após fixação em Helly. Alguns fragmentos de fígado foram fixados na mistura acetosmio-cromica ou em Regaud e coradas pela técnica de Bensley (complexo hematoxilina-cobre-cromio) para evidenciar os mitocôndrios; se bem que a penetração do fixador de Bensley seja inferior à do Regaud os resultados são suficientemente uniformes e compensam pela rapidez da preparação. Também foram feitas algumas preparações de aparelho reticular de Goldi empregando-se a fixação cádmica e impregnação pela prata segundo Aoyama, que fornecem resultados bem superiores aos obtidos no laboratório com as impregnações osmicas. A análise do comportamento dos mitocôndrios e aparelho de Golgi em fígado em regeneração será feita posteriormente em outro trabalho.

As medidas nucleares foram feitas por desenho dos contornos nucleares em câmara clara a grande aumento e posterior mensuração de dois diâmetros ortogonais. As figuras de mitose foram contadas em campos de obj. 100x, oc. 10X. Para fins de enriquecimento em figuras de mitose os animais foram injetados subcutaneamente com 0.25 mg de solução recente de colchicina por 100g. de animal, 9 a 10 horas antes de sacrifício. As soluções de colchicina se conservam bem até 2 semanas na geladeira; a atividade das soluções foi sempre testada em camundongos, observando-se as ondas de mitoses típicas (em pseudometáfase) nas vilosidades intestinais.

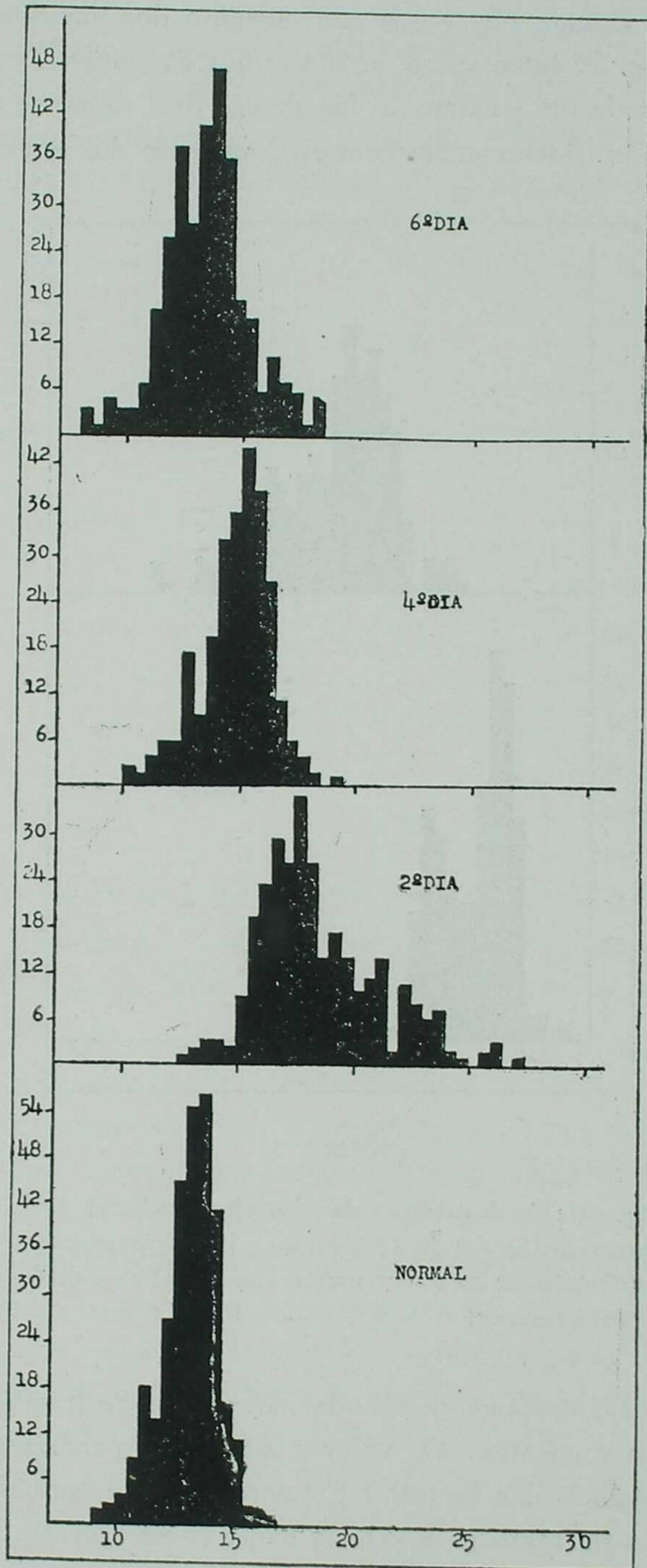
Em alguns casos os animais foram sacrificados com gás de iluminação e feita rapidamente a perfusão do fígado pelas veias suprahepáticas com solução de NaCl a 0.9%.

RESULTADOS

A análise do nosso material revelou a existência de dois períodos perfeitamente diferenciáveis durante a regeneração do fígado após ablação cirúrgica de extensas partes do órgão. Logo nas primeiras horas os lobos remanescentes sofrem rápida hipertrofia que atinge um máximo ao fim de 36-48 horas. Além de um aumento do tamanho celular, provavelmente devido a uma

FIGURA 1

Poligonos de frequência da distribuição dos diâmetros nucleares de 300 células mono-nucleadas do fígado em regeneração, em diferentes dias após a hepatectomia parcial. Observar o deslocamento dos diâmetros para valores mais elevados em relação aos diâmetros normais e a predominância de células de diâmetros maiores nos animais normais.



intensa hidratação celular, observa-se um aumento dos depositos de gordura intracitoplasmaticos. E' interessante assinalar que os volumes nucleares sobem rapidamente atingindo um máximo ao fim de 2-3 dias, como se pode observar nas figs. 1 e 2. Coincidentemente com esse aumento dos volumes nucleares,

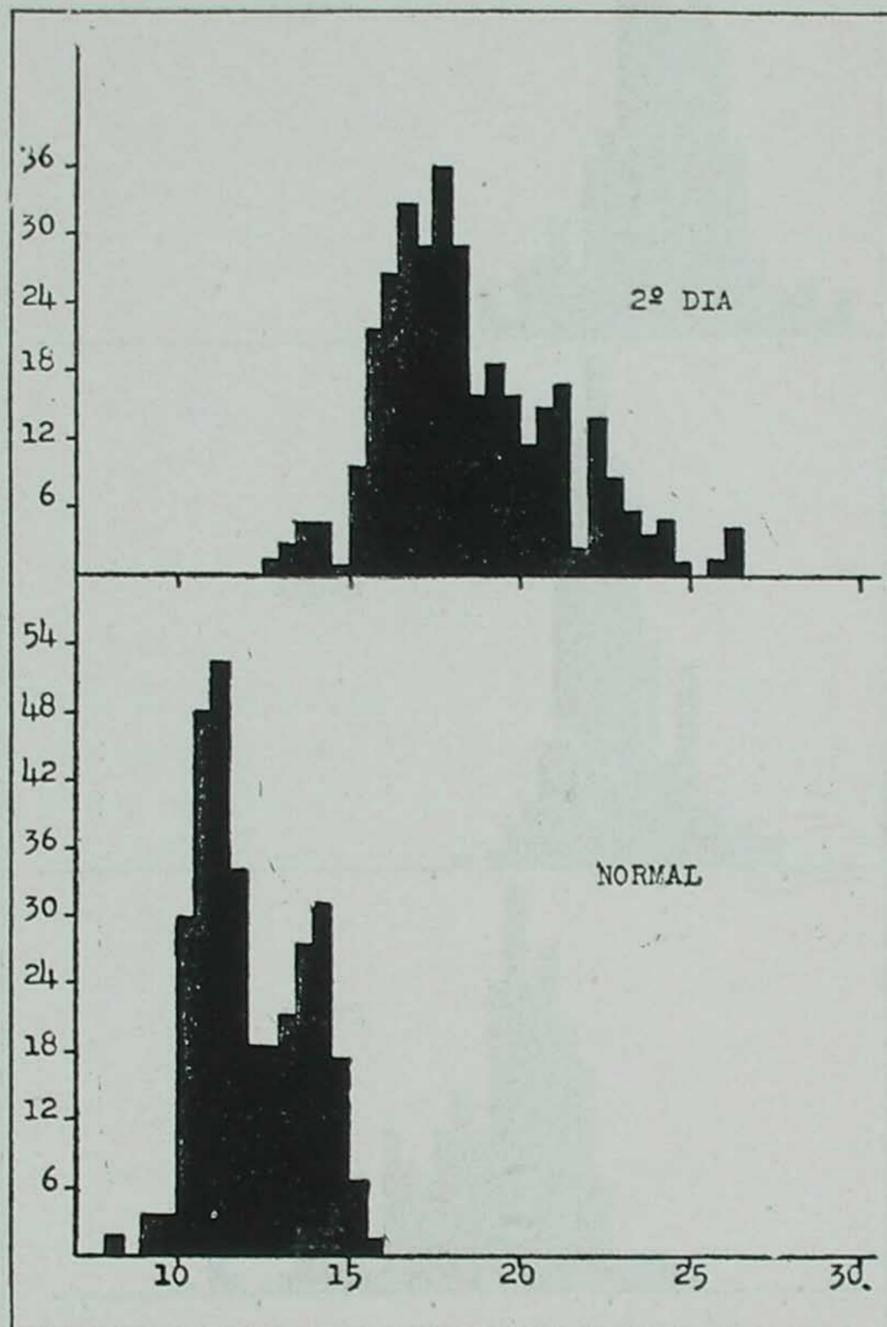


FIGURA 2

Poligonos de frequencia da distribuição dos diametros nucleares de 150 celulas binucleadas do figado em regeneração ao fim do 2.º dia após a hepatectomia parcial. Notar o aspecto bimodal típico da distribuição em animais normais, acentuando-se a predominancia de celulas binucleadas de diametros pequenos.

desaparece o aspecto tipicamente bimodal das curvas de frequência da dispersão dos diametros nucleares. Os valores modais dos volumes nucleares nos poligonos de frequência das figuras 1 e 2 para o figado normal estão em relação 1 : 2, notando-se, tanto para celulas mono como binucleadas a existência

de diâmetros correspondentes às relações de volume 1:2:4:8. Em alguns animais apenas obtivemos medida correspondente à relação 1:16.

Coincidentemente com esta fase de aumento nuclear nota-se um aumento nítido do número de figuras de mitose, bem evidenciado quando se submete os animais ao tratamento pela colchicina (Tabela 1). Aparece um máximo de mitoses ao fim de 48-72 horas. O número absoluto de mitoses passa por

TABELA 1

Incidência de mitoses no fígado de ratos parcialmente hepatectomizados

DIAS DE REGENERAÇÃO	NUMERO DE MITOSES EM 600 CAMPOS	
	Colchicina	Sem colchicina
0.....	13	2
1.....	5	—
2.....	233	33
3.....	60	—
4.....	28	10
6.....	12	—

um máximo ao fim do 5-6 dias, quando a massa de tecido regenerado é apreciável. É de notar-se que os lobulinos néoformados são absolutamente normais.

Devemos assinalar que o número de mitoses por nós encontrado no fígado normal do rato é mais elevado do encontrado por outros autores; achamos 1 mitose para 300 células, enquanto que os dados da literatura apontam 1 mitose para 10 000 ou mesmo 20 000 células. É provável que condições ligadas à alimentação dos animais influam nesse particular.

Nos animais tratados com colchicina não nos foi possível assinalar mitoses anormais, mas encontramos grande número de núcleos anormais, em repouso divisional, formas que lembram processos de gemulação. Para verificação dessas anomalias empregamos sempre os cortes de 5 μ e mesmo de 4 μ para evitar a superposição celular. De particular interesse é o comportamento do material cromático durante a metafase, que será motivo de outra nota a ser publicada.

Se bem não tivéssemos feito a contagem do número de células binucleadas em grande número de animais notamos um aumento sensível do seu número durante a regeneração.

Apesar de analisarmos numerosas lâminas de fígado de ratos em regeneração, tratados ou não com colchicina, não nos foi possível evidenciar mitoses multipolares nem qualquer distribuição peculiar das figuras de mitose ou das células binucleadas em relação à veia centrolobular ou aos canalículos biliares. Esta distribuição ao acaso das mitoses e das células binucleadas resultantes de mitoses incompletas é mais uma indicação que a hiperplasia se processa a custa de divisões sucessivas da célula hepática e não de células dos canalículos, como se dá durante o desenvolvimento embrionário do órgão.

A estreita correlação entre os volumes nucleares dos 2 núcleos das células hepáticas binucleadas ($r = 0.93 \pm 0.007$) ⁽¹⁾ indica claramente que se trata de dois núcleos filhos idênticos, resultados de cariocinese sem citodierese como aventam BEAMS & KING (1942).

O aumento celular durante a fase de regeneração máxima corresponde não só a um aumento do conteúdo de água e de glicogênio na célula (FISHBACK, 1929) como também de lipídeos ou pelo menos de material osmiofílico.

É interessante assinalar, o deslocamento "pendular" dos volumes nucleares durante as primeiras fases da regeneração que é justamente em sentido oposto ao observado por SCHREIBER & SCHREIBER & (1941) para os girinos de batráquios, tanto para o fígado como para o pâncreas. Na ausência de outros caracteres citológicos é difícil pensar-se que esse aumento dos volumes nucleares corresponda a um pequeno grau de dediferenciação celular. Também a rapidez com que os volumes voltam ao normal, parece mais indicar que se trata de aumento de material nuclear, provavelmente água, uma vez que nesse processo se devam dar profundas modificações físico-químicas celulares.

RESUMO

Surgical removal of large amounts of hepatic tissue in male albino rats results in a rapid and conspicuous raise in cellular nuclear volumes. Measurements were made exclusively in resting nuclei. This volume variation is

$$1) \quad r = \frac{\sum XY}{n\sigma_X\sigma_Y} \pm E.P.$$

$$E.P. = \frac{1}{\sqrt{n}} r^2 \times 0.6745$$

transitory. Nuclear volumes return to the normal value within 6 days of restoration. The higher values are observed 48 hours after the hepatic removal, indicating probably that this effect is due to hydration of the nuclei, as occurs in the cytoplasm. This hydration could be correlated to the mitotic activity of the remnant tissue since a peak of mitoses parallels the changes in the nuclear volumes.

REFERÊNCIAS

BEAMS, H. W. — R. L. KING

1942. The origin of binucleate and large mononucleate cells in the liver of the rat. *Anat. Rec.* 83 : 281-298.

BASHFORD, E. F.

1911. The behaviour of tumour — cells during propagation. *Sci. Rep. Imp. Cancer Res. Fund* 4 : 131-214.

BRUES, A. M. — D. R. DRURY — M. C. BRUES,

1936. A quantitative study of cell growth in regenerating liver. *Arch. Path.*, 22 : 658-673.

FISHBACK, F. C.

1929. A morphologic study of regeneration of the liver after partial removal. *Arch. Path.*, 7 : 955-977.

HIGGINS, G. M. — R. M. ANDERSON,

1931. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch. Path.*, 12 : 186-202.

MURRAY, H. A.

1926. Physiological ontogeny. Chicken embryos. Weight and growth rate as functions of age. *J. Gen. Physiol.*, 9 : 39-48.

SCHREIBER, G. — M. R. SCHREIBER,

1941. Diminuição rítmica do volume nuclear do fígado e do pâncreas de girinos de anuros. *Bol. Fac. Fil. Cien. Letras, S. Paulo, XXLL Zool.* 5 : 234-264.

UBATUBA, F. — G. D. VIEIRA,

1944. Estudos sobre a bartonelose. I. A bartonelose dos ratos esplenectomizados e a penicilina. *Mem. Instituto Oswaldo Cruz*, 41 : 21-44.