

## ANÁLISE HISTOMORFOLÓGICA DO FÍGADO DE RATAS E DE SEUS FETOS EXPOSTOS AO ÁLCOOL DURANTE A GESTAÇÃO

### HISTOMORPHOLOGICAL ANALYSIS OF LIVERS OF RATS AND THEIR FETUSES EXPOSED TO ALCOHOL DURING PREGNANCY

Ariane Melaré Ramos dos Santos<sup>1</sup>, Cléber de Moraes Motta<sup>1</sup>, Elen Cristiane Augusto de Souza<sup>1</sup>, Suzana Guimarães de Moraes<sup>2</sup>

#### RESUMO

**Objetivos:** o presente trabalho teve como objetivo relacionar o uso de álcool durante a prenhez às alterações morfológicas hepáticas, tanto na mãe, quanto nos fetos, através da análise microscópica de cortes histológicos por técnicas rotineiras. **Métodos:** foram utilizadas 15 ratas Wistar prenhes divididas em três grupos de números iguais: Álcool, Água e Controle. Foram administrados álcool etílico e água destilada às fêmeas dos grupos Álcool e Água, respectivamente, nos 7º, 8º e 9º dias de gestação. No momento da coleta dos fetos, estes foram medidos e pesados; em seguida, os fígados destes e de suas mães foram processados e analisados em lâminas com método de coloração de Hematoxilina e Eosina, para ambos, e Tricômio de Masson, para a mãe. **Resultados:** não houve diferença estatisticamente significativa no número de fetos e no número de megacariócitos entre os três grupos ( $p > 0,05$ ). Entretanto, com relação ao peso fetal, as comparações Controle versus Água e Água versus Álcool diferiram significativamente ( $p < 0,001$ ). Além disso, notou-se significância nas comparações entre os comprimentos crânio-caudais fetais dos grupos Controle versus Álcool ( $p < 0,05$ ). Com a análise qualitativa dos fígados das mães, observou-se a presença de infiltrado inflamatório, padrão normal dos cordões de hepatócitos, da tríade portal e da distribuição das fibras de colágeno e ausência de esteatose nos três grupos estudados. **CONCLUSÕES:** O álcool é reconhecidamente um agente teratogênico, no entanto, neste estudo a dose utilizada e o tempo de exposição a este agente não foram suficientes para gerar alterações morfológicas nos fígados dos fetos e das mães, resultando apenas em comprometimento dos parâmetros morfométricos fetais (peso e comprimento crânio-caudal).

**Descritores:** etanol, alcoolismo, gravidez, fígado, feto, animais, ratos.

#### ABSTRACT

**Purpose:** this study aimed at correlating the use of alcohol during pregnancy with hepatic morphological changes, both in the mother as in fetuses, through microscopic analysis of histological sections by routine techniques. **Methods:** 15 pregnant Wistar rats were divided in three equally numbered groups: Alcohol, Water and Control. It was administered ethyl alcohol and distilled water to females of Alcohol and Water groups, respectively, on the 7th, 8th and 9th days of gestation. At the time of collection of fetuses, they were measured and weighed, and then their and their mothers' livers were processed and analyzed on slides using hematoxylin and eosin staining for both, and Masson Trichrome for the mother. **Results:** no statistically significant difference was found regarding the number of fetuses and the number of megakaryocytes in the three groups ( $p > 0.05$ ). However, concerning fetal weight, the comparisons between Water versus Control and Water versus Alcohol showed significant differences ( $p < 0.001$ ).

Furthermore, the comparisons between the fetal craniocaudal length of Alcohol versus Control groups ( $p < 0.05$ ) were significantly different. Using the qualitative analysis of the livers of the mothers, we observed the presence of inflammatory infiltrate, normal pattern of hepatocytes cords, portal triad and distribution of collagen fibers besides absence of steatosis in all three groups. **Conclusions:** alcohol is a known teratogenic agent, however in this study its dosage and duration of exposure was not enough to generate morphological changes in the fetuses' and their mothers' livers, resulting only in impairment of fetal morphometric parameters (weight and craniocaudal length).

**Key-words:** ethanol, alcoholism, pregnancy, liver, fetus, animals, rats.

#### INTRODUÇÃO

Define-se alcoolismo como uma síndrome multifatorial com comprometimento físico, mental e social. Estima-se que mais de dois terços das pessoas em países ocidentais bebem além do que apenas ocasionalmente. Estudos apontam que nos Estados Unidos aproximadamente 10% das mulheres e 20% dos homens preenchem critérios diagnósticos para abuso do álcool, e 3% a 5% das mulheres e 10% dos homens preenchem critérios para dependência ao longo da vida.<sup>1</sup>

O alcoolismo é um problema de abuso de droga que afeta 1 a 2% das mulheres em idade fértil. O consumo de álcool, tanto moderado como alto, durante o início da gravidez, pode ocasionar alterações do crescimento e do desenvolvimento morfológico do feto, sendo considerado, atualmente, como um problema de saúde pública.<sup>2</sup> Apesar de gerar um grande custo social, ainda há carência de estudos epidemiológicos sobre efeitos do álcool sobre o feto no Brasil.<sup>1</sup>

A metabolização do etanol é feita principalmente no fígado e se inicia imediatamente após a ingestão. O fígado, por ser considerado o principal órgão responsável pela biotransformação de drogas, pode estar funcionalmente ou estruturalmente alterado em alcoolistas crônicos e cada alteração pode, ou não, ser seguida de manifestações clínicas e anormalidades laboratoriais.<sup>4</sup> Dentre as patologias que acometem o órgão, podem-se citar a esteatose hepática, hepatite tóxica ou alcoólica e cirrose hepática.<sup>5</sup>

A esteatose hepática é caracterizada por depósito de pequenas gotículas lipídicas nos hepatócitos. Na hepatite alcoólica, ocorrem outras lesões como infiltrados leucocitários, corpos de Mallory e necrose tecidual.

Rev. Fac. Ciênc. Méd. Sorocaba, v. 12, n. 4, p. 10 - 14, 2010

1. Acadêmico (a) do curso de Medicina - FCMS/PUC-SP

2. Professora do Depto. de Morfologia e Patologia - FCMS/PUC-SP

Recebido em 13/7/2010. Aceito para publicação em 17/8/2010.

Contato: arianemelare@yahoo.com.br

A forma final e irreversível é a cirrose, caracterizada pela presença de extensas áreas de fibrose e desorganização da arquitetura lobular.<sup>5,6</sup>

Devido a seu pequeno tamanho e suas propriedades de dissociação e polarização, o álcool é solúvel em água e relativamente solúvel em solventes não polares. Por esta razão, pode atravessar as membranas celulares e se difundir por todos os líquidos e tecidos do organismo.<sup>3</sup> Dessa forma, atravessa livremente a barreira placentária e se distribui pelo líquido amniótico, atingindo os tecidos do feto. Os níveis sanguíneos materno e fetal são aproximadamente iguais após a ingestão materna de álcool. A difusão passiva do álcool ocorre por gradiente de concentração de tal maneira que os níveis materno e fetal são similares até que todo o etanol seja metabolizado.

O etanol induz a formação de radicais livres de oxigênio que são capazes de danificar proteínas e lipídeos celulares, aumentando a apoptose e prejudicando a organogênese. Também inibe a síntese de ácido retinoico, que é uma substância reguladora do desenvolvimento embrionário. Tanto o etanol quanto o acetaldeído têm efeitos diretos sobre vários fatores de crescimento celular, inibindo a proliferação de certos tecidos.<sup>7</sup>

Os efeitos teratogênicos do álcool são reconhecidos desde a antiguidade e, com o transcorrer da história, houve um evidente aumento da incidência de abortos, natimortos e malformações congênitas em recém-nascidos de mães alcoolistas.<sup>3,8,9</sup> Há uma associação bem documentada entre a ingestão materna de álcool e o desenvolvimento da Síndrome Alcoólica Fetal (SAF), que é caracterizada por déficit de crescimento, dismorfismo facial e evidência de anormalidades do sistema nervoso central.<sup>10-14</sup>

No Brasil, existem poucos dados sobre a incidência de efeitos teratogênicos do álcool. Estima-se a incidência de alcoolismo materno em 6/1.000 gestantes e a incidência de SAF em 1/1.000 recém-nascidos (RNs). No entanto, calcula-se que um quarto das grávidas deste país faça uso esporádico de bebida alcoólica.<sup>7</sup>

No feto, o fígado surge no início da quarta semana e a quantidade de sangue oxigenado que flui da veia umbilical é o que determina o seu desenvolvimento e sua segmentação funcional. A hematopoese começa durante a sexta semana, e na nona semana, o órgão responde por cerca de 10% do peso total do feto.<sup>15</sup> Além disso, este órgão, também, é responsável pela eficácia do sistema hematopoiético, tendo como um de seus principais objetivos produzir adequado número de células funcionais do repertório imune. Células hematopoiéticas devem ser capazes de se desenvolver, proliferar e migrar do fígado hematopoiético fetal para outros tecidos do corpo como timo e medula óssea. Há evidências que o consumo de etanol causa imunodeficiência em adultos e que o consumo materno de etanol causa imunodeficiência em crianças, ambas relacionadas aos efeitos nas células e reguladores de citocinas.<sup>16</sup>

No fígado fetal que foi exposto ao álcool durante a gestação, sabe-se que as deformidades características são similares às encontradas na doença hepática no adulto. Os aspectos comumente vistos no adulto são hepatomegalia e aumento das transaminases séricas.

A microscopia óptica revela aumento da gordura parenquimatosa com fibrose portal e perisinusoidal.<sup>17</sup> Contudo, pouco foi estudado sobre essas alterações morfológicas em fígado de fetos de mães alcoolistas. Portanto, o presente estudo fez-se necessário para investigar, em modelos animais

(roedores), possíveis modificações decorrentes do uso do álcool durante a gestação.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### 1. Animais

Neste estudo foram utilizados ratos Wistar provenientes do biotério Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde de Sorocaba (PUC-SP). Os animais de ambos os sexos, de cerca de três a cinco meses de idade, foram acondicionados em gaiolas mantidas em ambiente de temperatura controlada ( $25 \pm 2$  °C) e expostos à luz por um período diário de 12 horas (7:00 - 19:00 h). Os animais tiveram acesso *ad libitum* à água e ração comercial.

As fêmeas foram colocadas junto aos machos da mesma linhagem e a cada manhã foi observada a presença de espermatozoides em esfregaço vaginal. Neste caso, este dia foi considerado o 1º dia de prenhez.

As fêmeas prenhes foram divididas em três grupos de estudo ( $n = 5/\text{grupo}$ ) descritos a seguir:

- Grupo 1 (Álcool): administração diária de álcool etílico absoluto P.A. 3 g/Kg de peso corporal em água destilada, via oral, através de gavagem intragástrica; volume final igual a 3,8ml, nos 7º, 8º e 9º dias de gestação;
- Grupo 2 (Água): administração diária de água destilada, via oral, através de gavagem intragástrica; volume final igual a 3,8ml, nos 7º, 8º e 9º dias de gestação;
- Grupo 3 (Controle): não recebeu nenhuma solução.

### 2. Análise das ratas prenhes

As ratas prenhes foram sacrificadas através de uma dose letal de cetamina e xilazina no 21º dia de gestação. O útero foi dissecado e transferido para uma placa de vidro contendo soro fisiológico. Então tiveram seus fígados dissecados e imersos em solução fixadora.

### 3. Análise dos fetos

O conteúdo uterino foi avaliado, contabilizando-se o número de fetos. Os fetos íntegros foram pesados e o comprimento crânio-caudal medido, avaliando assim a possibilidade de restrição de crescimento intrauterino. Em seguida os fetos foram dissecados e seus fígados coletados e imersos em solução fixadora.

### 4. Processamento, análise e documentação dos fígados em microscopia óptica

Os fígados das ratas e dos fetos foram processados convencionalmente, ou seja, após a fixação, as amostras foram lavadas em água destilada, desidratadas em série crescente de etanol, diafanizadas e embebidas em parafina (Histosec-Merck).

Os preparados foram seccionados com navalhas descartáveis em micrótomo Leica RM 2245 a uma espessura de 4µm. Prosseguindo-se com a coloração por Hematoxilina de Harris e Eosina (HE) e Tricômico de Masson. Os cortes histológicos foram analisados e documentados em microscópio óptico Nikon Eclipse E800.

### 5. Análise dos resultados

Os dados obtidos foram tabulados, analisados e apresentados em gráficos e tabelas. A captura das imagens foi realizada por meio de um programa de análise de imagens (software Image ProLite).

Contabilizou-se o número de megacariócitos (aumento de 40X) de cinco campos aleatórios por lâmina de cada subgrupo nos fetos, além da análise das lâminas de todas as ratas.

As medidas obtidas foram submetidas ao estudo estatístico utilizando-se os testes ANOVA e TUKEY'S MULTIPLE COMPARISON TEST, com nível de rejeição para hipótese de nulidade fixada em 5% ( $p < 0,05$ ), com o auxílio do software PRISMA 2.0.

## RESULTADOS

Nos testes One-way ANOVA e TUKEY, os fetos dos grupos Álcool, Água e Controle foram comparados entre si para as variáveis peso (tabela 1) e comprimento crânio-caudal (tabela 2).

A diferença do peso dos fetos foi estatisticamente significativa entre os grupos Álcool, Água e Controle, com um  $p < 0,0001$ . No teste TUKEY para múltiplas comparações, identificou-se que Controle versus Água mostrou um  $p < 0,001$ ;

Controle versus Álcool, um  $p > 0,05$ ; e Água versus Álcool, um  $p < 0,001$ .

Ao se comparar o comprimento crânio-caudal dos grupos no teste TUKEY, notou-se que Controle versus Água e Água versus Álcool apresentaram  $p > 0,05$ . Contudo, a comparação entre Controle versus Álcool indicou  $p < 0,05$ , afirmando que houve diferença estatisticamente significativa nesta última. Em relação à contagem dos megacariócitos dos grupos estudados, não houve variações estatísticas significativas ( $p > 0,05$ ), conforme apresentado na figura 1.

Foi realizada ainda a análise qualitativa das lâminas dos fígados das ratas, à procura de alterações histológicas tais como fibrose, esteatose, infiltrado inflamatório e desorganização dos cordões de hepatócitos. Através desta análise foi observado infiltrado inflamatório em todos os grupos (figura 2 A e B), não havendo distinção entre eles. Todavia, a fibrose não foi observada em nenhum dos grupos, encontrando-se um padrão normal de distribuição de fibras de colágeno nos espaços porta (figura 3).

Tabela 1. Estudo comparativo do peso fetal

Grupos	Peso					Análise Estatística	
	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Mediana	Máximo	p (ANOVA)	Tukey's Test
Controle	2,6551	0,36	1,7863	2,6551	3,4530	$p < 0,0001$	Controle vs Água $p < 0,001$
Água	2,3837	0,38	1,5211	2,3837	3,2328		Controle vs Álcool $p > 0,05$
Álcool	2,6889	0,21	2,1626	2,6889	3,1747		Água vs Álcool $p < 0,001$

Tabela 2. Estudo comparativo do comprimento crânio-caudal dos fetos

Grupos	Comprimento crânio-caudal (cm)					Análise Estatística	
	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Mediana	Máximo	p (ANOVA)	Tukey's Test
Controle	4.20	0.24	3.70	4.25	4.70	0.0237	Controle vs Água $p > 0.05$
Água	4.18	0.34	3.20	4.15	4.80		Controle vs Álcool $p < 0.05$
Álcool	4.13	0.31	3.60	4.10	4.70		Água vs Álcool $p > 0.05$

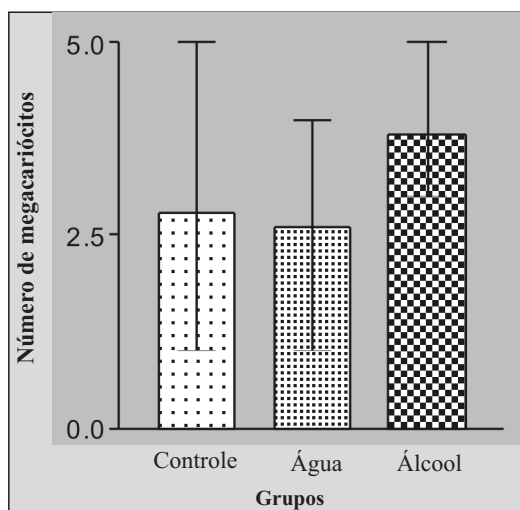
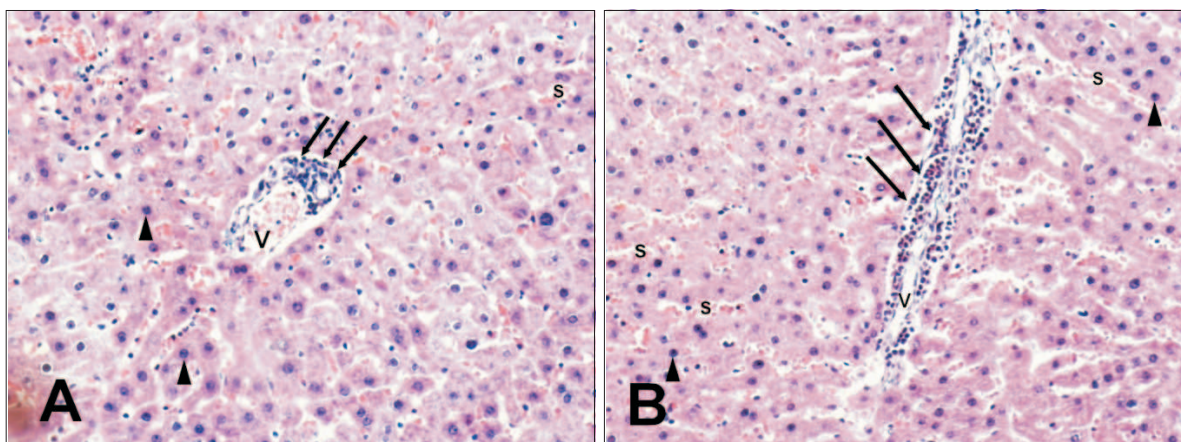


Figura 1. Número de megacariócitos nos três grupos experimentais



Figuras 2a e 2b. Notam-se nessas figuras a arquitetura normal do fígado das mães do grupo Álcool. Hepatócitos (cabeça de seta), sinusóides (S) e veias (V). Atente-se para infiltrado inflamatório em ambos os campos (setas). Coloração: HE. Aumento 20X.

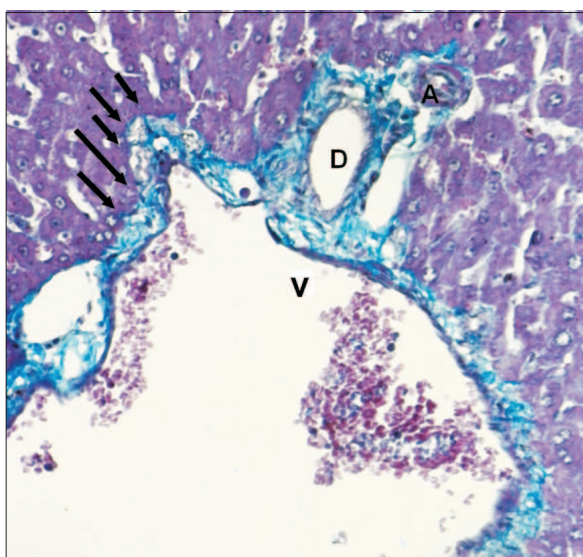


Figura 3. Nota-se o espaço portal composto pela veia (V), artéria (A) e ducto biliar (D). Atente-se para a distribuição normal das fibras de colágeno (setas) coradas em tricômio de Masson. Aumento 20X.

## DISCUSSÃO

Existem diversos estudos mostrando os efeitos do etanol em descendentes de ratas nas quais foi administrado álcool durante a gestação, claramente demonstrando a associação entre alcoolismo na gravidez e defeitos teratogênicos encontrados em fetos. A comparação entre os achados em descendentes humanos e murinos expostos ao etanol durante a vida uterina é bastante consistente e justifica a escolha de tais espécies para estudos animais de Síndrome Alcoólica Fetal.<sup>18</sup>

O álcool é reconhecidamente um agente teratogênico. No entanto, os resultados são frequentemente contraditórios devido à forte influência de cofatores, principalmente em pesquisas clínicas, como comportamento individual, cultura, tradição e condição socioeconômica. Desta forma, torna-se importante o estudo dos efeitos do álcool em condições controladas para se reconhecer a amplitude dos diferentes efeitos dessa substância sobre o organismo.<sup>19</sup>

Neste presente estudo, essa afirmativa tornou-se ainda mais verdadeira. Foram encontradas alterações tais como diferenças nos pesos e comprimentos dos fetos que não condizem com a literatura pesquisada.<sup>7,9,18,20,21</sup> Não foram encontradas diferenças estatísticas nos pesos entre os grupos Controle e Álcool ( $p > 0,05$ ), apenas um grau representativo de diferença entre os grupos Controle e Água e Água e Álcool ( $p < 0,001$  para ambos). Entretanto, o resultado apresentado para os grupos Controle e Água pode ter sido causado pelo estresse sofrido pelas ratas devido à sua manipulação, já que as mesmas foram expostas apenas à água destilada. Ademais, é importante salientar que talvez o n utilizado não tenha sido suficiente.

Contrariamente, a análise dos comprimentos crânio-caudais revelou que a comparação Controle versus Álcool foi estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ). Dessa forma, pode-se suspeitar que o déficit de crescimento intrauterino do grupo Álcool tenha sido causado pela exposição das ratas ao etanol.

Sabe-se que o fígado fetal é inicialmente um órgão hematopoiético.<sup>15,19,22</sup> Não foram encontradas alterações morfológicas microscópicas na estrutura do fígado fetal, contudo o valor total de megacariócitos no grupo Álcool foi maior do que o apresentado nos outros grupos.

O fígado materno não se mostrou alterado morfológicamente na análise das lâminas, com padrão normal de distribuição dos hepatócitos, fibras de colágeno e vasos. Além disso, não foi visualizada esteatose em nenhuma das lâminas. Contudo, foi observada a presença de infiltrado inflamatório em todos os grupos. Esta última alteração pode estar relacionada a fatores externos do próprio biotério ou da manipulação dos animais.

### CONCLUSÃO

No presente estudo foi observada diminuição estatisticamente significativa dos padrões de comprimento no grupo Álcool, contudo não foram encontradas modificações microscópicas na análise morfológica dos fígados, tanto das mães quanto dos fetos. No entanto, sabe-se que a suscetibilidade fetal ao álcool é modulada por quantidade ingerida, época da exposição, estado nutricional e capacidade de metabolização materna e fetal, o que tornam corriqueiras as limitações dos modelos experimentais deste assunto. Assim, é válido, neste estudo, ressaltar a possibilidade de que a dose de álcool etílico utilizada e os dias de administração escolhidos não foram suficientes para causar danos hepáticos significativos no modelo experimental utilizado.

### REFERÊNCIAS

- Bau CHD. Estado atual e perspectivas da genética e epidemiologia do alcoolismo. *Cienc Saúde Coletiva*. 2002; 7(1):183-90.
- Moore KL, Persaud TVN. *Embriologia clínica*. 5ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1994. p.194.
- Ribeiro EM, Gonzalez CH. Síndrome alcoólica fetal: revisão. *Pediatria (São Paulo)*. 1995; 17(1):47-56.
- Borini P, Guimarães RC, Borini SB. Histopathologic and biochemical liver test abnormalities in chronic asymptomatic or oligosymptomatic alcoholics: a review. *Rev Hosp Clin*. 2003; 58(3):147-56.
- Herrera Batista A, González Bravo M, Céspedes Miranda E, Sánchez González S. Efectos del alcoholismo crônico sobre el hígado de ratas albinas adolescentes. *Rev Cubana Invest Biomed*. 1999; 18(3):189-96.
- Crawford JM. Fígado e trato biliar. In: Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Robbins e Cotran: *Patologia – bases patológicas das doenças*. 7ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. p. 947-51.
- Freire TM, Machado JC, Melo EV, Melo DG. Efeitos do consumo de bebida alcoólica sobre o feto. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2005; 27(7):376-81.
- Kalter H. Teratology in the 20th century environmental causes of congenital malformations in humans and how they were established. In: Adams J. *Neurotoxicol Teratol*. 2003; 25(2):131-282.
- Bánhid F, Lowry RB, Czeizel AE. Risk and benefit of drug use during pregnancy. *Int J Med Sci*. 2005; 2(3):100-6.
- Sadler TW. *Langman: embriologia médica*. 9ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara e Koogan; 2005. p. 103.
- Mesquita MA. Síndrome alcoólica fetal. *Einstein*. 2003; 1:149.
- Loock C, Conry J, Cook JL, Chudley AE, Rosales T. Identifying fetal alcohol spectrum disorder in primary care. *CMAJ*. 2005; 1(5):172.
- Sulik KK. Genesis of alcohol-induced craniofacial dysmorphism. *Exp Biol Med*. 2005; 230:366-75.
- Grinfeld H, Segre CAM, Chadi G, Goldenberg S. O alcoolismo na gravidez e os efeitos na prole. *Rev Paul Pediatría*. 2000; 18(1):41-9.
- Moore KL, Persaud TVN. *Embriologia clínica*. 5ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1994. p. 229-230.
- Robinson RS, Seelig LL. Effects of maternal ethanol consumption on hematopoietic cells in rat fetal liver. *Alcohol*. 2002; 28(3):151-6.
- Chaudhuri JD. Alcohol and the developing fetus – a review. *Med Sci Monit*. 2000; 6(5):1031-41.
- Santos NSS, Biscaro MDA, Santos BCL, Moraes SG. Congenital malformations in embryos of female mice exposed to alcohol and nicotinamide. *Einstein*. 2009; 7(1):52-7.
- Veiga RKA, Melo Júnior MR, Araújo Filho JLS, Mello LA, Pontes Filho NT. Alterações morfométricas no timo, baço e placas de Peyer durante a exposição pré e pós-natal ao álcool. *Rev Eletrôn Farm*. 2007; 4(1):32-42.
- Fisher SE, Barnicle MA, Steis B, Holzman I, Van Thiel DH. Effects of acute ethanol exposure upon in vivo leucine uptake and protein synthesis in the fetal rat. *Pediatr Res*. 1981; 15:335-9.
- Pikkarainen PH, Rähkä NCR. Development of alcohol dehydrogenase activity in the human liver. *Pediatr Res*. 1967; 1:165-8.
- Morrison SJ, Hemmati HD, Wandycz AM, Weissman IL. The purification and characterization of fetal liver hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci*. 1995; 92:10302-6.