

# HORMÔNIO DE CRESCIMENTO NA REGENERAÇÃO HEPÁTICA EM RATOS

## GROWTH HORMONE ON LIVER REGENERATION IN RATS

Maria de Lourdes Pessole Biondo-Simões, TCBC-PR<sup>1</sup>

Monica Pante<sup>2</sup>

Rodrigo Ferreira Garcia<sup>2</sup>

Vanessa Lara de Macedo<sup>2</sup>

Thaís Helena Caregnatto de Morais<sup>2</sup>

Patricia Boell<sup>2</sup>

**RESUMO:** Muitas substâncias têm sido utilizadas após hepatectomias parciais com o fim de se saber como elas atuam no processo de regeneração. Entre elas encontra-se o hormônio de crescimento. Visando conhecer a influência deste hormônio, 50 ratos Wistar, machos, com idade de 170 dias e peso médio de 380g, foram divididos em dois grupos de 25 animais, respectivamente experimento e controle. Sob anestesia inalatória de éter etílico sofreram laparotomia mediana e hepatectomia de aproximadamente 70%, ressecando-se os lobos mediano e lateral esquerdo que eram pesados e em seguida fazia-se a laparorráfia. Os ratos do grupo experimento receberam hormônio de crescimento através de injeção diária, subcutânea, de 0,4U/kg num volume de 0,12 ml. Os animais do controle receberam igual volume de água destilada pela mesma via. Sacrificados em lotes de cinco animais de cada grupo com 36, 72, 168, 240 e 336 horas. Avaliava-se o peso do animal e o peso total do fígado. Através da fórmula de Kwon *et al.* a regeneração hepática foi calculada. No estudo microscópico conhecia-se as figuras de mitose em 20 campos. O percentual de regeneração do peso da víscera mostrou-se maior no grupo tratado com hormônio de crescimento nas aferições de 168h ( $p = 0,011$ ), 240 h ( $p = 0,011$ ) e 336h ( $p < 0,0001$ ). Nos animais do grupo experimento a regeneração foi completa a partir de 168h enquanto que no controle não atingira 100% com 336h. As figuras de mitose estiveram presentes no grupo experimento até 240h sendo significativamente maior no grupo experimento nas aferições de 36h ( $p < 0,001$ ) e 72h ( $p < 0,01$ ). Concluiu-se que o hormônio de crescimento leva à regeneração mais rápida do fígado após hepatectomia, em ratos.

**Unitermos:** Fígado; Regeneração hepática; Hormônio de crescimento.

## INTRODUÇÃO

O hepatócito é uma célula de natureza epitelial altamente diferenciada e classificada como estável porque possui baixa taxa de duplicação. Em ratos, somente um hepatócito, entre cerca de vinte mil, pode estar se duplicando a qualquer momento. Contudo, sua capacidade de replicação, como acontece com as demais células estáveis, pode aumentar quando estimulada.<sup>1</sup>

Hepatócitos podem ser induzidos a sintetizar DNA e a se duplicar após hepatectomias parciais ou adminis-

tração de agentes hepatotóxicos como o tetracloreto de carbono.<sup>2</sup>

Lindroos *et al.* estudaram o efeito do fator de crescimento dos hepatócitos (HGF) em ratos hepatectomizados e em ratos tratados com tetracloreto de carbono e constataram que o HGF estava envolvido com a estimulação da regeneração hepática nestes animais, sendo um potente estimulador da síntese de DNA dos hepatócitos em ratos adultos.<sup>2</sup>

Ratos hipofisectomizados e submetidos à hepatectomia têm a regeneração do órgão diminuída, demonstran-

1. Professora Titular de Experimentação em Clínica e Cirurgia da FEMPAR, Professora Coordenadora da Disciplina de Técnica Cirúrgica e Cirurgia Experimental da UFPR e Professora Adjunta de Técnica Operatória e Cirurgia Experimental da PUC-PR. Doutora em Cirurgia Experimental pela Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina.
2. Alunos do Curso Médico da FEMPAR.

Recebido em 25/5/99

Aceito para publicação em 1/2/2000

Trabalho realizado na Disciplina de Experimentação em Clínica e Cirurgia da Faculdade Evangélica de Medicina do Paraná (FEMPAR)

do a importância do hormônio de crescimento.<sup>3,4</sup> Asakawa *et al.* (1989) e Ekberg *et al.* (1992) observaram que a administração de hormônio de crescimento após hepatectomia promove aumento do HGF.<sup>5,6</sup>

O presente trabalho tem por objetivo conhecer a influência do hormônio de crescimento sobre a regeneração hepática em ratos.

## MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo obedeceu às normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Utilizaram-se 50 ratos machos (*Rattus norvegicus albinus*, *Rodentia mammalia*), Wistar-TECPAR, procedentes do biotério do Instituto Tecnológico do Paraná, com idade de 170 dias e peso médio de 380 g divididos, aleatoriamente, em dois grupos de 25 animais, C e E, respectivamente controle e experimento.

Albergados no biotério da Faculdade Evangélica de Medicina do Paraná e mantidos em ciclo circadiano claro/escuro, umidade e temperatura naturais do ambiente, os ratos tinham livre acesso à ração própria para a espécie e à água.

Sob anestesia inalatória de éter etílico, depilados e degermados com polivinilpirrolidona-iodo realizou-se laparotomia mediana, de aproximadamente 5 cm de extensão. Localizou-se o fígado e em seguida fez-se ressecção do *ligamentum teres hepatis*. Seguiu-se a ligadura do lobo mediano, com fio algodão 4.0 e posterior ressecção do mesmo. Na seqüência realizou-se o mesmo procedimento para o lobo lateral esquerdo, resultando em hepatectomia de aproximadamente 70%, conforme descrito por Higgins & Andersson (1931).<sup>7</sup> Pesaram-se os lobos que foram ressecados e em seguida fez-se a laparotomia com dois planos de sutura, o primeiro peritônio-músculo-aponeurótico e segundo, o da pele com chuleio contínuo simples de fio monofilamentar de náilon 4.0.

O grupo E recebeu hormônio de crescimento através de injeção diária, subcutânea, de 0,4U/kg em um volume de 0,12 ml. Os animais do grupo C receberam igual volume de água destilada pela mesma via, tendo-se iniciado a medicação imediatamente após o término da operação.

Lotes de cinco animais de cada grupo foram mortos, mediante dose inalatória letal de éter etílico, após 36, 72, 168, 240 e 336 horas. Fez-se nova aferição do peso dos animais, realizou-se relaparotomia mediana e ressecção total do fígado. Obteve-se o peso final da víscera e fixou-se com formalina 10%. Confeccionaram-se lâminas com cortes de 4 micrômetros de espessura, utilizando-se as colorações de hematoxilina-eosina e Feulgen. Na análise histopatológica avaliava-se: a arquitetura hepática, sinais de regeneração ductal, composição dos espaços-porta, tamanho e número de núcleos dos hepatócitos e figuras de mitose. Estas foram contadas em 20 campos.

Realizou-se documentação fotográfica dos aspectos relevantes da macro e da microscopia.

Para cálculo da regeneração do volume hepático utilizou-se a fórmula de Kwon *et al.* (1990)<sup>8</sup> onde o % de regeneração =  $D/E \times 100$  ( $E=R/0,7$ ), sendo: D = peso do fígado por 100g de peso no dia do sacrifício; e E = peso estimado do fígado por 100g no dia da hepatectomia, obtido do peso do fígado ressecado (R).

Aplicaram-se os testes paramétrico “t” de Student para amostras independentes, através do “software Primer of Biostatistics” para o percentual da regeneração e o não paramétrico Mann Whitney para as figuras de mitose. O nível de significância mínima adotada foi de 5%.

## RESULTADOS

Ocorreu o óbito de dois animais por acidente anestésico, restando 48 ratos para análise.

Constatou-se perda de peso nos animais dos dois grupos nos cinco tempos de aferição, sem diferenças significantes.

A análise macroscópica das vísceras ressecadas após o experimento revelou hipertrofia importante em ambos os grupos nas primeiras 36 horas. Após esse tempo o volume hepático permaneceu, até o término da pesquisa, sem alteração. A consistência apresentou-se firme e elástica e a coloração visceral evoluiu de vermelho-pardacenta a vermelho-escuro, sendo que no grupo experimento evidenciou-se uma superfície granular mais grosseira. A taxa de regeneração calculada pela fórmula de Kwon *et al.* (1990), comparando-se o grupo-controle com o grupo-experimento, mostrou que o grupo-experimento apresentou maior percentual de regeneração, principalmente a partir das 168 horas (Quadro 1).

De acordo com o protocolo elaborado para a análise microscópica dos cortes histológicos pode-se observar que a arquitetura hepática era semelhante ao padrão normal. A observação dos espaços-porta mostrou não haver alterações nos vasos arteriais e venosos, porém os ductos apresentaram algum grau de regeneração. Verificou-se um importante nível de hipertrofia dos hepatócitos, tanto no grupo controle quanto no experimento.

Quanto à atividade nuclear, observou-se binucleação nos cortes histológicos de todos os animais de ambos os grupos. O volume nuclear mostrou-se aumentado na maioria dos hepatócitos e o DNA nuclear apresentou comportamento variado: ora normal, ora aumentado entre os grupos E e C.

Quando se contaram as figuras de mitose constatou-se que o grupo E apresentou figuras de mitose até a 240<sup>a</sup> hora; sendo significativas, nas primeiras 36 horas ( $p<0,001$ ) e 72 horas ( $p<0,01$ ) (Quadro 1). Nas Figuras 1 e 2 pode-se ver figuras de mitose em cortes histológicos de fígados dos grupos-controle e experimento.

As leituras dos cortes histológicos foram realizadas pelo Professor Doutor Luiz Martins Colaço, Professor Titular das Disciplinas de Histologia e Anatomia Patológica da Faculdade Evangélica de Medicina do Paraná.

**Quadro 1**

Percentual de regeneração hepática e figuras de mitose nos grupos controle e experimento

Dados	Regeneração (%)		Figuras de mitose	
	Média	Desvio Padrão	Total	Proporção
<b>Experimento</b>				
36 h	92,96	11,73	145	29,0
72 h	92,92	16,19	14	3,5
168 h	113,23	8,33	03	1,5
240 h	122,52	13,51	02	2,0
336 h	142,19	11,58	-	-
<b>Controle</b>				
36 h	89,60	4,06	30	6,0
72 h	79,64	3,53	03	1,5
168 h	97,36	6,65	-	-
240 h	98,57	8,97	-	-
336 h	98,45	8,12	-	-

Comparação da taxa de regeneração entre os grupos, nas diferentes horas, através do teste “t de Student”

36 h – p = 0,562

72 h – p = 0,111

168 h – p = 0,011\*

240 h – p = 0,011\*

336 h – p < 0,0001\*

Comparação do índice de mitose entre os grupos, nas diferentes horas, através do teste do Qui-quadrado

36 h – p < 0,00\*

72 h – p < 0,01\*

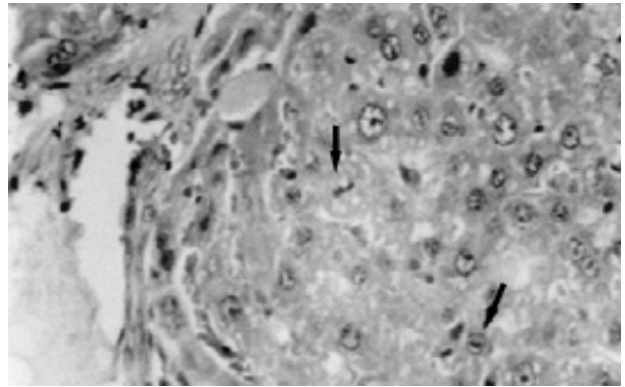
## DISCUSSÃO

As hepatectomias têm sido prática comum, especialmente para tratamento de traumas e metástases hepáticas.

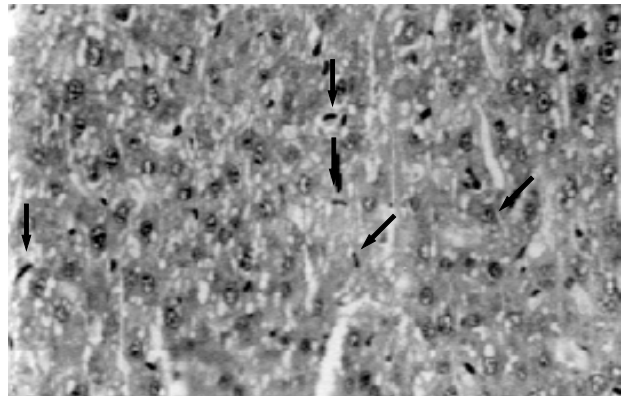
Os hepatócitos são classificados, quanto à sua capacidade de replicação, como células estáveis, isto é, apresentam baixa taxa de duplicação, contudo podem apresentar aumento desta capacidade após hepatectomias.<sup>7</sup> Essa mudança de comportamento parece ser influenciada pelo hormônio de crescimento, uma vez que ratos hipofisectomizados apresentam baixa regeneração hepática.<sup>4</sup>

A hepatectomia à 70%, em ratos, foi estabelecida por Higgins. Ressecções maiores são incompatíveis com a sobrevivência do animal. A ressecção desse percentual, neste experimento, mostrou-se viável, uma vez que não se observou morte relacionada com a técnica.<sup>7</sup>

Moolten *et al* e Ekberg *et al* demonstraram que a administração de hormônio de crescimento (GH) ou de fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-I) aceleram a síntese de DNA, e Baruch *et al* concluíram que na regeneração hepática a taxa de hormônio de crescimento ligado à proteína está aumentada.<sup>3,6,9</sup> Asakawa *et al* verificaram que a injeção deste hormônio não só acelera a regeneração após as ressecções como auxilia na recuperação das disfunções hepáticas em ratos.<sup>5</sup>



**Figura 1** – Fotomicrografia de corte histológico de fígado de rato do grupo-controle com 36 horas de evolução, mostrando figuras de mitose ( ). ↓



**Figura 2** – Fotomicrografia de corte histológico de fígado de rato do grupo-experimento com 36 horas de evolução, comprovando superior número de figuras de mitose ( ). ↓

Sakamoto *et al.* observaram que, em ratos adrenalectomizados, a oferta de hormônio de crescimento produz elevação da taxa de precursores do DNA nos hepatócitos em regeneração.<sup>10</sup>

Neste experimento pode-se observar regeneração hepática tanto no grupo-controle como no grupo-experimento. Contudo, a administração do hormônio de crescimento levou à aceleração do processo de regeneração, pois se evidenciou aumento da taxa de duplicação celular traduzida pela elevação do número de mitoses nas 36 e 72 horas, como descrito por Leffert, em 1988 Ramalho *et al*<sup>11</sup> e pelo aumento do volume da víscera a partir de 168 horas.

Após análise comparativa dos resultados obtidos entre os grupos conclui-se que, considerando a maior taxa de regeneração do volume visceral, principalmente a partir de 168 horas e o maior número de figuras de mitose nas primeiras 36 e 72 horas no grupo-experimento, o hormônio de crescimento foi responsável pela aceleração do processo regenerativo hepático nas condições estudadas.

**ABSTRACT**

Many substances have been used after partial hepatectomy in order to determine their effect on the regeneration process. One of them is growth hormone. We divided 50 male Wistar rats aged 170 days and weighing on average 380g into two groups of 25 animals each (experimental and control groups) to determine the effect of this growth hormone. The animals were anesthetized with ethyl ether and submitted to median laparotomy and a 70% hepatectomy, by median and left lateral lobes resection. The removed lobes were weighed and the abdomen closed. The rats in the experimental group received growth hormone by daily subcutaneous injection of a 0,4 U/Kg dose, in a volume of 0,12 ml. Control animals received an equal volume of distilled water, injected by the same route. Five animals from each groups were then sacrificed after 36, 72, 168, 240 and 336 hours, and the weight of each animal and of the liver was determined. Hepatic regeneration was calculated by the formula of Kwon *et al.* and mitotic figures observed in 20 histological fields by light microscopy. Percentage weight of the regenerated liver was higher in the animals treated with growth hormone at 168 h ( $p=0,011$ ), 250 h ( $p=0,011$ ) and 336 ( $p<0,0001$ ). In the experimental group, regeneration was complete starting at 168 h, whereas in controls did not reached 100% after 336 h. Mitotic figures were present in the experimental group up to 240 hs, and were present in significantly higher numbers in the experimental group at 36 h ( $p<0,001$ ) and 72 h ( $p<0,01$ ). We conclude that growth hormone leads to a more rapid regeneration of the liver after hepatectomy in rats.

**Key Words:** Liver. Hepatic regeneration. Growth hormone.

**REFERÊNCIAS**

1. Fausto N – New perspectives on liver regeneration. *Hepatology* 1986; 6:326-7.
2. Lindroos PM, Zarnegar R, Michalopoulos – Hepatocyte growth factor (hepatopoietin A) rapidly increases in plasma before DNA synthesis and liver regeneration stimulated by partial hepatectomy and carbon tetrachloride administration. *Hepatology* 1991; 13:743-50.
3. Moolten FL, Oakman N J, Bucher NLR – Accelerated response of hepatic DNA synthesis to partial hepatectomy in rats pretreated with growth hormone or surgical stress. *Cancer Res.* 1970; 30:2353-7.
4. Untermann TG, Phillips LS – Circulating somatomedin activity during hepatic regeneration. *Endocrinology* 1986; 119:185-92.
5. Asakawa K, Hizuka N, Takano K *et al.* – Human growth hormone stimulates liver regeneration in rats. *J. Endocrinol Invest.* 1989; 12:343-7.
6. Ekberg S, Luther M, Nakamura T, Jansson JO – Growth hormone promotes early of hepatocyte growth factor gene expression in the liver of hypophysectomized rats after partial hepatectomy. *J. Endocrinol.* 1992; 135:59-67.
7. Higgins GM, Anderson RM – Experimental pathology of the liver: I Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch. Pathol.* 1931; 12:186-202.
8. Kwon H, Uetsuji S, Yamamura M, *et al.* – Effect of administration of fibronectin or aprotinin on liver regeneration after experimental hepatectomy. *Ann. Surg.* 1990; 211:295-300.
9. Baruch Y, Amit T, Hertz P *et al.* – Growth hormone-binding. Protein in partially hepatectomized rats. *Horm. Res.* 1993; 40:173-7.
10. Sakamoto Y, Jehn D, Nicolson M *et al.* – Acceleration of hepatic regeneration with prior stress and growth hormone. *J. Surg. Res.* 1979; 27:50-6.
11. Ramalho FS, Ramalho LNZ, Zucoloto S *et al.* – Regeneração hepática : algumas definições num universo de incertezas. *Acta Cir. Bras.* 1993; 8:177-189.

**ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA**

Dra. Maria de Lourdes P. Biondo-Simões  
Rua Ari José Valle, 1987  
82030-000 – Curitiba PR