

UM ESTUDO EXPERIMENTAL SÔBRE A DINÂMICA DA REGENERAÇÃO HEPÁTICA

J. P. GUIMARÃES
Lab. de Patologia Experimental
Seção de Pesquisas

INTRODUÇÃO

A imagem tridimensional da estrutura microscópica do fígado, sofreu modificações profundas, a partir do momento em que Elias e col.^{1 e 2}, baseados num exaustivo estudo de cortes em série e reconstruções estereoscópicas, contestaram o conceito clássico do lóbulo de Kiernan, sugerindo uma estrutura laminar ou em placas monocelulares para o parênquima hepático. Rappaport^{3, 4, 5 e 6}, em série de brilhantes trabalhos, contribuiu decisivamente para que mudássemos nossas concepções sôbre a unidade mórfó-funcional do fígado, ao destacar territórios parenquimatosos associados a rêde vascular do órgão, aos quais denominou acino hepático, clarificando sob muitos aspectos a patogenia das lesões hepáticas. Suas idéias podem ser assim resumidas: em tórno dos vasos porta terminais (vasos axiais) acumula-se uma porção de parênquima, banhado por sangue que circula nos sinusóides que emergem dêstes vasos. Êstes sinusóides caminham oblíquamente na direção de veias coletoras (veias centrais da terminologia clássica) situadas lateralmente em relação ao vaso axial. Assim, o vaso

axial mais a porção de parênquima em tórno dêle acumulado, constituem a unidade mórfó-funcional do fígado, isto é, o acino hepático.

Investigações anatômicas ajudadas por estudos histoquímicos vêm demonstrando nestes últimos anos que embora o parênquima hepático aparente ser um contínuum mórfó-fisiológico, é na realidade subdividido em zonas funcionalmente diferenciadas e que respondem característica e distintamente a ação dos variados agentes hepatotóxicos. Wachenstein⁷, demonstrou por exemplo que a desidrogenase sucínica, a glicose-6-fosfatase e a ATPase, são mais ativas na zona periférica (Zona 1 de Rappaport), enquanto que a DPNdiaforase e a 5-nucleotidase acumulam-se nas células da região central (Zona II).

Dependendo assim de sua posição relativa no acino hepático, o que a coloca em situações diversas vis-a-vis a corrente sanguínea, sujeitando-a a desiguais "pressões fisiológicas", a célula hepática exhibe graus diversos de concentração

de seus enzimas^{8 e 7}. A presença abundante de desidrogenase succínica nas células da periferia, deve indicar, como acentua Novikoff⁹, que as mesmas obtêm sua energia através a respiração, enquanto que a escassez dêste enzima nas células centrais, onde por sua vez se acumula a desidrogenase láctica sugere ser a glicolise anaeróbica a fonte principal de energia utilizada pelas células desta região.

Wachenstein⁷ também demonstrou que 3 a 4 horas após a administração de Tioacetamida, a ATPase desaparece inteiramente das células da zona II (zona central) e que a fosfatase ácida diminui consideravelmente. Revendo o problema da histoquímica enzimática do fígado, Novikoff⁹, acentua que todos os enzimas até aqui estudados mostram uma distribuição quantitativa diversa, segundo as duas zonas do acino hepático.

A significação fisiológica destas diferenças só agora começa a ser tentativamente interpretada e não precisamos realçar a importância destes achados para o pleno entendimento da patologia do fígado. A dinâmica do parênquima hepático vai ganhando assim complexidades insuspeitadas até bem pouco, sendo inúmeros os fatores que a condicionam e cuja natureza real desafia nossos métodos atuais de análise empírica e teórica.

A remoção cirúrgica de parte do fígado ou a necrose de porções do parênquima obtida a custa da administração de

hepatotóxicos, promove dentro de um período de tempo determinado, uma intensa atividade mitótica no remanescente do órgão, que leva, dentro de mais ou menos oito dias a restauração completa de seu volume¹⁰.

A indução automática de atividade mitótica num tecido habitualmente estável do ponto de vista divisional, pela remoção ou destruição parciais, como se observa com o fígado, tem fascinado os biólogos de tôdas as épocas e desafiado o denôdo e imaginação dos que tem se ocupado com o problema, pela simples razão de incluir em seus processos fenômenos de crescimento celular, diferenciação, auto-regulação, mitogênese, etc., cujos mecanismos íntimos nos são ainda praticamente desconhecidos. A interrogação se põe da seguinte maneira: que informação é enviada as células restantes de modo a fazê-las abandonar um estado de quiescência divisional e iniciar a mitose?

Bucher e col.¹¹ afirmaram em 1951, que hepatectomias realizadas em um dos membros de um par de ratos em parabiose, determinava a eclosão de mitoses no fígado do parceiro intacto, no mesmo período em que apareciam mitoses no fígado do animal hepatectomizado. Friedrich-Freksa e col.¹² e Adibi¹³ confirmaram estas observações injetando sôro de animais hepatectomizados em ratos normais e obtendo nestes uma onda de mitoses no fígado. Estas observações pareciam assim revelar a exis-

tência de um fator humoral, liberado após hepatectomia e responsável pelo estímulo que faz aparecer as mitoses no fígado. Ponto de vista diametralmente oposto foi sustentado por Glinos^{14, 15 e 16}. Este autor baseia sua concepção na existência de um mecanismo de "feedback" que normalmente controlaria o crescimento hepático. Segundo êle o fator crítico que comanda o crescimento hepático é a concentração sérica de uma substância elaborada pelo próprio fígado (albumina plasmática?). A remoção de parte do parênquima, reduziria a concentração sanguínea desta substância inibidora com a conseqüente liberação das células para a mitose. A medida que novas células fôssem sendo formadas, mais substância inibidora seria produzida até que atingido um nível crítico, cessariam a divisão celular e conseqüentemente o crescimento do órgão. Um equilíbrio dinâmico ficaria assim estabelecido entre o número de células que compõem o órgão e a concentração sérica da hipotética substância inibidora. Glinos afirma ter demonstrado experimentalmente tais postulados, impedindo a regeneração hepática em animais hepatectomizados e colocados em restrição total de líquidos e provocando o aparecimento de mitoses no fígado de animais intactos nos quais promovia diluição sanguínea através plasmaféresis. Embora contraditórias, estas observações permitiam concluir-se pela existência de um ou mais fatores humorais, seja estimulantes, regulando o crescimento hepático.

O problema da regeneração hepática torna-se mais complexo, quando atentamos para o fato que síntese de DNA (ácido desoxiribonucleico) precede sempre de algumas horas (12 a 18 horas) o início da atividade mitótica e decresce progressivamente de intensidade a medida que esta aumenta^{10 e 17}.

A moderna investigação citológica, tem revelado que o processo de divisão celular evolue em duas fases distintas, aparentemente comandadas por mecanismos independentes, e que são: a síntese de DNA e a mitose propriamente dita^{18, 19, 20, 21, 22 e 23}. Em condições experimentais definidas é possível inibir-se a mitose sem bloquear a síntese de DNA, acarretando a formação de células gigantes^{24, 25 e 26}. Não obstante o fato de síntese de DNA e mitose serem reguladas por mecanismos celulares independentes, formam os dois processos uma seqüência definida no tempo e no espaço e nenhuma célula somática é capaz de dividir-se sem antes duplicar seu conteúdo em DNA. Este é o ato preparador, embora não suficiente, que coloca a célula em condições tais, que permitem que os complexos processos físico-químicos que integram a mitose se desenrolem.

Ao remover um fragmento do fígado o que fazemos realmente? Provocamos o aparecimento de uma substância estimuladora do crescimento ou acarretamos o desaparecimento de uma substância inibidora? Mas o que é por exemplo, uma substância estimuladora do

crescimento? Será aquela que promove a síntese de DNA apenas? Já vimos entretanto que evidências experimentais indicam que apenas isto não parece ser o bastante para que uma célula se divida. Talvez a suposta substância estimuladora seja a responsável pelo desencadeamento da mitose. Mas como conciliar esta idéia com o conhecimento já assegurado que uma célula não se divide sem síntese prévia de DNA? Será então a substância estimuladora capaz de atuar numa primeira fase incitando a síntese de DNA e numa segunda fase promovendo a mitose? Mas se êstes dois processos são regulados por mecanismos diferentes, torna-se difícil em termos bioquímicos admitir-se a existência de uma substância única capaz de agir indistintamente tanto sôbre um como sôbre o outro. Dêste breve interlúdio especulativo em que incorremos, resultam certas imposições lógicas que precisam ser consideradas. Se admitirmos a existência de um fator estimulante, êste só pode sê-lo da síntese de DNA ou de ambas, síntese e mitose pròpriamente ditas, não podendo por definição ser exclusivamente da mitose já que esta é temporalmente dependente da síntese de DNA. Um inibidor teria que agir também primariamente sôbre a síntese de DNA, pois se assim não o fôsse, gigantismo celular seria uma condição normal do parênquima. É evidente que estas conclusões não satisfazem nem se coadunam com as observações experimentais. Recentemente, Mac Donald e col.²⁷, Rogers e col.²⁸, Alston e col.²⁹

e Fisher e col.³⁰, foram incapazes de demonstrar a existência de fatores humorais específicos, quer inibidores quer estimulantes, que comandassem a regeneração hepática.

A saída do impasse é abandonar pura e simplesmente a hipótese da existência de fatores humorais específicos regulando a regeneração hepática e transferir a análise do problema para um outro plano de referências. Ao considerarmos a repercussão que a remoção de um fragmento do fígado tem sôbre a concentração sérica de um número incontável de substâncias que são normalmente degradadas e excretadas por êste órgão, não seria totalmente desprovido de fundamento lógico, propor-se uma hipótese de trabalho, segundo a qual seria um aumento relativo na concentração sérica destas substâncias, entre as quais salientaríamos por exemplo os hormônios, o "estímulo" desencadeador da regeneração hepática. Estaríamos assim diante de um fenômeno adaptativo (mecanismo de "feed-back"), para o qual poderíamos sugerir o mesmo esquema de ação proposto para a indução e repressão enzimáticas^{31, 32, 33 e 34}. Assim, um mecanismo para a formação de enzimas pode ser teòricamente proposto, no qual o próprio substrato age como um estímulo para a formação do enzima, enquanto o produto da ação enzimática age como um repressor desta formação. No caso em discussão um excesso de "substratos" (substâncias circulantes a serem degradadas e detoxificadas pelo fígado) que sucederia a uma hepatectomia provo-

cariam a formação de novas células que procedessem a sua degradação. Swartz (1960) tem de certo modo sugerido idéia semelhante após observar que em animais castrados há uma diminuição de células octoploides no fígado. Para êste autor estas células seriam encarregadas de detoxificar os hormônios sexuais e não tendo função na ausência destes, desapareceriam.

Êste estudo consiste numa investigação destinada a substanciar, ainda que de forma preliminar e sujeita a posteriores confirmações, algumas das proposições feitas acima.

Em animais submetidos a tratamento com um hepatotóxico, (Tioacetamida), tentamos caracterizar os seguintes pontos: 1) a existência concreta de uma unidade mórfico-funcional no fígado e a natureza descontínua em termos metabólicos do parênquima hepático; 2) a dependência hormonal de certas alterações histológicas e da regeneração hepática em fígados lesados.

MATERIAL E MÉTODOS

Em todo o transcurso da experimentação foram usados ratos da linhagem August pesando em torno de 150 gs. Machos e fêmeas foram usados indistintamente na investigação dos efeitos precoces e tardios da intoxicação tioacetamídica. Tendo sido observada uma sensibilidade maior a droga entre os machos, apenas animais deste sexo foram usados na investigação dos efeitos sobre a lesão hepática, da remoção ci-

rúrgica das glândulas hipofise e tireóide. O efeito da gonadectomia foi estudada em ambos os sexos. Neste caso não só o efeito da remoção simples das glândulas foi estudado, mas também a modificação dos efeitos tioacetamídicos em machos castrados tratados com estrogênio e fêmeas castradas tratadas com proprionato de testosterona.

A influência alterativa destas modificações no equilíbrio hormonal foram analisados dentro de um período de 15 dias.

Os animais foram distribuídos em quatro grupos:

Grupo A — 18 animais (10 machos e 8 fêmeas) injetados diariamente com 10 mgs./100 gs. de peso de tioacetamida subcutâneamente, foram usados para o estudo histopatológico das lesões precoces e tardias. Três animais (2 machos e 1 fêmea) foram sacrificados aos 5, 15 e 30 dias após o início do tratamento. Os 9 animais restantes foram sacrificados quando moribundos em períodos variáveis após o início do tratamento. O período máximo de sobrevivência foi de 289 dias. Dois tumores hepáticos (colangiocarcinomas) foram observados em um macho e uma fêmea que sobreviveram, respectivamente, 175 e 289 dias ao tratamento.

Grupo B — 6 machos e 6 fêmeas gonadectomizados foram submetidos a tratamento com Tioacetamida (10 ms./100 gs. de peso diariamente) iniciado 24 dias após a operação.

Três animais de cada sexo foram sacrificados aos 5 e aos 15 dias após início do tratamento.

Grupo C — 6 machos e 6 fêmeas gonadectomizados e tratados com hormônios do sexo oposto em injeções subcutâneas diárias, iniciadas 24 horas após a operação e simultaneamente com as injeções de Tioacetamida nas doses já referidas. Proprionato de testosterona foi administrado na dose de 2,5 mgs. por injeção e benzoato de estradiol na dose de 5.000 u.i.b. por injeção. Três animais de cada sexo foram sacrificados aos 5 e aos 15 dias após início do tratamento.

Grupo D — 6 ratos machos hipofisectomizados. Tratamento com Tioacetamida nas doses já referidas foi iniciado 24 horas após operação. Três animais foram sacrificados aos 5 e 15 dias. Durante a observação os animais bebiam água açucarada (5% de sacarose).

Grupo E — 6 ratos machos foram tireóidectomizados e 24 horas após a operação foi iniciado o tratamento com Tioacetamida nas doses referidas. Três animais foram sacrificados aos 5 e 15 dias após início do tratamento.

Os animais foram sacrificados por meio de inalação excessiva de éter e fragmentos retirados de todos os lobos do fígado, fixados em formol a 10% e álcool absoluto. Os estudos histológicos foram realizados em córtex de 5 micra corados pela H.E., tricromico de Gomori, azul de metileno, P.A.S., Feulgen e reticulina de Gomori.

Cariometria

O aumento volumétrico dos núcleos foi utilizado como índice da atividade regenerativa. As mensurações dos diâmetros nucleares foram feitas com ocular micrométrica, utilizando lente de imersão em córtex corados pelo azul de metileno. Não houve discriminação regional de núcleos e o único critério seletivo foi a perfeita esfericidade dos núcleos a serem medidos. As medidas foram procedidas em campos alternados ao longo de uma linha reta e 100 células medidas em cada corte.

Três animais em cada grupo forneceram os fígados para as medidas e os histogramas foram construídos de acordo com as médias dessas três medidas. A análise dos dados registrados foi apenas semi-quantitativa no sentido que possui valor apenas comparativo, não sendo válida ou, pelo menos, não tendo sido validada matematicamente para cada histograma tomado separadamente. Das lesões ditas precoces, as mais regularmente induzidas pela Tioacetamida, são: necrose centro-lobular, gigantismo celular e mobilização centro-lobular de glicogênio. Destas três selecionamos as duas últimas, para observar as modificações sobre elas provocadas pela remoção das gonadas, hipófise e tireóide.

HISTOPATOLOGIA DA INTOXICAÇÃO TIOACETAMIDA

Tioacetamida (TA) é um composto cristalino, branco, de fórmula $\text{CH}_3 - \overset{\text{NH}}{\underset{\text{SH}}{\text{C}}}$

solúvel na água e no álcool absoluto. Em 1945, Childs e Siegler³⁶ propuzeram seu emprêgo no contrôle do apodrecimento em laranjas sem suspeitar seus efeitos tóxicos sôbre o organismo. A demonstração dos efeitos cancerigênicos da droga coube a Garth Fitzhugh e A. Nelson em 1948³⁷. Ambrose e col.³⁸ demonstraram os efeitos tóxicos agudos de doses únicas, salientando a necrose centro-lobular e a ineficácia de dietas suplementadas com metionina e colina na prevenção das lesões induzidas pela Tioacetamida.

O primeiro estudo detalhado dos aspectos citológicos da intoxicação Tioacetamidica no fígado foi realizado por Rather³⁹. Êste autor ressaltou a indução de gigantismo celular como um dos efeitos que caracterizavam a ação da TA, demonstrando ainda mais que o aumento volumétrico observado nas células do parênquima, era ritmico, conservando o histograma dos animais tratados a proporção numérica 1.2.4. característica dos fígados de mamíferos. Foi Rather também quem primeiro revelou o desaparecimento do ergastoplasma nas células do parênquima após o início do tratamento.

Em 1953, Carnes e col.⁴⁰, procedendo a estudos citofotométricos, demonstraram um aumento de conteúdo em DNA proporcional ao aumento volumétrico observado nas classes nucleares, sustentando assim a validade das observações de Rather e indicando ser o gigantismo nuclear uma verdadeira poli-

ploidia. Neste mesmo ano, Laird⁴¹ negou os achados de Carnes⁴⁰, por ter sido incapaz de relacionar o aumento volumétrico descrito com alterações na taxa de DNA e sustentou que tal aumento era devido a maior quantidade de proteínas nas células de fígados tratados com TA. Numa tentativa de esclarecer o metabolismo intermediário da droga, Nygaard e col.⁴² injetaram animais com Tioacetamida marcado com S35 e observaram que mais de 80% da droga era eliminada nas primeiras 24 horas. Enquanto que medula óssea, tireóide e suprarrenal concentravam temporariamente a substância em grau considerável, sua presença no fígado era negligível. Nenhum tecido exibiu retenção apreciável mesmo após injeções repetidas. Em 1955, Heizer⁴³, em estudos cariométricos e citofotométricos, confirmou as observações iniciais de Rather, demonstrando uma indução real de poliploidia no fígado de animais tratados e ainda mais relatou a total reversibilidade das lesões com a suspensão da droga mesmo após períodos prolongados de tratamento. Gupta^{44, 45 e 46} estendeu observações prévias sôbre a histologia do parênquima hepático submetido a TA, demonstrando seus efeitos cirrogênicos e cancerigênicos. Em 1965, Gallagher e col.⁴⁷ procederam ao primeiro estudo bioquímico dos efeitos da intoxicação pela TA, revelando um aumento considerável de cálcio intracelular e um bloqueio na respiração. Em função destes achados sugeriu Gallagher⁴⁷ que a TA agia sôbre a membrana celular alterando sua per-

meabilidade, o que permitiria a entrada excessiva de cálcio na célula, com conseqüente inibição da oxidação fosforilativa e necrose celular. Segundo os mesmos autores tais efeitos não eram observados *in vitro* e a administração de anti-histamínicos aos animais sob tratamento minimizava os efeitos da droga. Kleinfeld e col.^{48, 49 e 50} confirmaram e estenderam observações anteriores demonstrando, inclusive, que a TA não inibe os processos de síntese envolvidos na regeneração hepática, exercendo, entretanto, certo efeito retardador sobre a mitose. Grant e col.⁵¹ demonstraram que o conteúdo celular em RNA não era modificado em relação ao normal, que a síntese de proteínas medida pela incorporação de glicina marcada era muito aumentada em relação ao normal, que a síntese de fosfolipídios era muito reduzida e que naqueles fígados onde a proliferação ductular era mais intensa, a taxa de glicólise anaeróbica era cerca de duas vezes a dos controles. Baker e col.⁵² e Adams e col.⁵³ mais recentemente, entretanto, demonstraram uma inibição na síntese de proteínas e de RNA em fígados submetidos a TA, enquanto Muramatsu e col.⁵⁴ demonstraram que a TA promove uma diminuição das proteínas nos ribosomas e aumento relativo no suco citoplasmático.

Descrição dos Resultados

As observações constantes deste relato foram realizadas nos animais do Grupo A. 24 horas após a injeção é conspicua a necrose centro-lobular, ab-

sorvendo-se os detritos celulares rapidamente e deixando áreas de rarefação do parênquima (fig. 1 e 2). Cinco dias após injeções diárias de TA, o fígado exhibe alterações estruturais altamente características. Núcleos e Nucléolos mostram pronunciado aumento volumétrico, conservando de regra sua forma esférica habitual (fig. 3). O citoplasma também aumenta proporcionalmente e a célula no seu conjunto assume uma conformação mais arredondada que a habitual. A luz sinusoidal se apaga e o parênquima parece mais compacto. Não raramente os nucléolos intensamente corados são vistos acolados a membrana nuclear e ocasionalmente assumem uma forma alongada e regular. Embora este aumento volumétrico seja observado em toda a extensão do parênquima ele é nitidamente mais acentuado no território adjacente a veia central. Nesta região o ergastoplasma perde sua distribuição característica em grumos esparsos, individualizados e intensamente corados, assumindo o citoplasma aspectos mais homogêneo e corando-se difusa e pàlidamente com corantes basófilos (fig. 4).

O glicogênio desaparece inteiramente do citoplasma celular, ao longo de uma faixa que acompanha de forma surpreendentemente regular, sobretudo nas fêmeas, a veia central (Zona II de acino), conferindo ao tecido um desenho de rigor quase geométrico. Nas células da região periportal, (Zona I) o glicogênio é conservado e o ergastoplasma guarda sua aparência habitual (figs. 5, 6 e 7). Não só com a Tioacetamida mas pràti-

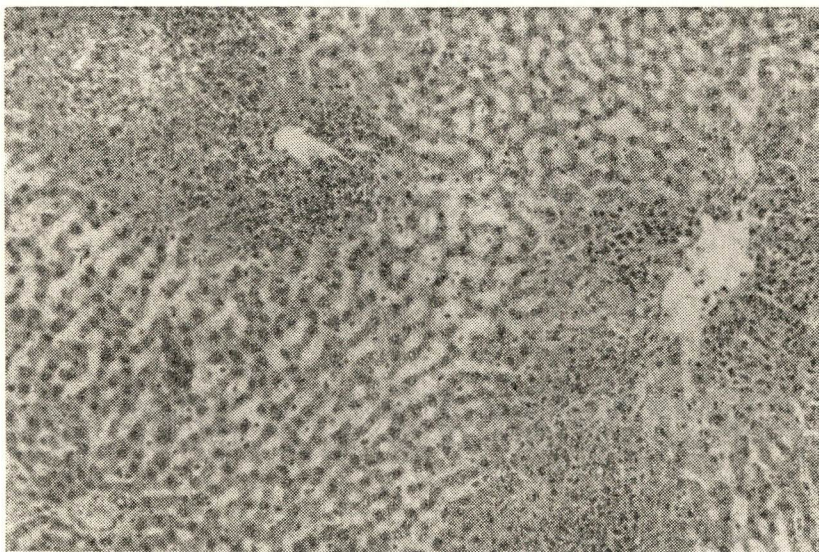


Fig. 1

Fígado. 24 horas após injeção de TA (10 mgs./100 grs.). Necrose centro-lobular. Detritos celulares ainda presentes de mistura com polimorfonucleares e histiócitos H.E. 130 X.

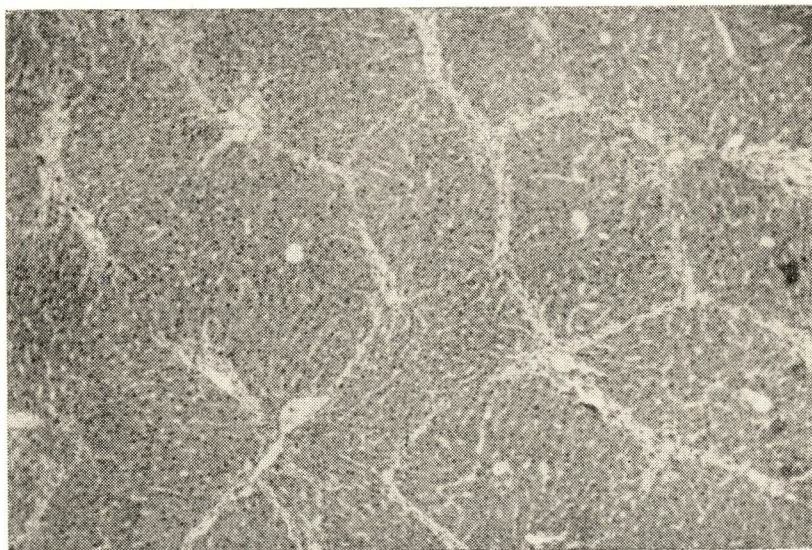


Fig. 2

Fígado. 15 dias após início de injeções de TA. Material necrótico totalmente reabsorvido. Áreas de rarefação do parênquima ligam as veias centrais e marcam as zonas onde se localizam a necrose (canais de edema de Opie). Apesar do tratamento continuado não se observa mais necrose. H.E. 80 X.

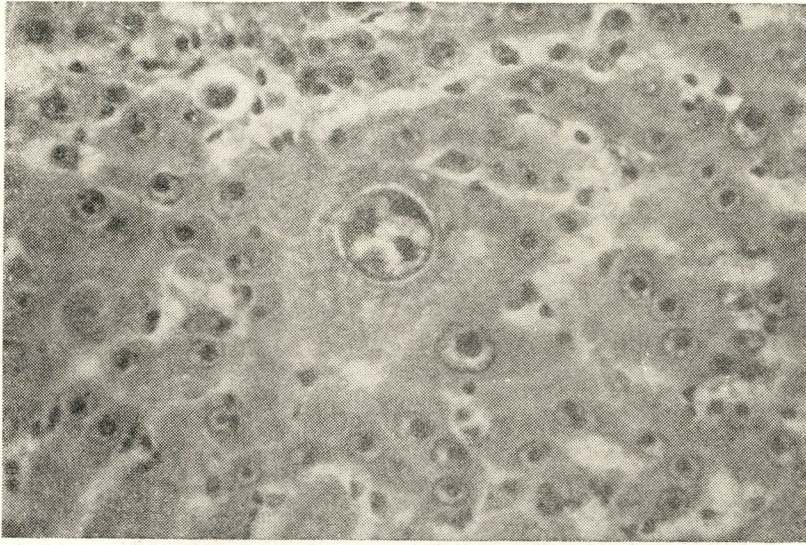


Fig. 3

Fígado. 15 dias após início das injeções de TA. Pronunciado gigantismo celular. Notar os volumosos nucléolos. Êste aspecto é representativo para todo o parênquima. H.E. 630 X.

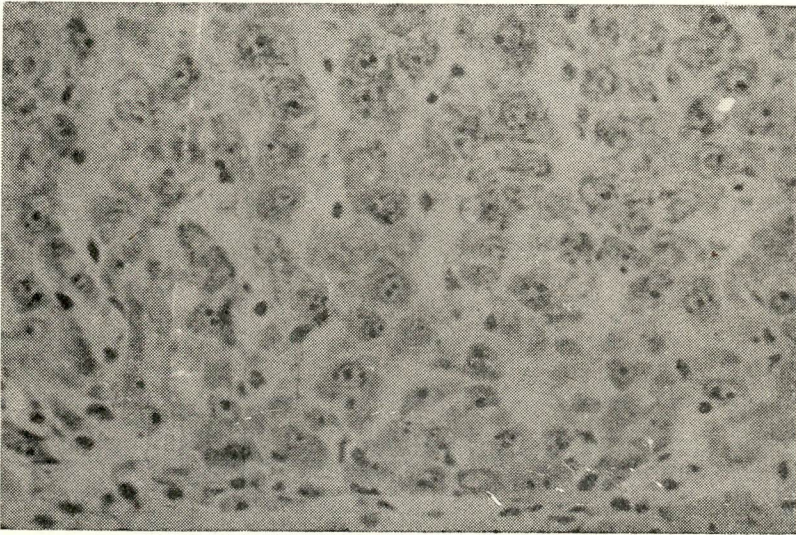


Fig. 4

Fígado. 15 dias após início das injeções de TA. Ergastoplasma presente nas células da periferia, aparece em grumos citoplasmáticos enquanto que as células centrais mostram citoplasma compacto e homogêneo. Azul de Toluidina. 200 X.

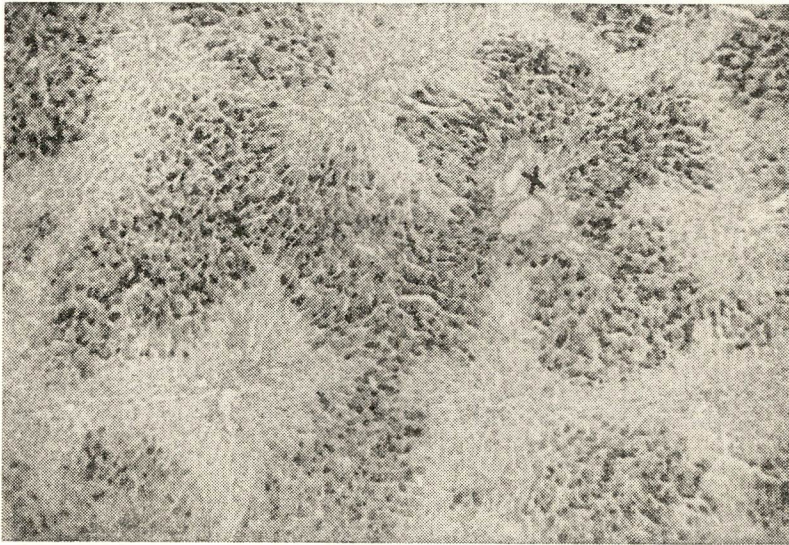


Fig. 5

Fígado. 15 dias após início das injeções de TA. Desaparição do glicogênio da zona centro-lobular (zona 2 do acino de Rappaport). A disposição estrelada das áreas contendo glicogênio, que se irradiam do espaço-porta (marcado com X) indica a configuração acinar do parênquima. P.A.S. 80 X.

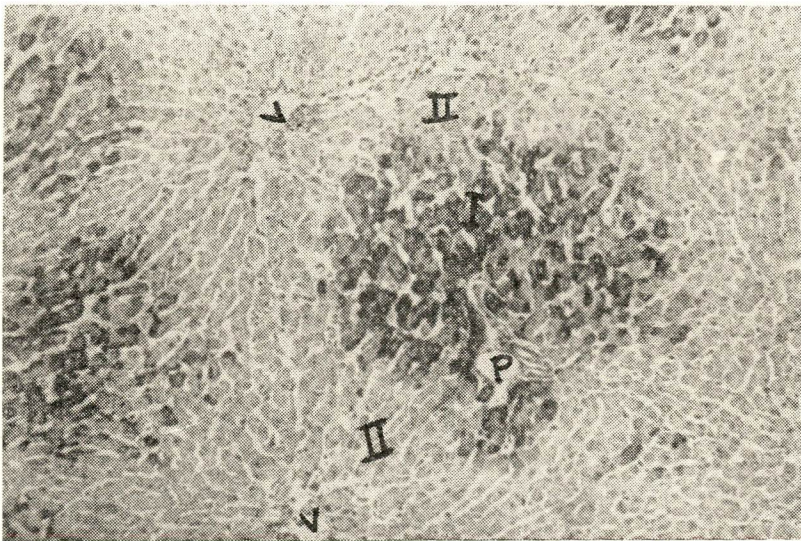


Fig. 6

Fígado. Mesmo animal da Fig. 5. Notar a relação entre as veias centrais marcadas com V e o espaço-porta marcado com P. A presença do glicogênio indica a área proximal de irrigação do vaso axial, isto é, a zona I do acino. A ausência do glicogênio expõe a zona II do acino. P.A.S. 130 X.

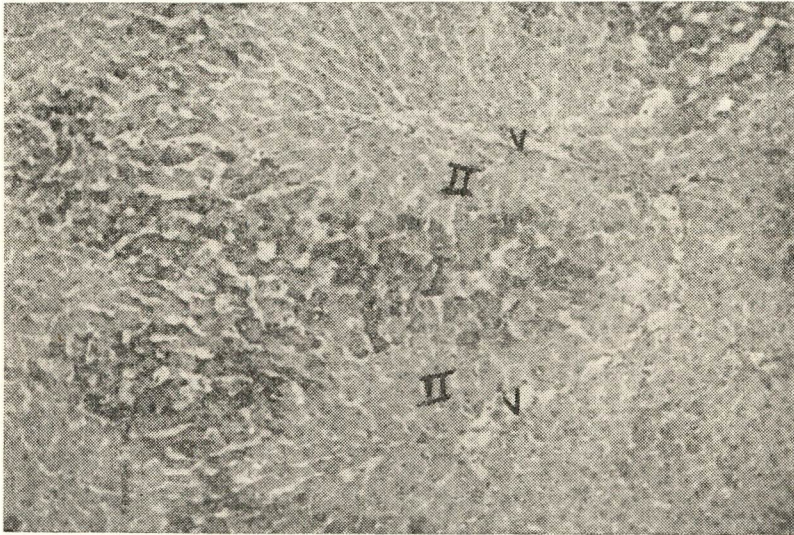


Fig. 7

Fígado. Mesmo animal da Fig. 5. Outro exemplo ilustrativo da configuração acinar do parênquima hepático revelada pela distribuição do glicogênio. Veias centrais. (V) o vaso axial não é visível. P.A.S. 130 X.

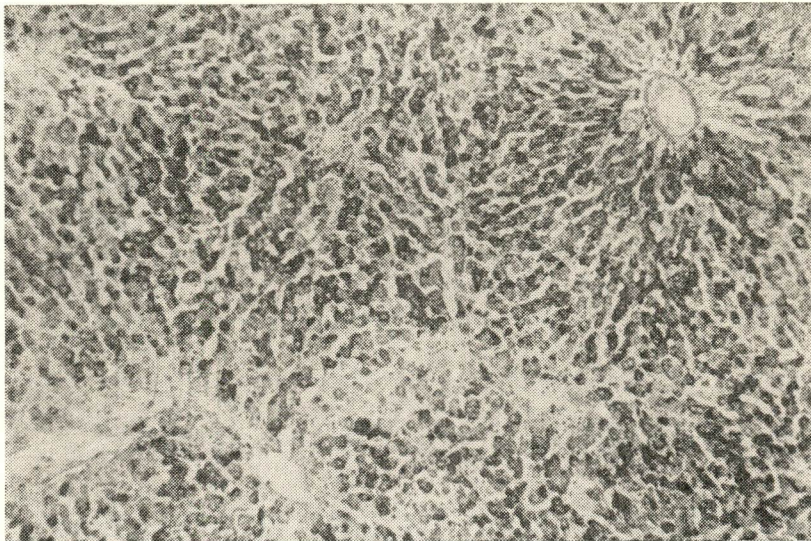


Fig. 8

Fígado. Rato hipofisectomizado. 15 dias após o início das injeções de TA. Não se observa mobilização do glicogênio. Certa rarefação junto as veias centrais é conseqüência da necrose. P.A.S. 130 X.

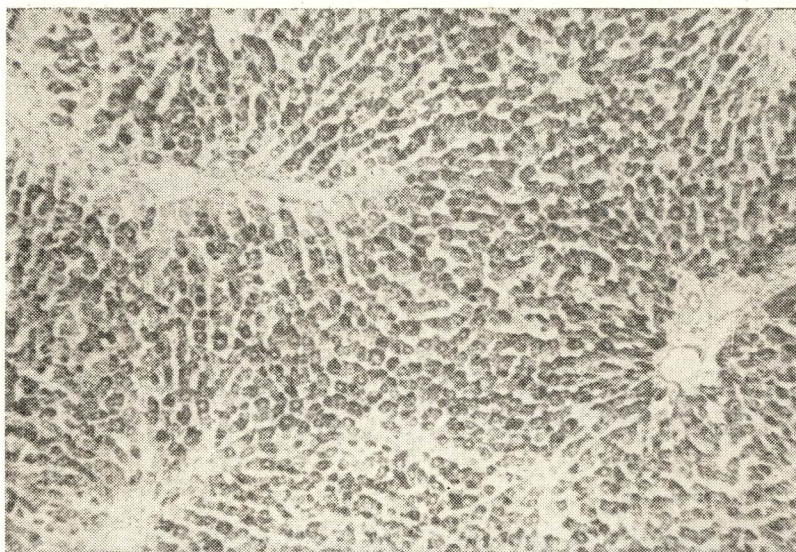


Fig. 9

Fígado. Rato tireoidectomizado. 15 dias após início das injeções de TA. Não se observa mobilização do glicogênio. Certa rarefação junto as veias centrais é consequência da necrose. P.A.S. 130 X.



Fig. 10

Fígado. 15 dias após início das injeções de TA. Acentuada proliferação dos canálculos biliares irradiando-se dos espaços-porta segundo os planos de clivagem do parênquima no caso acompanhando o trajeto dos vasos axiais. A coloração pela prata marca com precisão a proliferação ductular. Gomori (reticulina). 130 X.

camente com todos os hepatotóxicos conhecidos, é nesta região que incidem primariamente as lesões necróticas, justificando para a mesma a denominação de calcanhar de Aquiles do parênquima hepático. Ainda que moderada em ambos os sexos a necrose é nitidamente mais acentuada nos machos. Nos estágios iniciais da evolução do processo, histiócitos e polimorfonucleares acumulam-se nesta região desaparecendo com a remoção dos restos celulares. Não obstante a continuação do tratamento a necrose não progride em intensidade além daquela observada por volta dos 5 dias. Não se observa nesta região deposição de fibras colágenas. Proliferação dos ductos biliares instala-se precocemente e canaliculos neó-formados são vistos derivando por brotamento de ductos pré-existentes (fig. 10).

Mitoses são ocasionalmente vistas no epitélio ductular. Em alguns fígados a proliferação de canaliculos é particularmente intensa superando a ação dos fatores morfogenéticos e formando massas indistintas onde a diferenciação tubular fica mascarada. A medida que proliferam, os canaliculos progridem para o interior do parênquima. Esta progressão não se faz, entretanto, de maneira anárquica e arbitrária mas, de regra, caminha ordenadamente ao longo dos vasos axiais (fig. 10). Mesmo nos casos onde a proliferação tubular é intensa, envolvendo densamente os espaços-porta, a penetração intralobular se faz predominantemente ao longo dos vasos axiais, isto é, dos planos de clivagem

do parênquima. Fibroblastos de núcleo alongado e compacto, acompanham os ductos néo-formados, fornecendo um envoltório celular permanente a estas estruturas (fig. 11). A medida que estas estruturas vão sendo formados vão, também, sendo envolvidas por membranas argirófilas, que marcam em preparados corados pela prata a extensão da proliferação ductular (figs. 10 e 12). Formações diverticulares e saculares são vistas derivando de ducto-formados (fig. 13). Algumas destas assumem proporções avantajadas, com luz dilatada e contornos irregulares. O epitélio que as reveste tem de regra aspecto cilíndrico alto com núcleo proeminente e basal. Frequentemente nota-se nestas estruturas demolição de porções de sua parede, acumulando-se na luz tubular massas de detritos celulares de mistura com múco e polimorfonucleares. Estas estruturas tubulares atípicas conspicuamente envolvidas por densas membranas reticulínicas e fibras colágenas, formam por vezes nódulos que se distinguem do tecido vizinho e que correspondem as áreas de colangio-fibrose descritas por outros autores em outras condições experimentais. (fig. 15)

Os ductos proliferados, acompanhados de fibras e membranas colágenas e reticulínicas, que invadem o lóbulo a partir dos espaços porta, encontram os ductos proliferados dos espaços-porta vizinhos, estabelecendo-se, assim, septos translobulares (fig. 14). O processo cedo subverte a arquitetura normal do órgão, circunscrevendo porções do pa-

rênquima e promovendo pseudo-lobulação. A relação mórfico-funcional existente entre as duas zonas do acino hepático é obliterada, o que se revela na distribuição do glicogênio, que nesta altura é inteiramente arbitrária (fig. 16). Distúrbios circulatórios conseqüentes a esta septação anômala do parênquima leva em tempo a atrofia e necrose de áreas mais ou menos extensa de tecido hepático e a formação de nódulos de regeneração.

Em dois animais, macho e fêmea, que sobreviveram, respectivamente, 175 e 289 dias desde o início do tratamento, dois colangiocarcinomas com metástases pulmonares foram encontrados (figs. 17, 18 e 19).

A afirmação de Gupta⁴⁵ que o aumento volumétrico celular é um evento pré-necrótico, não pôde ser confirmada pelas observações aqui relatadas. Na realidade tudo indica que o gigantismo celular induzido confere a célula uma resistência maior a ação tóxica da substância, já que necrobiose relacionada com a Tioacetamida é observada apenas nos estágios iniciais do tratamento, mesmo que êste se prolongue por muito tempo. Discordamos também de Gupta, quando empresta a necrose central o papel fundamental na gênese dos processos que levam a cirrose. Como iremos ver mais adiante esta desempenha sim uma função indireta nos fenômenos de regeneração hepática mas não é o *sine qua non* do processo cirrogênico. Êste resulta sim da proliferação ductular ori-

ginária dos espaços-porta e que se acompanha da deposição de fibras argirófilas e colágenas, septando o parênquima e levando a nodulação característica da cirrose. O fato de que alguns animais ainda que tratados por muito tempo não exibam um fígado cirrótico se explica pela discreta proliferação ductular nêles observada e que é variável de animal para animal.

Mitoses em células do parênquima nunca foram freqüentes e jamais atingiram a proporção observada em animais hepatectomizados^{17 e 55}, ou naqueles submetidos a tratamento com tetracloreto de carbono⁵⁶. Sendo apenas vistos na região periportal (Zona I), o que concorda com a observação de Harkness⁵⁷ para o caso de animais hepatectomizados. Encerrando o relato da análise histopatológica da intoxicação tioacetamidica, estamos em condições de dizer que a mesma confirmou observações anteriores, permitiu a caracterização do acino hepático de Rappaport e demonstrou uma diferenciação metabólica e funcional entre as Zonas I e II do acino (vide fotos).

INFLUÊNCIA HORMONAL NA GÊNESE DAS LESÕES HEPÁTICAS PROVOCADAS PELA TIOACETAMIDA

Considerações gerais

Promovendo a degradação, inativação e excreção de hormônios circulantes, o fígado participa decisivamente na



Fig. 11

Fígado. 15 dias após início das injeções de TA. Ductos proliferados são acompanhados por fibroblastos de núcleo compacto (setas) H. E. 1200 X.

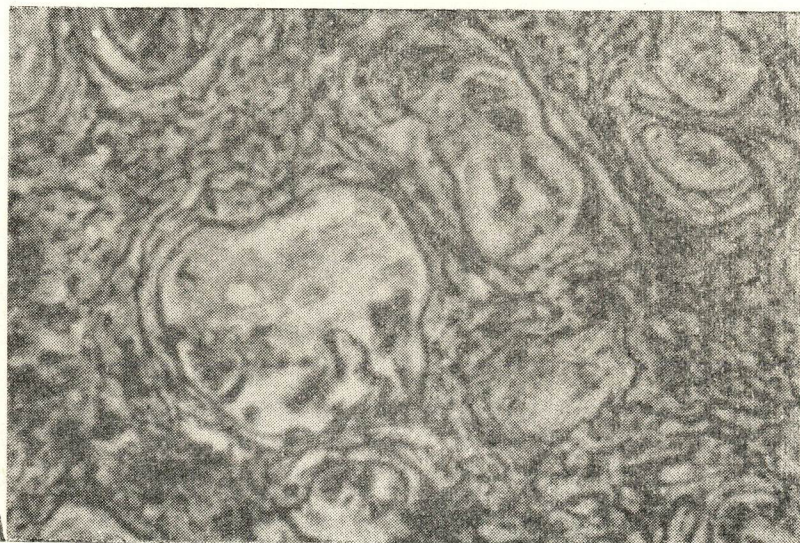


Fig. 12

Fígado. 15 dias após início das injeções de TA. Intensa formação de fibras e membranas argirófilas que envolvem os ductos proliferados. Gomori (reticulina) 630 X.

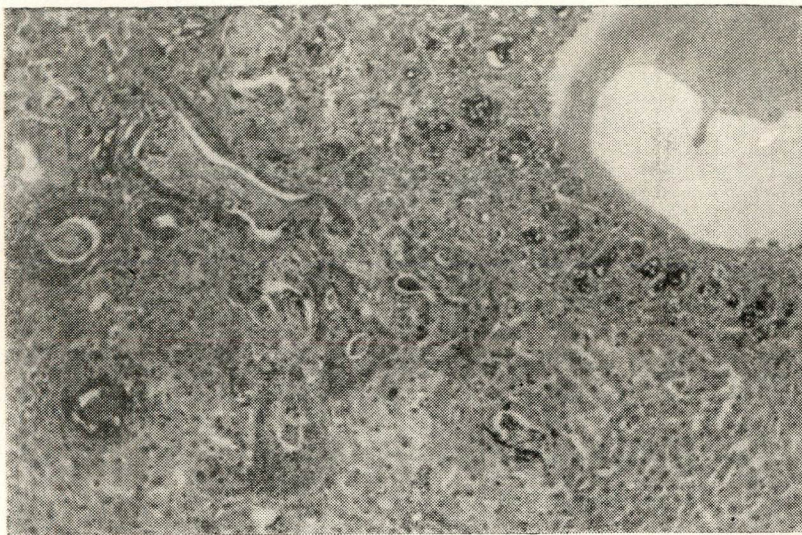


Fig. 13

Fígado. 6 meses após início das injeções de TA. Ductos proliferados e formações tubulares atípicas contendo muco e detritos celulares. P.A.S. 130 X.

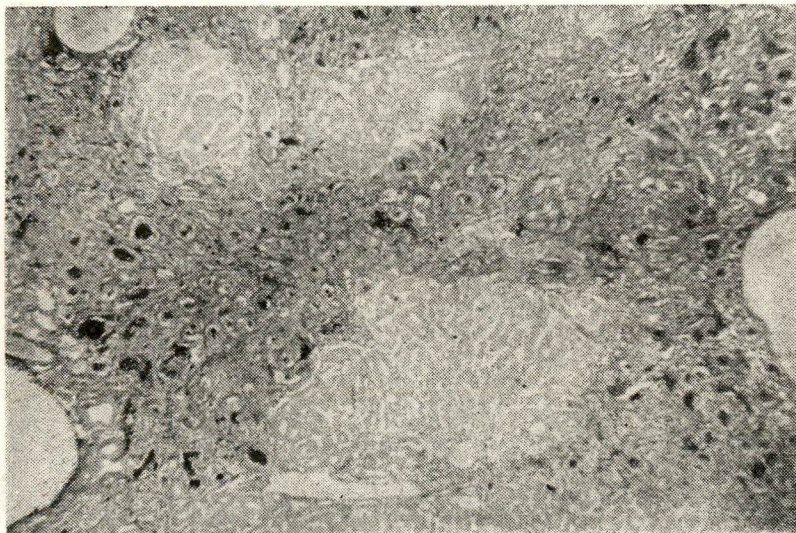


Fig. 14

Fígado. 6 meses após início das injeções de TA. Intensa proliferação ductular acompanhada de formação de colágeno, formando septos translobulares e segregando porções do parênquima. P.A.S. 80 X.

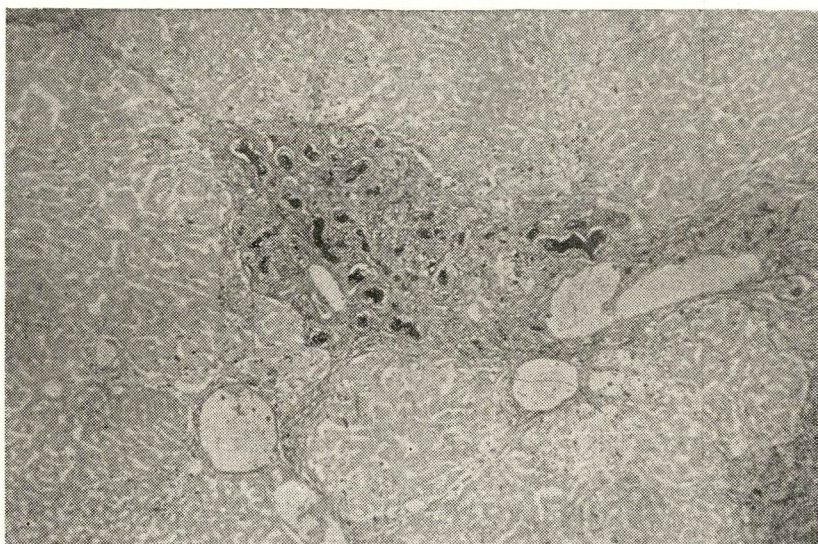


Fig. 15

Fígado. 6 meses após início das injeções de TA. Área de colangiiofibrose associada a um espaço-porta. P.A.S. 80 X.

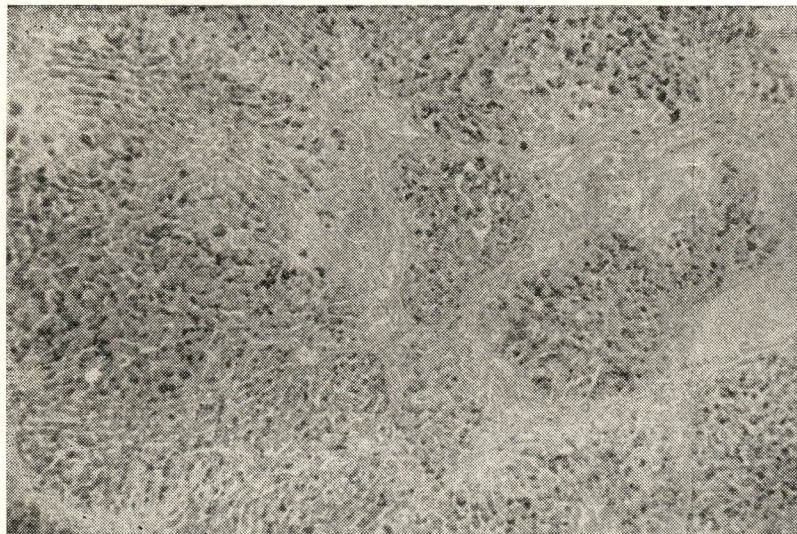


Fig. 16

Fígado. 6 meses após início das injeções de TA. Desorganização da arquitetura normal do fígado indicada pela distribuição arbitrária do glicogênio. P.A.S. 80 X.

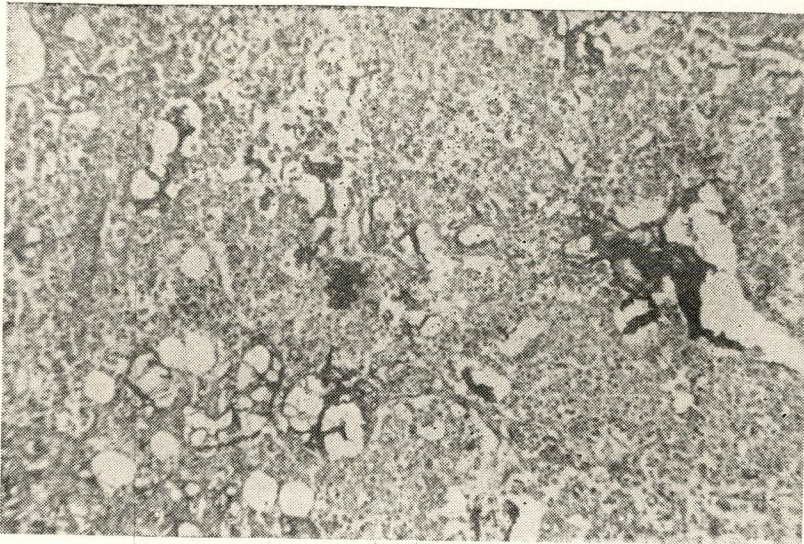


Fig. 17

Fígado. Colangioma após 175 dias de tratamento com TA. Notar a produção de muco. P.A.S. 80 X.

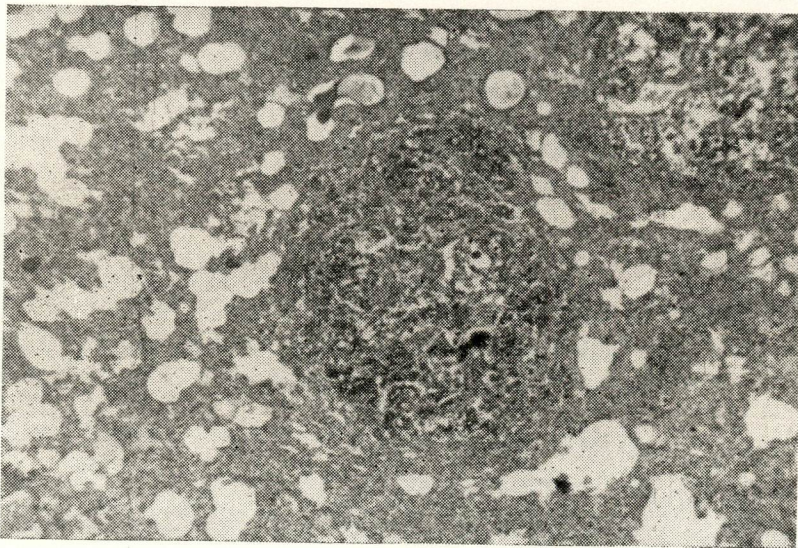


Fig. 18

Metástase pulmonar do tumor mostrado na Fig. 17. H.E. 80 X.

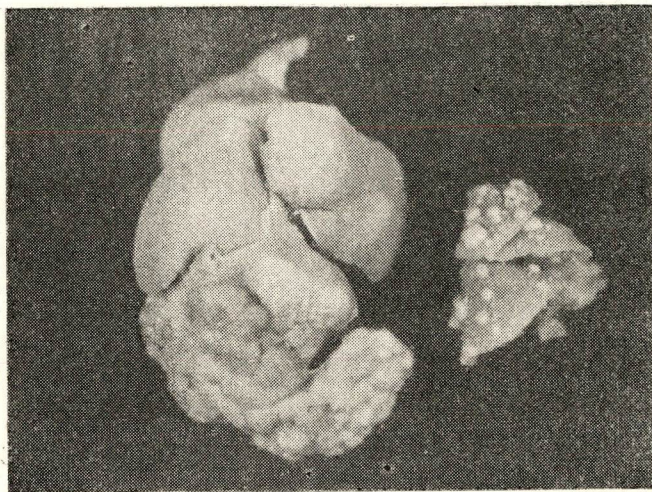


Fig. 19

Fígado exibindo tumor 175 dias após tratamento com T.A. e pulmão do mesmo animal com nódulos metastáticos.

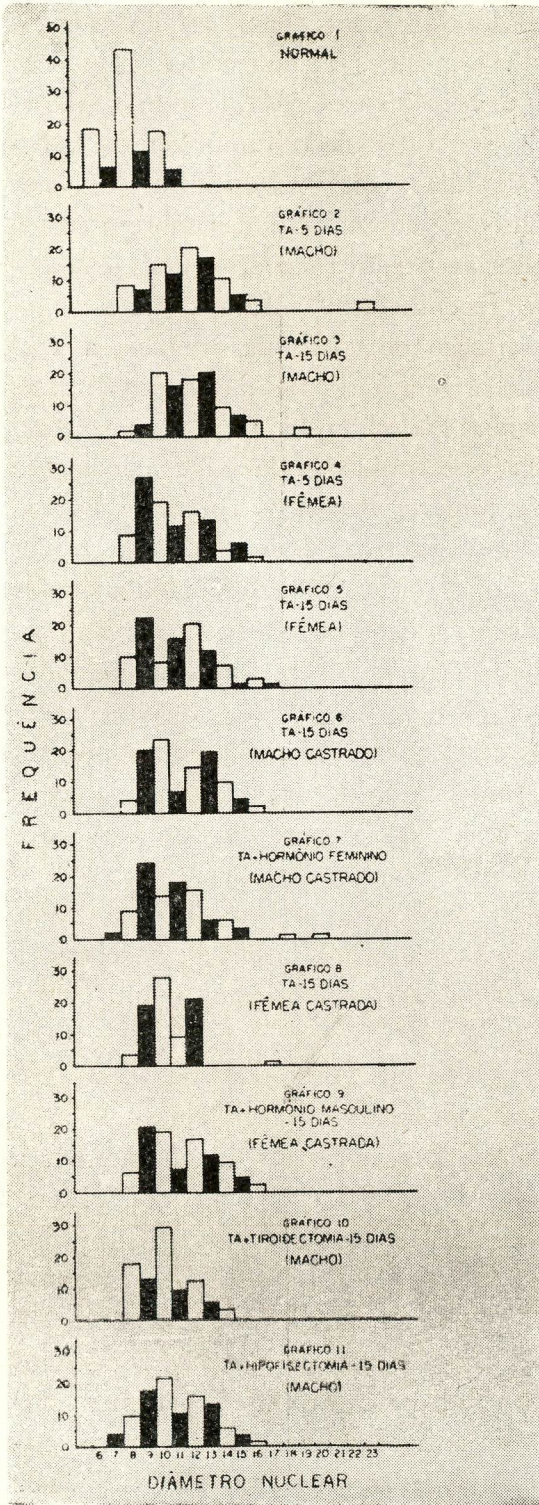


Fig. 20

Histogramas. Os histogramas foram construídos sobre as médias de três medidas, e com intervalo de classe de valor 1. O histograma do fígado normal adulto (gráfico 1) é representativo tanto para os machos quanto para as fêmeas. Os picos (barras brancas) correspondem respectivamente à valores volumétricos de 113 micra^3 , 268 micra^3 e 523 micra^3 , que são as classes diplóide ($2n$), tetraplóide ($4n$) e octoplóide ($8n$). A classe 16 u (904 micra^3) que não existe no histograma normal, aparece conspicuamente em todos os outros gráficos, onde também surgem classes de mais alta ploidia.

O gráfico 8 contém um erro; ao contrário do que é visto no desenho, a ante-penúltima barra é preta e a penúltima branca. As barras brancas correspondem a valores reais de ploidia e as barras pretas a valores intermediários. Para interpretação dos histogramas vide o texto.

manutenção do equilíbrio dinâmico existente entre os diversos setores endócrinos. Por sua vez a célula hepática utiliza em seu metabolismo um número variável de hormônios, que intervêm nos processos relacionados com a síntese de proteínas e metabolismo dos carboidratos, lipídios e eletrólitos. Em qualquer um destes processos, entretanto, a natureza exata da ação hormonal não é conhecida sendo variadas as idéias e os mecanismos de ação propostos, parcialmente sustentados por evidências experimentais.

Uma breve revisão da literatura nos informa que deficiência em insulina acarreta deposição periportal de gordura⁵⁸ o que também é obtido pela administração de extrato hipofisário anterior⁵⁹. Ovariectomia provoca deposição de gordura no fígado⁶⁰. Testosterona agrava as lesões hepáticas em machos e fêmeas em dieta pobre em colina⁶¹. Deficiência, tiroídiana, impede a formação de cirrose nutricional em ratos⁶². Insulina em excesso faz desaparecer o glicogênio hepático⁶³. Adrenalectomia bilateral faz desaparecer o glicogênio da zona periportal⁶⁴. Tireoidectomia deprime a regeneração hepática⁶⁵. Administração de tireóide reduz o glicogênio hepático, o que parece ser devido a uma inibição da desidrogenase láctica⁶⁶.

É fato definitivamente estabelecido nos dias de hoje que a cancerização experimental do fígado se processa sob contróle hormonal⁶⁷. Hipofisectomia inibe a formação de cirrose e tu-

mores em ratos alimentados com 3-metil-dimetilaminoazobenzeno. Ratos hipofisectomizados tratados com hormônio somatotrópico ou ACTH tem restaurada sua capacidade tumorigênica⁶⁸. Symeonidis e col.⁶⁹ relataram o efeito inibidor de adrenalectomias sobre a cancerização hepática experimental, enquanto Hochiligetti⁷⁰ informa que a administração de cortisona potencia a ação cancerígena do p-dimetilaminoazobenzeno. Bielschowski e col.⁷¹ nos informa que tireoidectomia inibe a formação de tumores hepáticos em ratos alimentados com acetilaminofluoreno. Miller e col.⁷² observaram que uma dieta de caseína iodada fazia aumentar a incidência de tumores em ratos alimentados com 3-Mo-DAB. É fato do conhecimento geral que a incidência de tumores espontâneos do fígado, quer entre animais de experiência, quer na raça humana é maior nos machos que nas fêmeas. Tem sido também demonstrada uma maior sensibilidade dos machos em relação a cancerização experimental, com diferentes agentes hepatotóxicos^{73, 74 e 75}. Com certos agentes, entretanto, o aposto é o que se observa. Ratos fêmeas se mostraram mais sensíveis do que machos a ação da etionina enquanto que testosterona exibiu um definido papel protetor⁷⁶. Bielschowski e col.⁷⁷ recentemente relataram uma menor incidência de tumores hepáticos em camundongos com nanismo hipofisário alimentados com aminofluoreno. Desta breve análise da literatura referente a influência hormonal na patologia hepática, perce-

be-se que até aqui apenas os aspectos terminais do processo mórbido, isto é, cirrose e câncer, foram devidamente considerados. Nada encontramos na literatura que nos era acessível que nos informasse sobre o comportamento da célula hepática em períodos iniciais da administração de um hepatotóxico à animais com seu equilíbrio hormonal alterado. Este estudo é uma tentativa preliminar para enfrentar o problema.

Descrição e análise dos resultados

As observações constantes deste relato foram realizadas nos animais dos Grupos B, C, D e E.

Desde o trabalho de Jacobj⁷⁸, sabe-se que o parênquima hepático não é constituído por uma população celular homogênea com relação aos volumes nucleares. Em mamíferos completamente desenvolvidos três classes nucleares podem ser destacadas segundo seus volumes, e os valores numéricos que definem estas classes, escritos como os termos de uma progressão geométrica de razão 2. Vários autores tem demonstrado um estreito paralelismo entre volume nuclear e ploidia (conteúdo em DNA)^{79, 43 e 80}. Desta forma, ressalvados certos casos especiais, a análise cariométrica é válida para a demonstração da existência de poliploidia no parênquima hepático. O aumento de volume da célula hepática é uma resposta comum a tratamentos os mais variados e parece estar relacionada basicamente com os processos de regeneração além

dos possíveis efeitos diretos de certas drogas. Entre os tratamentos que alteram os volumes nucleares e nucleolares estão certas dietas^{81 e 82}, ingestão de etionina⁸³, ingestão de alcalóides do Senécio e Heliotropium^{84, 85 e 86}, radiações^{87, 88, 89 e 90}. Ingestão de dimetilnitrosamina⁹¹. A ploidia hepática em animais normais tem sido demonstrado ser dependente da idade^{43, 92 e 80} e do equilíbrio hormonal^{93 e 94}. No rato a população celular hepática é predominantemente diploide nos períodos iniciais da vida, surgindo progressivamente as classes tetraploides e octoploides com o crescimento do animal.

Os fenômenos de restauração do parênquima hepático seja em consequência a hepatectomia parciais⁵⁵ ou destruição do parênquima com hepatotóxicos⁹⁵, tem lugar com desvio das classes nucleares no sentido de valores volumétricos mais altos, os quais retornam aos níveis normais uma vez completada a regeneração. Em animais hipofisectomizados, as observações realizadas por diferentes autores sobre os processos de regeneração hepática após hepatectomia parcial, tem fornecido resultados contraditórios. Distefano⁹³ afirma que a regeneração hepática em camundongos hipofisectomizados tem lugar sem aumento de volume nuclear, o qual pode ser obtido se o animal fôr concomitantemente tratado com hormônio somatotrópico.

Geschwind⁹⁶, por outro lado, demonstrou ser o problema mais complexo, afirmando justamente o contrário,

isto é: que a hipofisectomia não impede o aparecimento de poliploidia durante o desenvolvimento do animal hipofisectomizado em período precoce da vida. Segundo Geschwind isto indicaria serem os hormônios hipofisários necessários embora não indispensáveis para a poliploidização hepática, enquanto que o estímulo de uma hepatectomia parcial seria suficiente para induzir poliploidia mesmo em animais hipofisectomizados.

As alterações volumétricas provocadas pela TA no fígado de ratos e já descrita anteriormente, correspondem a modificações reais no conteúdo em DNA e, conseqüentemente, da ploidia hepática^{39, 40, 43 e 49}.

O histograma do rato normal (Gráfico I) mostra a curva tri-modal típica do parênquima hepático, com os valores volumétricos de 113 micra³; 268 micra³ e 523 micra³ (barras brancas) correspondendo, respectivamente, a células diploides, tetraploides e octoploides.

Aos 5 dias de tratamento é claramente evidente um desvio do histograma para a direita nos machos (Gráf. 2) guardando os valores volumétricos correspondentes aos picos da curva (barras brancas) uma proporção do tipo 1.2.4. (comparar com o histograma do rato normal). Uma nova classe volumétrica é nitidamente evidenciada (volume 904) e a passagem de uma classe a outra (velocidade de conversão) é maior no segmento inicial da curva e de-

crece a medida que caminhamos para a direita, o que é indicado pela freqüência de valores volumétricos intermediários, representados por barras pretas, menor no início que no fim da curva (valores volumétricos intermediários correspondem a células em processo de síntese de DNA, isto é, na fase S do ciclo mitótico). Aos 15 dias de tratamento (Gráf. 3) o histograma é o que seria esperado se o processo indicado no histograma anterior continuasse com a mesma tendência. Nota-se uma conversão quase completa das classes diploide e tetraploide nas seguintes, com um retardamento ainda observável na conversão das classes octoploide na seguinte, o que resulta numa atenuação dos picos da curva. Os dados obtidos nessas mensurações, coincidem, aproximativamente, com os de Rather³⁹, Heizer⁴³ e Kleinfeld⁴⁹.

Como tôdas as medidas relativas aos efeitos da TA sobre o fígado realizadas por outros autores, o foram sempre em machos, decidimos medir também tais efeitos em fígados de fêmeas numa tentativa de surpreender uma possível influência do sexo na resposta do parênquima hepático a esta droga. Os resultados obtidos, como veremos abaixo, indicam um retardamento na passagem de uma classe a outra, enquanto que um aumento na freqüência de núcleos na classe octoplóide (523^{N3}) além daquela observada nos machos, sugere também um retardamento na passagem desta classe para as seguintes.

O histograma de 15 dias (Gráf. 5) é o que seria esperado se o processo expresso no histograma de 5 dias continuasse com a mesma tendência; nota-se ainda aqui um retardamento na velocidade de conversão entre as classes $4n$ e $8n$, indicando que é este fenômeno que dá ao histograma sua forma peculiar.

Esta breve análise dos histogramas em machos e fêmeas revela assim uma flagrante diferença no comportamento do parênquima hepático face a ação da tioacetamida. Enquanto nos machos o fígado responde de maneira ritmica ao estímulo da TA, sendo a velocidade de conversão de uma classe na outra, maior entre as classes iniciais de ploidia, anulando-se progressivamente a distinção entre as classes com o decorrer do tratamento; nas fêmeas um retardamento nítido é observado na conversão da classe tetraploide em octoploide, retardamento este que se mantém durante todo o tempo de observação, com reflexos evidentes na velocidade de formação das classes hiper-octoploides. Estes achados são tanto mais interessantes quando se relembra que em animais normais o histograma é praticamente idêntico entre machos e fêmeas (Gráf. 1). A tentativa de reproduzir o padrão de ploidia hepática induzida pela Tioacetamida, de um sexo no outro, através castração e castração mais tratamento com hormônios do sexo oposto, forneceu os seguintes resultados: machos castrados (Gráf. 6) exibiram um histograma no qual, segundo os critérios adotados na análise anterior, um grande número de núcleos

acumulados no valor intermediário entre as classes $4n$ e $8n$, indicavam a semelhança da fêmea um retardamento na passagem de uma classe a outra. O histograma do macho castrado tratado com estrogênio (Gráf. 7) é então, praticamente, superponível ao da fêmea (Gráf. 4) e dispensa comentários. O histograma da fêmea castrada apresenta complexidades maiores na sua interpretação (Gráf. 8). Enquanto que um menor retardamento na conversão da classe tetraploide em octoploide é observado, o que seria esperado se postuláramos um efeito direto do estrogênio no mecanismo deste retardamento, nota-se, também, uma ausência total de valores além de $904 \text{ micra } 3$, com a queda abrupta da curva, fenômeno esse não previsto pela análise das ocorrências ilustradas nos histogramas anteriores. Um aumento no retardamento da passagem da classe octoploide para a seguinte é, também, indicado. A fêmea castrada tratada com proprionato de testosterona (Gráf. 9) não exibiu uma reversão ao padrão masculino, notando-se apenas o reaparecimento de valores acima de $904N^3$. Nesta altura se faz necessário que definamos nossos critérios de avaliação do retardamento na conversão de uma classe na outra. Duas coisas podem ocorrer, conduzindo a este mesmo resultado: 1) um retardamento no início da síntese de DNA o que quer dizer um prolongamento da fase $G1^{23}$ e que se expressa no histograma por uma frequência maior de valores reais de ploidia (barras brancas); 2) uma entrada rápida em síntese,

isto é, um encurtamento da fase G1 e prolongamento da fase S²³ desenvolvendo-se esta, entretanto, lentamente, o que se expressa no histograma por um aumento na frequência de valores intermediários (barras pretas) acima dos valores reais de ploidia. É evidente que tais critérios só são válidos para uma análise comparativa dos histogramas, construídos sobre medidas tomadas em períodos subseqüentes de tempo e relacionadas com o histograma normal ilustrado no Gráfico 1.

Conclui-se, assim, por uma flagrante diferença entre machos e fêmeas na sua resposta a administração de Tioacetamida. Enquanto nos primeiros a velocidade de conversão é maior entre as classes iniciais e diminui a medida que caminhamos para a direita do histograma, exatamente o oposto é observado entre as fêmeas. Ainda mais, entre as fêmeas, os hormônios sexuais são necessários, para a conversão da classe 16n (904N³) nas seguintes, enquanto entre os machos tal conversão pode se processar mesmo na ausência dos ditos hormônios.

A análise dos histogramas dos animais hipofisectomizados ou tiroidectomizados e tratados com TA, revelou que também a remoção destas glândulas, sobretudo da tireóide, altera substancialmente a resposta do parênquima a droga. Em machos hipofisectomizados (Gráf. 11) nota-se um retardamento na conversão entre as classes 4n e 8n, quando comparado com histograma de ma-

chos apenas tratado com TA (Gráf. 3). Não obstante este retardamento, a frequência de núcleos octoploides é praticamente idêntica a exibida no Gráfico 3, o que indica uma passagem mais demorada desta classe volumétrica (523 N³) para suas vizinhas. Nos animais tiroidectomizados (Gráf. 10) o mesmo tipo de resposta do parênquima ao tratamento com tioacetamida pode ser demonstrado. Aqui, entretanto, a conversão entre as classes 8n e 16n parece ser a que sofre um maior retardamento, o que se depreende da constatação da grande frequência de núcleos 8n num histograma onde a frequência de núcleos 4n é, também, considerável.

Gonadectomia não altera o padrão da distribuição do glicogênio no fígado de animais tratados com Tioacetamida.

Hipofisectomia ou tiroidectomia alteram totalmente o quadro histológico relativo ao glicogênio em fígados submetidos a ação da TA. A distribuição zonal tipicamente ilustrada nas Figs. 5, 6, 7 era inteiramente obliterada se estes animais eram previamente hipofisectomizados ou tiroidectomizados e tratados com TA. Enquanto que a hipofisectomia (Fig. 8) permite ainda certo grau muito discreto de mobilização centrolobular do glicogênio após administração de TA, a tiroidectomia a inibe inteiramente (Fig. 9). No que respeita a distribuição do glicogênio tais fígados são assim praticamente indistinguíveis do normal. Também o ergastoplasma mantém-se íntegro quando os animais a

serem submetidos a tratamento com TA, são previamente hipofisectomizados ou tireoidectomizados.

DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES

Como já foi previamente acentuado, um aumento anormal de volume da célula hepática tem sido descrito como conseqüente a um número variado de tratamentos. O gigantismo celular induzido pela Tioacetamida só é entretanto paralelizado na sua intensidade por aquele produzido pelas radiações ionizantes e alcalóides do Senécio e Heliotropium.

A produção de células gigantes em cultura de tecidos com o auxílio de radiações^{24, 25 e 26}, é interpretada como decorrência de uma inibição da mitose (citokinése) sem inibição concomitante da síntese de DNA e proteínas. Em estudos realizados sobre os efeitos do ouro coloidal radioativo sobre o parênquima hepático, chegamos a mesma conclusão⁸⁹. Tudo se passa como se a célula sintetizasse continuamente novos materiais, sem se dividir nos prazos devidos o que leva conseqüentemente a um aumento volumétrico.

Admitindo-se que o estímulo que faz desencadear o processo regenerativo no fígado seja a destruição (necrose) de porções do parênquima, uma interpretação tentadora para todos os casos, seria considerar a indução de gigantismo celular uma conseqüência da tentativa

do fígado de restaurar partes perdidas em condições adversas, isto é, sob a ação de tratamentos inibidores ou pelo menos retardadores da mitose, mas não da síntese de DNA.

Kleinfeld (1959) em experiências realizadas para demonstrar os efeitos da administração de tioacetamida sobre a regeneração hepática, demonstrou conclusivamente certa ação retardadora da TA sobre a mitose. Se a necrose é o evento desencadeador da síntese de DNA e da mitose, estas ocorrências só terão lugar se o parênquima hepático estiver em condições tais que o permitam responder normalmente a êste estímulo, isto é, se a célula estiver num estado de "competência". Se a substância indutora da necrose fôr também capaz de agir direta ou indiretamente no equipamento enzimático celular que comanda a mitose, inibindo-se ou retardando-a, o estímulo regenerativo se fará sentir apenas nos processos de síntese com o conseqüente aumento volumétrico da célula. Qual será então a natureza do estímulo que nasce com a remoção ou a necrose de porções do parênquima? A causalidade biológica é múltipla e inúmeros são os fatores que integram, comandam e controlam os acontecimentos num todo orgânico. A suposição que uma substância única é a responsável pelo processo de regeneração hepática, expressa tanto nas idéias de Glinos^{14, 15 e 16}, como nas de Bucher¹¹ e Friedrich-Freksa¹² pode não ser mais que uma falácia. Nossos resultados experimentais mostram que não podemos entender re-

geração hepática pensando ou analisando só o fígado. A análise comparada dos histogramas obtidos nas diferentes séries de animais estudados, nos quais foram provocadas alterações do equilíbrio hormonal, mostra claramente o reflexo que as mesmas têm sobre a regeneração hepática, indicando ser este um processo altamente complexo no qual participam ativamente fatores endócrinos, invalidando desta forma qualquer interpretação simplista para o problema.

A mobilização do glicogênio, altamente característica da ação de um número variado de hepatotóxicos⁹⁷ ocorre também sob controle hormonal. Em animais hipofisectomizados ou tireoidectomizados, a mobilização centro-lobular do glicogênio, conseqüente a tratamento com TA, é inteiramente bloqueada, aparecendo os fígados destes animais indistinguíveis dos normais. É interessante assinalar-se aqui que hormônios tireoidianos e somatotrópicos mobilizam o glicogênio hepático quando administrados em excesso.

Assim os dois efeitos provocados pela TA, gigantismo celular e mobilização do glicogênio, selecionados para que investigássemos suas possíveis modificações face a alterações no equilíbrio hormonal, provaram ser realmente influenciados por estas.

Nesta fase de nossas investigações, tendo a mão dados restritos e apenas morfológicos e semi-quantitativos, qualquer tentativa de interpretar tais achados, e propor um mecanismo de ação só

se justifica como uma programação de futuras investigações.

Sendo assim diante dos resultados e considerações acima expostos uma hipótese de trabalho pode ser proposta relativa a regeneração hepática. Hepatotóxicos e hepatectomia parcial, em última análise o que fazem é reduzir a população hepática eliminando um número variável de células.

Sabido como é que hormônios são degradados no fígado, aquela ocorrência significaria um aumento relativo de hormônios circulantes, proporcional ao número de células removidas ou destruídas, e conseqüentemente ruturado equilíbrio dinâmico entre fígado e glândulas endócrinas. Estes hormônios em excesso agiriam sobre a célula hepática (mecanismo de feed-back), desencadeando os processos de síntese e mitose. No caso de hepatectomia, quando nenhuma substância estranha é feita atuar sobre o fígado, tudo se passa "fisiologicamente" e uma vez restaurado o equilíbrio entre número de células do parênquima e concentração de hormônios circulantes o crescimento celular cessa. Em fígados submetidos a agentes tóxicos que além de induzirem necrose, interferem também de uma maneira geral com os processos que integram a mitose, retardando-a ou inibindo-a, a síntese de DNA e proteínas promovidas pelo excesso de hormônios circulantes conduz inevitavelmente a aumento volumétrico. Regeneração hepática é portanto o resultado da ação de inúmeros fatores, que

compõem um sistema dinâmico, sendo "fisiológica" quando todos operam dentro de um regime de equilíbrio funcional e "patológica" quando um ou mais fatores predominam em relação a outros.

A ênfase que aqui emprestamos a questão dos hormônios, não significa que excluimos do nosso pensamento a possibilidade que metabolitos outros, também normalmente degradados pelo fígado aumentem no sangue circulante, quando da diminuição da população hepática (necrose ou hepatectomia) e participem portanto dos fenômenos de "feed-back" que integram a regeneração. Apenas, nesta fase de nossas investigações, nossas atenções estão especificamente voltadas para os hormônios numa tentativa de definir a natureza de sua participação na regeneração hepática.

É tempo de concluir. Os pressupostos teóricos em função dos quais programamos as investigações aqui relatadas, foram satisfatoriamente validados pelos resultados obtidos. Confirmando idéia corrente na literatura especializada, demonstramos ser o parênquima hepático uma estrutura descontínua do ponto de vista funcional, distinguindo-se nele dois territórios metabòlicamente distintos: um território periportal (zona I do aci-

no) e um território central (zona II). Os elementos arrolados para esta distinção e discutidos no texto foram, 1) a mobilização exclusiva do glicogênio da zona central (zona II) sob tratamento com TA; 2) a desapareção do ergastoplasma granulado exclusivamente da zona central (zona II); 3) presença exclusiva de mitoses na zona periportal (zona I); 4) freqüência maior de grandes núcleos da zona central (zona II). A gênese das lesões precoces induzidas pela TA no fígado mostrou ser condicionada pelo equilíbrio hormonal, assim como foi demonstrada uma diferença quanto ao sexo na resposta a droga.

Finalmente os dados por nós obtidos, ainda que por si só não invalidem a pretensão de alguns autores ao sugerirem a existência de substâncias específicas, estimuladoras ou inibidoras do crescimento (regeneração) hepático, permitem sugerir pelo menos como uma nova hipótese de trabalho, sujeita a posterior confirmação, que é a demanda exercida sobre o fígado por um excesso relativo de hormônios e metabolitos circulantes, conseqüente seja à hepatectomias parciais, seja à destruição de porções do parênquima, o estímulo promotor da síntese de DNA e proteínas e da mitose.

RESUMO

O Autor desenvolve considerações iniciais sobre a arquitetura hepática segundo os pontos de vista sustentados por Rappaport, acentuando também a existência de diferenças funcionais entre as duas zonas do acino hepático. Para demonstrar a validade dessas proposições estudou-se a intoxicação tioacetamídica nos seus aspectos morfológicos e dinâmicos.

O autor também estuda e discute a influência do equilíbrio endócrino sobre a regeneração hepática, concluindo por propor uma hipótese de trabalho, segundo a qual o estímulo desencadeador da regeneração hepática seria um excesso relativo de hormônios e metabolitos circulantes, que se seguiria a uma hepatectomia parcial ou a destruição do parênquima hepático.

SUMMARY

The Author makes preliminary considerations on the liver architecture according to the ideas presented by Rappaport and points out the functional differences observed between the two zones of the liver acinus. To demonstrate the truth of these propositions the thioacetamide intoxication has been studied in its morphological and dynamic aspects.

The Author also studies and discuss the influence of the endocrine imbalance upon the liver regeneration and concludes by making the suggestion that the stimulus that initiates regeneration in the liver might well be the relative excess of circulating hormones and metabolites that follows a partial hepatectomy or a damage to the liver parenchyma.

BIBLIOGRAFIA

- 1 — ELIAS, H. — Re-examination of the structure of the mammalian liver. I. Parenchymal Architecture. *Am. J. Anat.* 84: 311, 1949.
- 2 — ELIAS, H. — The structure of the liver of vertebrates. *Acta Anat.* 14: 297, 1952.
- 3 — RAPPAPORT, A. M. — "The structural and functional acinar unit of the liver: some histopathological considerations". *Hepatitis Frontiers*, Little Brown, Co., 1957.
- 4 — RAPPAPORT, A. M. — The structural and functional unit in the human liver (liver acinus). *The Anatomical Record*, 130: 673, 1958.
- 5 — RAPPAPORT, A. M. e HIRAKI, G. Y. — Histopathologic changes in the structural and functional unit of the human liver. *Acta Anatomica*, 32: 240, 1958.
- 6 — RAPPAPORT, A. M. e HIRAKI, G. Y. — The anatomical pattern of lesions in the liver. *Acta Anatomica*, 32: 126, 1958.
- 7 — WACHENSTEIN, M. — Enzymatic histochemistry of the liver. *Gastroenterology*, 37: 525, 1959.
- 8 — NOVIKOFF, A. B. — The biochemical cytology of liver. *Bulletin of the New York Academy of Medicine*, 35: 67, 1958.
- 9 — NOVIKOFF, A. B. e ESSNER, E. — The liver cell. *The American Journal of Medicine*, 29: 102, 1960.
- 10 — WEINBREN, K. — Regeneration of the liver. *Gastroenterology*, 37: 657, 1959.
- 11 — BUCHER, N. R. L.; SCOTT, J. F. e AUB, J. C. — Regeneration of liver in parabiotic rats. *Cancer Res.*, 11: 457, 1951.
- 12 — FRIEDRICH-FREKSA, H. e ZAKI, F. G. — Spezifische Mitose-Auslösung in normaler ratten-Leber durch von par-tieel hepatectomierten ratten *Zeitschrift für Naturforschung*, 9b: 394, 1954.
- 13 — ADIBI, S. K.; PASCHKIS, E. e CANTAROW, A. — Stimulation of liver mitosis by blood serum from hepatectomized rats. *Exptl. Cell Res.*, 18: 396, 1959.
- 14 — GLINOS, A. D. e GEY, G. O. — Hormonal factors involved in the induction of liver regeneration in the rat. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 80: 421, 1952.
- 15 — GLINOS, A. D. — Evidence for a negative feed-back system controlling liver regeneration. *Symposium on Information Theory in Biology*, Pergamon Press, 1956.
- 16 — GLINOS, A. D. — Environmental feed-back control of cell division. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 90: 592, 1960.
- 17 — KELLY, L.; HIRSCH, J. D.; BEACH, G. e PALMER, W. — The time function of P32 incorporation into DNA of regenerating liver: the effect of irradiation. *Cancer Res.*, 17: 117, 1957.
- 18 — CASPERSSON, T.; KLEIN, E. e Ringertz, N. R. — Cytochemical studies on some effects of X-radiation on three ascites tumors. *Cancer Res.*, 18: 857, 1958.
- 19 — WILLIAMS, R. B.; TOAL, J. N.; WHITE, J. e CARPENTER, H. M. — The effect of total-body x-radiations from near threshold to tissue lethal doses on the small bowell epithelium of the rat. *Research Report. NM 6202000201*. Naval Medical Research Institute, Bethesda, Maryland.
- 20 — TOAL, J. N.; REICH, J. C.; WILLIAMS, R. B. e WHITE, J. — Effect of total-body x-irradiation from near threshold to tissue lethal doses on the small bowell epithelium of the rat. *Research Report. NM 6202000202*. Naval Medical Research Inst., Bethesda, Maryland.

- 21 — DUCOFF, H. S. e EHRET, C. F. — Mitogenesis. The University of Chicago Press, 1956.
- 22 — PRESCOT, D. M. — Relation between cell growth and cell division. IV. The synthesis of DNA, RNA and protein from division to division in Tetrahymena. Exptl. Cell Res., 19: 228, 1960.
- 23 — GELFANT, S. — Initiation of mitosis in relation to the cell division cycle. Exptl. Cell Res., 26: 395, 1962.
- 24 — PUCK, T. T. e MARCUS, P. I. — Action of x-rays on mammalian cells. J. Exper. Med., 103: 653, 1956.
- 25 — TOLMACH, L. J. e MARCUS, P. I. — Development of x-ray induced giant Hela cells. Exptl. Cell Res., 20: 350, 1960.
- 26 — SHEEK, M. R.; DESARMIER, R. M.; SAGIK, B. P. e MAGEE, W. E. — Biochemical changes during the formation and growth of giant cells from irradiated Hela cells. Exptl. Cell Res., 19: 549, 1960.
- 27 — MAC DONALD, R. A. e ROGERS, A. E. — Lack of effect of plasma from partially hepatectomized cirrhotic and normal rats on deoxyribonucleic acid synthesis and mitosis in rat liver. Gastroenterology, 41: 33, 1961.
- 28 — ROGERS, A. E.; SHAKA, J. A.; PECHET, G. e MAC DONALD, R. A. — Absence of a "humoral factor" affecting hepatic regeneration in parabiotic rats. Am. J. Path., 39: 561, 1961.
- 29 — ALSTON, W. C. e THOMSON, R. Y. — Humoral and local factors in liver regeneration. Cancer Res., 23: 901, 1963.
- 30 — FISHER, B.; FISHER, E. R. e SAFFER, E. — Investigation concerning the role of a humoral factor in liver regeneration. Cancer Res., 23: 914, 1963.
- 31 — VAN POTTER, R. e AUERBACH, V. H. — Adaptive enzyme and feed-back mechanism. Lab. Investigat., 8: 495, 1959.
- 32 — SCHAPIRA, F. — L'adaptation enzymatique chez les animaux superieurs. Revue Française d'études cliniques et biologiques, 5: 722, 1960.
- 33 — QUASTLER, H. — Chemical communication systems in the cell. Transactions of the New York Academy of Sciences, 25: 382, 1963.
- 34 — PITOT, H. C. e HEIDELBERGER, C. — Metabolic regulatory circuits and carcinogenesis. Cancer Res., 23: 1694, 1963.
- 35 — SWARTZ, F., SAMS, B. F. e BARTON, A. G. — Polyploidization of rat liver following castration of males and females. Exptl. Cell Res., 20: 438, 1960.
- 36 — CHILDS, J. F. L. e SIEGLER, E. A. — Controlling orange decay. Industrial and Eng. Chem., 38: 82, 1946.
- 37 — FITZHUGH O. G. e NIELSON A. A. — Liver tumors in rats fed thiourea and thioacetamide. Science, 108: 626, 1948.
- 38 — AMBROSE, A. M., DEEDS, F. e RATHER, L. J. — Toxicity of thioacetamide in rats. J. Industr. Higi. a Toxicol., 31: 158, 1949.
- 39 — RATHER, L. J. — Experimental alteration of nuclear and cytoplasmic components of the liver cell with thioacetamide. Bull. Johns Hopkins Hosp., 88: 38, 1951.
- 40 — CARNES, W. H., BERNSTEIN, D. S. e RATHER, L. J. — Effect of thioacetamide on the desoxyribonucleic content of liver cells. Federation Proc., 12: 385, 1953.
- 41 — LAIRD, A. K. — Nuclear changes induced in rat liver cells by thioacetamide. Arch. Biochem. and Biophysics, 46: 119, 1953.
- 42 — NYGAARD, O., ELDJARN, L. e NAKKEN, K. F. — Studies on the metabolites of thioacetamide — S35 in the intact rat. Cancer Res., 14: 625, 1954.
- 43 — HEIZER, P. — Desoribose nucleic acid (DNA) content size and size of rat liver nuclei during thioacetamide intoxication and recovery. Chromossoma Band. 7: 281, 1955.
- 44 — GUPTA, D. N. — Production of can-

- cer of the bile ducts with thioacetamide. *Nature*, 175: 257, 1955.
- 45 — GUPTA, D. N. — Acute changes in the liver after administration of thioacetamide. *J. Path. Bact.* 72: 1956.
- 46 — GUPTA, D. N. — Nodular cirrhosis and metastasizing tumors produced in the liver of the rats by prolonged feeding with thioacetamide. *J. Path. Bact.* 72: 415, 1956.
- 47 — GALLAGHER, C. H., GUPTA, D. N., JUDAH, J. D. e REES, K. R. — Biochemical changes in liver in acute thioacetamide intoxication. *J. Path. Bact.*, 72: 193, 1956.
- 48 — KLEINFELD, R. G. — Early changes in rat. liver and kidney cells induced by thioacetamide. *Cancer Res.* 17: 954, 1957.
- 49 — KLEINFELD, R. G. e HAAM, E. Von — The effect of thioacetamide on rat liver regeneration. I. Citolgical studies. *Cancer Res.*, 19: 769, 1959.
- 50 — KLEINFELD, R. G. — HANN, E. Von — Effect of thioacetamide on rat liver regeneration. II. Nuclear RNA in mitosis. *J. Biofysic and Biochem Cytol*, 6: 393, 1959.
- 51 — GRANT H. C. e REES, V. R. — The precancerous liver correlation of histological and histochemical changes in rats during prolonged administration of thioacetamide and butter yellow. *Proceedings of the Royal Society*, 148: 930, 1958.
- 52 — BAKER, E. A., SMUCKLER, E. A. e BENDITT, E. P. — Effect of thioacetamide and yellow phosphorus poisoning on protein synthesis in vivo. *Lab. Investigat.*, 12: 995, 1963.
- 53 — ADAMS, H. R. e BUSCH, H. — Effects of thioacetamide on incorporation of orotic acid-2-C¹⁴ into RNA fractions in liver. *Cancer Research*, 23: 576, 1963.
- 54 — MURAMATSU, M. e BUSCH, H. — Effects of thioacetamide on metabolism of proteins of normal and regenerating liver. *Cancer Res.*, 22: 1100, 1962.
- 55 — SULKIN, N. M. — A study of the nucleus in the normal and hyperplastic liver of the rat. *Am. J. Anat.*, 73: 107, 1943.
- 56 — POST, J., HIMES, M. B., KLEIN, A. e HOFFMAN, J. — Responses of liver to injury. *Arch. Path.*, 64: 278, 1957.
- 57 — HARKNESS, R. D. — The spatial distribution of dividing cells in the liver of the rat after partial hepatectomy. *J. Physiol.*, 116: 373, 1953.
- 58 — HARTROFT, W. S. — "Experimental hepatic injury" in *Diseases of the liver*. J. B. Lippincott Co., 1956.
- 59 — MACKAY, E. M. e BARNES, R. H. — Choline and pancrea extract on fatty livers and ketosis due to anterior pituitary extract. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, 38: 803, 1938.
- 60 — SHIPLEY, R. A., CHADZIK, E. B. e GYORGY, P. — Effect of extirpation of various glands ond production of fatty liver. *Arch. Biochem.*, 16: 301, 1948.
- 61 — EMERSON, W. J., ZANNARIK, P. C. e NATHANSON, I. T. — The effect of sex hormones on hepatic and renal lesions. *Endodrinology*, 48: 548, 1951.
- 62 — HANDLER, P. e FOLLIS, R. H. — Role of thyroid activity in the pathogenesis of hepatic lesion due to choline and cystine deficiency. *J. Nutrition*, 35: 669, 1948.
- 63 — TANNENBERG, J. — Pathological changes in the heart, skeletal muscle and liver in rabbits treated with insulin in shock dosage. *Am. J. Path.*, 15: 25, 1939.
- 64 — DEANE, H. W. e GREEP, R. O. — A morphological and histochemical study of the rat adrenal cortex after hypophysectomy with comments on the liver. *Am. J. Anat.*, 79: 117, 1946.
- 65 — DRABKIN, D. L. — Liver regeneration and cytochrome metabolism. *J. Bioal. Chem.*, 171: 395, 1947.
- 66 — VESTLING, C. S. e KNOEPELMA-CHER, A. A. — Lactic-dehidrogenase

- of liver and its relation to thyroide activity in the rat. *J. Biol. Biochem.*, 183: 63, 1950.
- 67 — BIELCHOWSKY, F. — The role of hormonal factors in the development of tumors induced by 2-aminofluorene and related compounds. *Acta. Inter. contra Cancrum*, XVII: 121, 1961.
- 68 — GRIFFIN, A. C., RINFRET A. P. e CORSIGLIA, V. F. — The inhibition of liver carcinogenesis with 3-methyl-4-dimethylaminoazobenzene in hypophysectomized rats. *Cancer Res.*, 13: 77, 1953.
- 69 — SYMEONIDES A., MULAY, A. S. e BURGOYNE, F. H. — Effect of adrenalectomy and of desoxicorticosterone acetate on the formation of liver lesions in rats fed p-dimethylaminoazobenzene. *J. Nat. Cancer Inst.*, 14: 805, 1954.
- 70 — HOCH-LIGET, C. — Effect of cortisone administration on induced and transplanted hepatomas. *J. Nat. Cancer Inst.*, 15: 19663, 1955.
- 71 — BIELCHOWSKY, F. e HALL, W. H. — Inhibition of the hepatoma inducing action of 2-amino and 2-acetylaminofluorene by thyroidectomy. *Proc. Univ. Otago med. sch.*, 30: 26, 1952.
- 72 — MILLER, W. L. e BAUMAN, C. A. — Basal metabolic rate and liver tumors due to azo-dyes. *Cancer Res.*, 11: 634, 1951.
- 73 — RUMSFELD, H. W., MILLER, W. L. e BAUMAN, C. A. — A sex difference in the development of livers tumors in rats fed 3-methyl-4-dimethylaminoazobenzene of 4-fluoro-4-dimethylaminoazobenzene. *Cancer Res.*, 11: 814, 1951.
- 74 — LEATHEM, J. H. — Influence of sex on 2-acetylaminofluorene-induced liver tumors in rats and mice. *Cancer Res.*, 11: 266, 1951.
- 75 — MORRIS, H. P., DUHNIK, C. S. e JOHNSON, J. M. — Studies on the carcinogenic action in the rat of 2-nitro, 2-amino, 2-acetylamino and 2-diacetylaminofluorene after ingestion and after painting. *J. Nat. Cancer Inst.* 1: 1201, 1950.
- 76 — FARBER, E., KOCH — WESER, D. e POPPER, H. — The influence of sex and testosterone on fatty liver due to ethionine. *Endocrinology*, 48: 205, 1951.
- 77 — BIELCHOWSKY, F. e BIELCHOWSKY, M. — Carcinogenesis in the pituitary dwarf mouse. The response to 2-aminofluorene. *Brit. J. Cancer*, 14: 195, 1960.
- 78 — JACOBY, W. — Uber das rhythmische wachstern der Zelleu durch Verdoppelung ihres volumens. *Arch. f. Entwcklungsmech. d. Organ*, 106: 124, 1925.
- 79 — POGO, A. O. POGO, B. G. T. e CORDERO — FUNNES, J. R. — Corelation between desoxiribonucleic acid and volume in liver cells nuclei during postnatal growth. *Exptl. Cell. Res.*, 20: 208, 1960.
- 80 — SWARTZ, F. J. — The development in the human liver of multiple deoxyribose nucleic acid (DNA) classes and their relationship to the age of the individual. *Chromosoma*, 8: 53, 1956.
- 81 — STENRAM, V. — Nucleolus sizes in the liver of rats fed ou high and non-protein diets after starvation. *Acta Anatomica*, 26: 352, 1956.
- 82 — WILSON, J. W. — Hepatomas produced in mice by feeding bentonite in the diet. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 57: 678, 1954.
- 83 — FARBER, E. — Similarities in the sequence of early histological changes induced in the liver of the rat by ethionine, 2-acetylaminofluorene, a 3-methyl-4-dimethylaminoazobenzene. *Cancer Res.*, 16: 142, 1956.
- 84 — BULL, L. B. e DICK, A. T. — The chronic pathological effects on the liver of the rat of the pyrolizidine alkaloids, heliotrine, lasiocarpine, and their N-oxides. *J. Path. Bact.*, 78: 483, 1959.
- 85 — SCHOENTAL, R. e MAGEE, P. N. — Chronic liver changes in rats after a

- single dose of lasiocarpine, a pyrrolizidine(senécio) alkaloid. *J. Path. Bact.*, 74: 305, 1957.
- 86 — SCHOENTAL, R. e MAGEE, P. N. — Further observation on the subacute and chronic liver changes in rats after a single dose of varius pynolizidine (senécio) alkaloids. *J. Path. Bact.*, 78: 471, 1959.
- 87 — GUIMARAES, J. P. — Lamerton, L. F. e CHRISTENSEN, W. R. — The late effects of thorotrast administration. A review and an experimental study. *Brit. J. Cancer*, 9: 253, 1955.
- 88 — GUIMARAES, J. P., LAMERTON, L. F. — Further observations on the late effects of thorotrast administration. *Brit. J. Cancer*, 9: 527, 1956.
- 89 — GUIMARAES, J. P. — Estudo citomorfológico dos efeitos do ouro radioativo (Au^{198}) sobre o parênquima hepático. *O Hospital*, 63: 201, 1963.
- 90 — HAREL, J., GUERIN, M., TUBIANA, J. e ABBATUCCI, J. — Production des tumeurs malignes (hepatomes et autres) par injections Intraperitoniales d'or radioactif chez le rat blanc. *Bulletin F.p. etude du cancer*, 43: 423, 1956.
- 91 — CHRISTIE, G. S. e LE PAGE, R. N. — Enlargement of liver cell nuclei: effect of dimethylnitrosamine on size and desoxyribose nucleic acid content. *Lab. Investigat.* 10: 729, 1961.
- 92 — ALFERT, M., GESCHWIND, L. I. — The development of polysomaty in rat liver. *Exptl. Cell Res.*, 15: 230, 1958.
- 93 — DISTEFANO, H. S. e DIERMEIER, H. F. — Effects of hypophysectomy and growth hormone on ploidy distribution and mitotic activity of rat liver. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 92: 590, 1956.
- 94 — CARRIÈRE, R., LEBLOND, C. P. e MESSIER, B. — Increase in the size of liver cell nuclei before mitosis. *Exptl. Cell. Res.*, 23: 625, 1961.
- 95 — HIMES, M., HOFFMAN, N. J., POLLISTER, A. W. e POST, J. — Origins of popyploid nuclei in rat liver during regeneration following carbon tetrachloride poisoning. *J. Mt. Sinai Hosp.*, 24: 935, 1957.
- 96 — GESCHWIND, II., ALFERT, M. e SCHOOLEY, C. — Liver regeneration and hepatic polyploidy in the hypophysectomized rat. *Exptl. Cell. Res.*, 15: 232, 1958.
- 97 — SPAIN, J. D. — A histochemical study of glycogen alterations in the liver of rats following azo-dye administration. *Cancer Res.*, 17: 3, 1957.