

Alterações no ambiente uterino por teratógenos e as consequentes complicações fetais¹

*Camila Nunes de Moraes Ribeiro*²

ÁREA: Medicina

De acordo com a maioria dos estudos, 2 a 3% dos recém nascidos mostram pelo menos uma anomalia congênita reconhecível. Esta porcentagem dobra quando são incluídas as anomalias diagnosticadas durante os primeiros anos de vida. Com o declínio da mortalidade infantil causada por doenças infecciosas e problemas de nutrição, as anomalias congênitas estão atualmente entre as maiores causas de mortalidade infantil (acima de 20%) e uma porcentagem cada vez maior da admissão de crianças nas unidades de neonatologia ou pediátrica (até 30%) pode ser atribuída a várias formas de doenças genéticas ou a defeitos congênitos.

As anomalias congênitas no Sistema Nervoso Central (SNC) são mais comuns do que em qualquer outro sistema, pois o desenvolvimento deste sistema se inicia em um estágio anterior na embriogênese, comparado aos outros sistemas. Conseqüentemente, o estabelecimento, a diferenciação, a formação, a segmentação, a organização e o desenvolvimento das várias estruturas do SNC

¹ Originalmente apresentada como tese de doutorado, Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 2006. **Associação de diabetes aloxânico e etanol na prole de camundongos Swiss**. Ribeirão Preto, SP.

² Mestre e Doutora em Patologia pela Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Contato: camilaribeiro@hotmail.com

são mais aptas a serem afetadas por diferentes distúrbios no desenvolvimento.

Alguns agentes ambientais, tais como o etanol, colesterol, ácido retinóico, hiperglicemia (causado pelo Diabetes Materno) períodos de hipóxia, radiação ionizante ou estresse hipertérmico, nicotina, quando administrados agudamente a animais experimentais prenhes, induzem anomalias craniofaciais estágio-dependentes comparáveis àquelas em síndromes causadas por teratógenos em humanos.

Crianças de mães diabéticas têm de 3 a 4 vezes mais chances de apresentarem anomalias congênitas do que a população geral. O controle glicêmico materno ineficiente é atribuído ao aumento dos riscos das malformações fetais em comparação àquelas que têm seu diabetes bem controlado.

As anomalias surgem precocemente, durante o desenvolvimento embrionário, antes mesmo de se reconhecer a gravidez, e normalmente são múltiplas e graves.

A embriopatia do diabetes engloba um vasto espectro de anomalias como defeitos do tubo neural, do coração, sistema urogenital, sistemas esquelético e digestório, e sequência da regressão caudal.

O etanol é um agente teratogênico envolvido com DFTN e defeitos craniofaciais, considerado mais controverso e seu consumo é comum no mundo inteiro. Muitas mulheres em idade reprodutiva consomem álcool muitas vezes não têm consciência de sua gravidez até chegarem à quarta semana de concepção.

Existem excelentes modelos animais que abrangem anomalias induzidas pelo etanol observadas em humanos, trazendo dados valiosos relacionados com tempos críticos de exposição e indícios referentes à patogênese. Quando administrado de forma aguda a camundongos C57Bl/6 durante estágio de gastrulação uma dose de etanol correspondente ao limite de tolerância humana,

observou-se indução de defeitos craniofaciais, como deficiências na face média e prosencéfalo.

Tratamento oral ou intraperitoneal com etanol no 7º ou 8º dia gestacional (correspondente à 3ª semana gestacional humana) causa uma variedade de anomalias craniofaciais incluindo exencefalia, hipoplasia maxilar e mandibular, estreitamento do focinho, redução no tamanho dos olhos e fendas palatinas e labiais. Também provoca redução de membros e defeitos digitais.

A reprodução de um modelo experimental da associação de diabetes gestacional (induzido por estreptozotocina) e etanol já foi feito anteriormente, utilizando camundongos fêmeas prenhes da linhagem TO. Neste estudo, foram aplicadas doses únicas de etanol no 7º e 8º dia gestacional. Os resultados mostraram que a exposição de animais diabéticos prenhes a doses agudas de etanol nesses estágios podem resultar em um aumento do número de reabsorções (mortes fetais precoces). O RCIU (retardo do crescimento intra-uterino) também foi acentuado, como o aparecimento de anomalias congênitas fetais.

A associação de diabetes materno e alcoolismo foi pouco explorada em modelos experimentais e por isso seria muito importante estabelecer como a associação destes dois fatores ambientais se comportava em relação a diversas anomalias. Este fato se reveste de importância ao se lembrar que o diabetes materno é muito comum e da banalidade do consumo de álcool em nosso meio, principalmente entre mulheres jovens em fase reprodutiva, podendo justificar pelo menos parte dos casos de anomalias fetais.

Desta forma, foi feito um experimento utilizando camundongos fêmeas da linhagem Swiss, e nestas foi injetada aloxana, uma droga que leva ao diabetes, por destruir células do pâncreas. Sua ação é conhecida por elevar muito a glicemia, e assim, foi simulado diabetes.

O próximo passo foi colocá-las para acasalar, e após o coito, foram separadas, pesadas diariamente e, no 7º dia gestacional (correspondente às primeiras 3 semanas gestacionais em humanos) foi injetada uma dose de etanol simulando cerca de 10 latas de cerveja, nos grupos etanol e diabetes associado ao etanol. Isso foi feito para colocarmos uma situação em que uma mulher nas primeiras semanas de gravidez, e talvez sem consciência desta, desenvolveu diabetes gestacional e consumiu álcool; e, em outra situação, em que uma pessoa saudável e grávida também o consumiu no mesmo período.

No final da gestação, foram feitas cirurgias nos animais (eutanásia em câmara de CO2 anterior), seus fetos foram retirados, limpos, pesados, medidos e fotografados. Foram feitas autópsias destes fetos e tecidos destes (e suas placentas) foram incluídos em parafina, para serem feitos cortes histológicos usados em estudos anátomo-patológicos.

O primeiro resultado interessante foi a resposta diferenciada à aloxana entre diferentes animais. Enquanto alguns apresentavam glicemias altíssimas, outros não se mostraram tão suscetíveis aos seus efeitos deletérios. Então, foram criados grupos diferentes para estes animais, para investigarmos se as glicemias mais altas poderiam ocasionar mais problemas do que aquelas não tão elevadas.

Os primeiros dados levados em consideração foram os números de fetos vivos e mortos (aqueles que morreram precocemente, no início da gestação e aqueles que entraram em óbito no período final). Não houve diferenças estatisticamente significante entre os grupos.

O próximo passo foi analisar a presença de possíveis malformações fetais macroscópicas. O grupo diabetes associado ao etanol (glicemias altas) apresentou vários animais com excencefalia, anencefalia, malformações faciais, posicionamento errôneo dos órgãos (situs inversus), sindactilia.

Em relação às alterações histológicas, foram observadas malformações vasculares, como hipoplasia da artéria pulmonar em um feto do grupo etanol.

Os resultados deste estudo também indicaram que a exposição de animais diabéticos com altas glicemias prenhes a uma dose aguda de etanol neste estágio pode causar retardo do crescimento intra-uterino além das malformações fetais, também presentes em fetos de matrizes diabética com glicemias menores.

Modelos animais suportam fortemente a premissas de que o dismorfismo facial característico da FAS (Síndrome Fetal Alcoólica) resulta de insultos que afetam harmoniosamente o prosencéfalo e os olhos. O dismorfismo varia largamente em termos de gravidade, com os defeitos mais sutis sendo difíceis de distinguir do normal.

Enquanto a macrossomia fetal é caracteristicamente atribuída ao diabetes materno, alguns estudos clínicos demonstraram que embriões de mães diabéticas têm seu crescimento retardado e a restrição precoce do crescimento é um fator de risco para anomalias .

O RCIU (retardo de crescimento intra-uterino) relacionado ao diabetes acentuado pelo tratamento com etanol nas matrizes, explica como uma condição metabólica alterada pode facilitar a ação deletéria de um outro teratógeno, no caso o etanol, nos embriões. Alguns estudos epidemiológicos foram capazes de encontrar somente um risco aumentado para anomalias sistêmicas maiores no diabetes materno sem um aumento acentuado na incidência total de anomalias e foi sugerido que o diabetes pode não ser um teratógeno primário e poderia agir primariamente providenciando um insulto inicial, potencializando os efeitos de outros teratógenos.

Neste experimento foi encontrada uma maior incidência de anomalias craniofaciais com anencefalia e exencefalia, mas não de anomalias mais graves como a holoprosencefalia, podendo este fato ter ocorrido pela perda de muitos embriões na forma de reabsorções ou mortes fetais precoces, uma vez que já se sabe que

em se tratando de teratógenos, frequentemente muitos fetos com anomalias morrem *in utero*.

Já foi descrito que doses agudas de etanol administradas em matrizes no dia gestacional 9 e 1/4 foram capazes de produzir malformações nos membros anteriores de seus fetos, incluindo ectrodactilia pós-axial, sindactilia pré-axial e defeitos como redução dos dedos intermediários. A incidência e gravidade destes defeitos foram diretamente ligadas à dosagem de etanol. Nos embriões afetados, excessiva quantidade de morte celular foi observada e foi primariamente distribuída em duas regiões da origem do membro: uma população celular ventrodistal (sulco apical ectodérmico) e uma população celular mesenquimal proximal. Os padrões de morte celular observados pareciam ser particularmente relacionados aos defeitos de membros notados em estágios posteriores. Em particular, foi sugerido que as deficiências no sulco apical ectodermal resultante da morte celular induzida pelo etanol poderia virtualmente justificar todos os defeitos de membros subsequentes.

Apesar de parecer paradoxal, a morte celular geneticamente programada é importante para o desenvolvimento de certo número de estruturas do corpo, como por exemplo, nos espaços interdigitais. Quando não ocorre morte celular interdigital, uma membrana de tecido macio une os dedos, sendo então a base para o desenvolvimento normal dos pés de pato e da formação anormal da sindactilia.

O etanol poderia agir então, ao causar a morte celular nesses grupos, um desequilíbrio nesse "relógio da morte" natural e levar então à formação deste tecido anormal entre os dedos, a sindactilia, como observado em um feto neste estudo.

Neste estudo houve nos grupos tratados com etanol, um reduzido consumo de água e comida, diminuindo-se assim a glicemia. Este período de jejum e conseqüentemente esta queda da glicemia, poderiam ter um efeito benéfico, reduzindo a incidência de anomalias, assim como em estudos com indução de hiperglicemia

de curta duração, mostrou-se teratogênico para embriões de camundongos.

A cauda dos fetos das mães diabéticas sem a exposição ao etanol mostrou-se menor do que nos demais grupos, pois no diabetes, o feto tem um contato prolongado com um ambiente hiperglicêmico, e os danos podem ser extensos, afetando múltiplos órgãos, referidos como embriopatia diabética. A síndrome inclui anomalias delimitadas ao SNC (como DFTNs) e aos sistemas cardiovascular, músculo-esquelético, gastrointestinal e genituri-nário, podendo ser parte da Síndrome da Regressão Caudal.

Foi bem discutido que as anomalias vistas na regressão caudal resultam de agressões às células mesodermas, podendo ocorrer pela exposição dos embriões ao ácido retinóico, por exemplo, o que causa morte celular em excesso em células tronco, conduzindo a ausência de cauda. A insuficiência vascular na região caudal foi sugerida como a causa.

Tanto o diabetes materno (hiperglicemia) quanto o etanol são capazes independentemente de gerar espécies reativas do oxigênio (ROS) e radicais livres do oxigênio, podendo danificar o DNA, aumentar a fosforilação oxidativa e geração de superóxido, causando danos oxidativos, resultando em várias anomalias congênitas, incluindo DFTNs e anomalias geniturinárias. Também podem causar apoptose e inibir a migração e diferenciação das células da crista neural.

A produção de espécies reativas de oxigênio em abundância, apoptose e migração e diferenciação das células da crista neural defectivas estão implicadas nos mecanismos teratogênicos, podendo ter um papel central no processo. Agindo como uma combinação de co-teratógenos, o diabetes materno e o etanol poderiam acentuar o resultado teratogênico em termos de anomalias e RCIU.

Para aqueles indivíduos que foram afetados precocemente pela exposição gestacional ao álcool, e cuja aparência facial é

normal, é esperado que haja uma perda menor de progenitores do prosencéfalo, havendo importantes consequências para a função subsequente do SNC. Assim, há a necessidade de se efetuar muito mais trabalhos para se determinar a extensão total dos efeitos no cérebro que resultam da exposição ao etanol aos períodos equivalentes a 3^a e 4^a semanas de gestação humanas.

Mesmo a mais baixa concentração com o período de exposição mais curto, tem seus efeitos no desenvolvimento físico do embrião. Se há um limiar para os efeitos do etanol no desenvolvimento físico, então é um limiar muito baixo se a exposição ocorre muito precocemente no desenvolvimento embrionário. Estudos devem ser feitos para se investigar concentrações mais baixas concentrações de etanol em vários períodos do desenvolvimento embrionário para se investigar completamente este assunto.

A FAS (Síndrome Fetal Alcoólica) é o maior problema de saúde pública que ocorre em todo o mundo. Para se administrar os efeitos adversos da exposição ao etanol *in útero*, uma equipe com acesso à mãe é necessária, consistindo de especialistas de diferentes campos – médico, educacional, autoridades sociais e outros. Os defeitos relacionados ao etanol têm grandes consequências econômicas para a sociedade. O objetivo fundamental é erradicar a FAS – uma condição totalmente evitável.

Assim também é necessária uma atenção especial no que concerne ao planejamento para a concepção em mulheres diabéticas ou com fatores de risco para o desenvolvimento do diabetes gestacional, pois este acomete de 2 a 5% de todas as gestações, associando-se a complicações tanto maternas quanto fetais.

Dados recentes na literatura mostram que não houve melhora na mortalidade perinatal ou da redução dos índices de malformações congênitas em filhos de pacientes diabéticas na última década, após implementação de programas pré-concepção pelas sociedades competentes. As gestações nas mulheres

diabéticas são ainda mal planejadas e a normalização da glicemia após o terceiro trimestre de gestação possivelmente não previne as complicações neonatais relacionadas ao diabetes.

O controle glicêmico adequado é de relevante importância para a prevenção das complicações relacionadas ao diabetes, mas na prática é muito difícil de ser alcançado. As gestantes com diabetes mellitus chegam tarde ao pré-natal, muitas vezes em uso de tratamentos não oficialmente preconizados e apresentam controle metabólico insatisfatório. São necessários mais estudos relacionados ao uso de antidiabéticos orais na gravidez. A programação da concepção na mulher diabética e de alto risco para o desenvolvimento de diabetes gestacional deve ser comparada, na atualidade, à prevenção de diabetes tipo 2 em portadores de intolerância oral à glicose, e realizada de forma intensiva.

