

INTERACÇÃO DE CONSTITUINTES DAS BEBIDAS ALCOÓLICAS NA PROMOÇÃO DA LESÃO HEPÁTICA*

JORGE PENEDA, AMÉLIA BAPTISTA, JOSÉ M. LOPES

Hospital dos Capuchos. Centro de Anatomia Patológica, Hospital Universitário de Santa Maria. Lisboa. Instituto da Vinha e do Vinho. Catujal

RESUMO

O efeito da exposição do fígado à interacção do etanol e seus congéneres e acetaldeído coexistentes em bebidas alcoólicas tem sido pouco estudado. Analisa-se o comportamento ponderal e estrutural do fígado de ratos Wistar sob tratamento prolongado com a co-administração de etanol, metanol, álcoois superiores e acetaldeído em soluções hidro-alcoólicas sintéticas que reproduzem as suas proporções reais em bebidas alcoólicas comercializadas. Todos os animais de experiência e de controlo têm um aporte calórico semelhante e cada um dos animais sob tratamento alcoólico recebeu um volume idêntico diário de etanol. Da comparação dos dados obtidos nos quatro grupos de seis animais cada - controlo, destiladas (S.H./A.D.), fermentadas (S.H./A.F.) e etanol (S.H./A.E.) - evidencia-se para os três grupos sob tratamento alcoólico menor valor na relação *peso do fígado/peso corporal* que no grupo controlo e as alterações histológicas encontradas no fígado dos animais daqueles três grupos apresentam diferenças qualitativas e quantitativas sendo mais graves para o grupo S.H./A.D.. Estes resultados demonstram o reforço da hepato toxicidade do etanol por outros constituintes voláteis, comportando-se estes como promotores de lesão hepática. As bebidas alcoólicas não são equivalentes na indução da doença hepática alcoólica.

SUMMARY

Interaction of the contents of alcoholic beverages in the promotion of liver damage

The adverse effects of the exposure of the liver to the interaction of ethanol with its congeners and acetaldehyde, coexisting in the contents of alcoholic beverages, have been little studied. Twenty four male Wistar rats were divided into four groups. Two groups (SH/DA; SH/FA) were submitted to daily treatment with synthetic hydroalcoholic solutions containing ethanol, methanol, higher alcohols and acetaldehyde in the same proportions as those found in most common distilled and fermented alcoholic beverages; the third group (SH/EA) was treated with a hydroalcoholic solution of ethanol; the fourth group served as control and received an equivalent volume of an isocaloric solution of dextrose. All the animals were killed at the end of the 9th week of the experiment. The ratio between the liver weight and body weight was found to be lower in the treated animals than in the control group. The histology of the liver was altered in the three groups which were submitted to treatment with the hydroalcoholic solutions, with quantitative and qualitative differences between the groups. These results suggest that the hepatotoxicity of ethanol in alcoholic beverages is enhanced by interaction with its congeners and acetaldehyde; they also suggest that alcoholic beverages are not equivalent in their potential to cause liver damage.

INTRODUÇÃO

Em algumas áreas críticas de incerteza na patogenia da doença da doença hepática alcoólica é necessário circuns-

crever determinados problemas ao recurso experimental em modelos animais afim de promover investigação que possa elucidar várias questões, concretamente do domínio da Toxicologia^{1,2}. As bebidas alcoólicas frequentemente consumidas entre nós contêm diferentes álcoois vitivinícolas além do etanol, álcoois presumivelmente promotores da vulnerabilidade hepática a esses e outros compostos, o que requer a consideração das suas eventuais interacções ainda pouco estudadas³⁻⁷.

* Linha de I&D subsidiada em parte pela Fund. Calouste Gulbenkian e Lab. DeLagrange. Acordo de cooperação científica entre o INSA e o IVV (1991).

As exposições concorrenciais persistentes, concretamente ao etanol e seus congêneres múltiplos - embora estes em concentrações reais relativas muito inferiores às do etanol - poderão condicionar efeitos tóxico-metabólicos que influenciem o desenvolvimento da doença estrutural nos órgãos alvo^{1,8-11}.

Conhecendo a proveniência dos alcoois similares ao etanol, as suas concentrações e variedades nas bebidas alcoólicas consumidas habitualmente, interessa estudar no modelo experimental, o seu provável contributo patogénico para o desenvolvimento da lesão hepática alcoólica.

MATERIAL E MÉTODOS

Utilizaram-se ratos Wistar machos adultos de uma colónia estabilizada proveniente do biotério do Instituto Gulbenkian de Ciência (Oeiras) com um peso inicial variável de 196 a 230 gramas. Após uma semana de adaptação (luminosidade, temperatura, humidade, alimentação e água) no Biotério do Laboratório de Nutrição do Instituto Nacional de Saúde (INSA), foram distribuídos ao acaso em quatro grupos de seis animais cada e individualizados em compartimentos unitários estandardizados, a fim de receberem tratamento diário por via intraperitoneal (I.P.), com diferentes soluções hidro-alcoólicas expressamente preparadas e controladas semanalmente. Os animais tinham livre acesso à alimentação sólida com igual composição para todos os quatro grupos (SAPEC-Roedores/Setúbal; valor energético alimentar - digestível - de 29Kcal/100g de alimento com a seguinte composição: proteínas totais 22,0g/100g de peso seco; gorduras totais 4,6g/100g de peso seco; amido 30,0g/100g de peso seco; açúcar 7,5g/100g de peso seco; oligoelementos e vitaminas) e idêntico modo de acesso à água contida em biberons graduados. Um destes grupos funcionou como grupo de controlo, tendo os outros três funcionado como grupos de ensaio. Cada animal do grupo controlo recebeu um volume de solução dextrosada isocalórica relativamente ao volume de etanol injectado em cada animal dos restantes 3 grupos.

O tempo de tratamento prolongou-se por nove semanas. A capitação alimentar sólida e de água, assim como o peso corporal foram controlados semanalmente.

As soluções hidro-alcoólicas sintéticas preparadas reproduzem uma composição real (concentração proporcional de etanol e álcoois congêneres e acetaldeído) das bebidas alcoólicas destiladas (D) e fermentadas (F) consumidas habitualmente pela nossa população.

As soluções foram constituídas a partir de matéria prima de elevado grau de pureza, sendo o seu controlo feito através de cromatografia gasosa segundo metodologia seguida no Laboratório de Controlo da Qualidade do I.V.V..

No Quadro 1 discrimina-se o referencial das concentrações reais (médias de um lote alargado) de vários constituintes voláteis de bebidas alcoólicas fermentadas e destiladas comercializadas.

O volume da solução hidro-alcoólica preparada, injectado diariamente por via I.P. em cada animal dos 3 grupos sob tratamento (Grupos D, F e E), contém 250mg de etanol/100g de peso corporal e os restantes produtos nas proporções expressas no Quadro 2. Escolheu-se esta via (I.P.) porque se o nível de alcoolémia prolongado é correlacionável com as alterações estruturais no fígado, no modelo experimen-

QUADRO 1 - Composição referencial para a constituição das soluções hidro-alcoólicas*.

Fermentada		Destilada
Etanol vínico	10% volume	50% volume
Acetaldeído	40,24 g/h.aa	321,92 g/h.aa
Metanol	193,08 g/h.aa	1.544,64 g/h.aa
Alc. superiores	225,74 g/h.aa	290,24 g/h.aa

*Valores legislados: Regulamento(CEE)1576/89 do Conselho de 29 de Maio de 1989 da Portaria 697/86 de 21 de Novembro DR. 1ª. Série nº.269 de 86-11-21

QUADRO 2 - Composição qualitativa das soluções hidro-alcoólicas e quantidades co-administradas em cada animal (I.P./dia) do respectivo grupo (D; F; E).

	S.H.A.D.	S.H.A.F.	S.H.A.E.
Etanol	250	250	250
Acetaldeído	1,7	1,0	-
Metanol	7,7	4,3	-
* Alc. Superiores	1,4	5,4	-

mg/100g de peso corporal; D = destilada; F = fermentada; E = etanol

*butanol 2; n-propanol; isobutanol; álcool alílico; n-butanol e isopentanois

tal esta via é efectiva conforme estudos dinâmicos da concentração do etanol no sangue e no fígado¹².

Ao fim de 9 semanas de experiência os animais foram sacrificados por decapitação e procedeu-se de imediato à colheita de órgãos (fígado, coração, pâncreas e músculo esquelético) fazendo-se a respectiva pesagem (balança Sartorius U.3600 Electrónica). Neste trabalho analisaremos apenas o comportamento ponderal do fígado e as alterações estruturais em microscopia óptica.

Em cada animal foram colhidos quatro fragmentos do fígado; fixaram-se em soluto de formalina a 10% durante 24 horas; fez-se a inclusão em parafina; cortes de 5 mm foram corados pela hematoxilina-eosina, métodos de PAS após acção da diástase, Perls e Gordon-Sweet para a reticulina. Fizeram-se ainda cortes de congelação de fragmentos fixados que se coraram pelo *oil red* para pôr em evidência os lípidos. No estudo histológico foram apreciados os seguintes parâmetros: vacuolização dos núcleos dos hepatócitos, mitoses e aumento do número de células binucleadas; no que respeita ao citoplasma dos hepatócitos registou-se a vacuolização, esteatose, degenerescência eosinófila e necrose focal ou confluyente; foram ainda apreciadas as infiltrações inflamatórias e a hiperplasia e hipertrofia das células de Kupffer. Estes parâmetros foram apreciados em termos de presente ou ausente; a esteatose, degenerescência eosinófila, necrose e infiltração inflamatória foram ainda avaliados semi-quantitativamente.

RESULTADOS

Conhecendo-se as variações ponderais (corporal e de órgão), quer no animal de experiência quer no homem,

atribuídas aos efeitos tóxico-metabólicos induzidos pelo etanol, interessa apreciar o comportamento de duas delas nos diferentes grupos - Quadro 3.

QUADRO 3 - Capitação alimentar, peso do fígado e relação peso do fígado / peso corporal.

Grupos*	Animais n	Peso Fígado (g)	Capitação Alimentar (g)	Peso Fígado/100g Peso Corporal
Controlo	6	17,6 ± 2,4	193,9 ± 32,9	4,14
S.H.A.D.**	6	17,0 ± 2,4	190,9 ± 34,4	4,03
S.H.A.F.**	6	15,5 ± 1,8	196,7 ± 32,2	3,55
S.H.A.E.**	6	14,8 ± 2,9	210,8 ± 41,9	3,88

*média semanal

** S.H.A.-solução hidro-alcoólica (D - destilada; F - fermentada; E - etanol)

As diferentes composições quantitativas e qualitativas das soluções hidro-alcoólicas in introduzidas não parecem influenciar a capitação *ad libitum* da alimentação sólida nos vários grupos sob tratamento e, sendo o seu valor semelhante ao do grupo controlo, admite-se que todos os grupos terão uma aquisição calórica similar com um ganho ponderal corporal final em média de cerca de 150 gramas.

O estudo da relação *peso do fígado/peso corporal* mostra diferentes tendências na comparação intergrupos, contribuindo o fígado com maior percentagem para o peso corporal final nos animais do grupo controlo do que nos grupos sob tratamento alcoólico sendo tal facto mais evidente no grupo F.

Numa análise comparativa, o aspecto macroscópico dos fígados dos animais dos vários grupos sob tratamento alcoólico (D,F,E) não permitia diferenciar os órgãos por qualquer particularidade consistente.

As alterações observadas no exame microscópico do fígado estão resumidas no Quadro 4. Todos os animais dos três grupos submetidos a tratamento alcoólico tinham necrose focal e regeneração dos hepatócitos, esteatose e inflamação (Fig. 1, 2, 3, 4), enquanto que nos animais do grupo de controlo o tecido hepático não tinha lesões. As alterações foram sempre de grau ligeiro ou moderado. No grupo D a necrose e inflamação do tecido hepático atingiram graus mais severos do que nos grupos F e E, existindo em dois animais algumas áreas de necrose hepática confluyente na zona 3; a esteatose era mais intensa nos grupos F e E do que no grupo D; os vacúolos de natureza lipídica tinham pequeno tamanho e dispunham-se por vezes no bordo sinusoidal dos hepatócitos.

DISCUSSÃO

No domínio da toxicologia experimental da doença alcoólica, os roedores têm sido os animais de laboratório mais frequentemente utilizados nas últimas décadas¹³.

Nesta área da patologia humana, o largo recurso ao estudo experimental demonstra a procura para o seu entendimento em várias vertentes da fisiopatologia organome-

QUADRO 4 - Alterações histológicas do fígado dos animais submetidos a tratamento prolongado com etanol e álcoois congêneres e acetaldéido.

Lesão Hepática	Controlo	S.H.A.D.	S.H.A.E.	S.H.A.F.
Vacuolização nuclear	0	+	+	+
Células binucleadas	±	+	+	+
Mitoses	0	+	+	+
Vacuoliz. citoplasma	0	+	+	+
Degeneresc. eosinófila	0	++	++	++
Esteatose	0	+	++	++
Necrose focal	0	++	+	+
Necrose confluyente	0	+	0	0
Inflamação	0	++	+	+
Activação cels Kupffer	0	++	+	++
Depósitos hemossid.	0	0	+	0

Escala 0 a ++++: + (> 25%), ++ (> 25%); +++ (> 50%)
* 2/6 casos

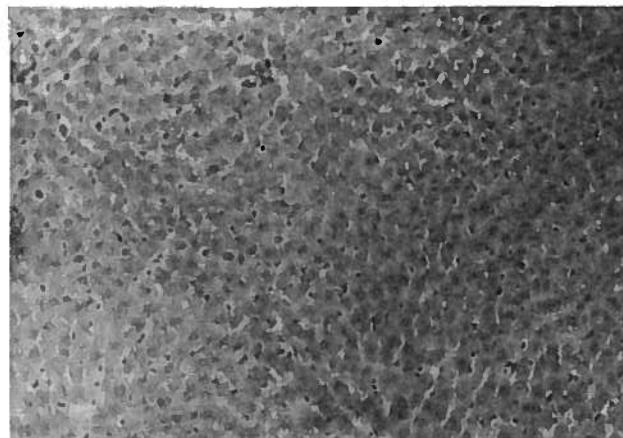


Fig. 1. Necrose focal dos hepatócitos (+); activação das células de Kupffer (++) SH/AF. H.E.x160.

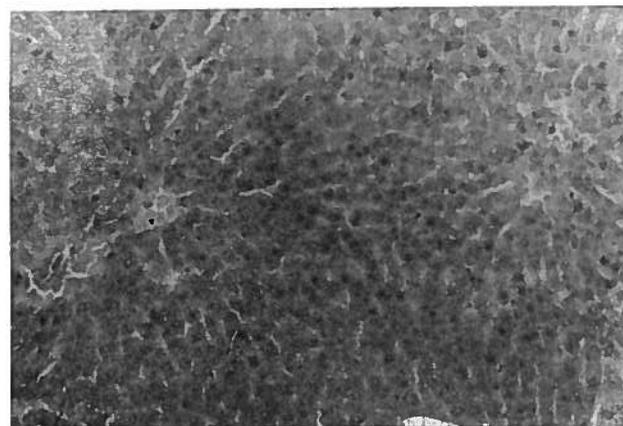


Fig. 2. Esteatose microvacuolar (+); vacuolização nuclear (+); hepatócitos binucleados (+). H.E.x160

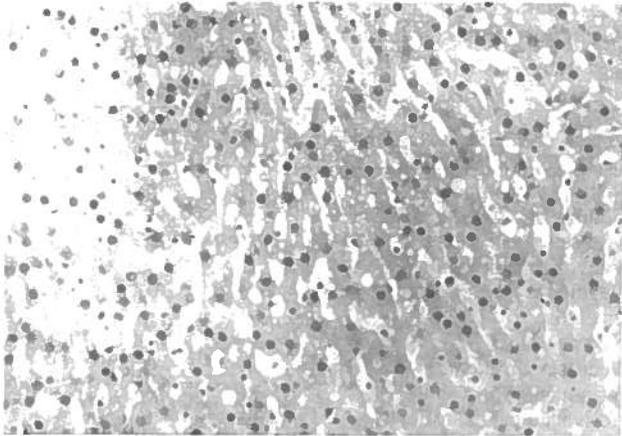


Fig. 3. Esteatose micro e macrovacuolar (++). SH/AE. H.E. x160

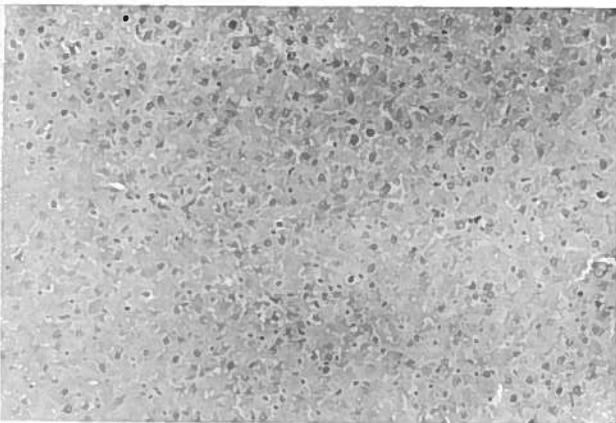


Fig. 4. Degenescência eosinófila dos hepatocitos com corpos de Councilman (++) . Esteatose microvacuolar (+) SH/AD. H.E. x160

tabólica, assim como para fundamentar potenciais acções de carácter preventivo. Contudo, apesar da possibilidade de reproduzir lesões estruturais observadas no homem, a tentadora extensão linear dos resultados obtidos no modelo animal tem de ser prudentemente ponderada, pelas diferenças específicas do comportamento dinâmico do metabolismo do álcool no tipo de animal^{14,16}.

Demonstrámos previamente em trabalho experimental de carácter reducionista a hepatotoxicidade aguda do etanol, álcoois congéneres e acetaldeído, constituintes habituais das bebidas alcoólicas consumidas pela população portuguesa¹⁷.

No presente estudo aprecia-se a influência, sob tratamento prolongado, da co-administração de etanol, metanol e álcoois superiores e acetaldeído no fígado de ratos Wistar.

A hipertrofia do órgão e a esteatose são as alterações estruturais iniciais mais comuns induzidas pelo etanol. Os resultados mostram que para um nível calórico semelhante e idêntica quantidade de etanol (pressupostos níveis sobreponíveis de alcoolémia) e sujeição a igual tempo de experiência, os animais sob tratamento alcoólico embora com baixo teor relativo de gordura ingerida (conhecida circuns-

tância minimizadora na promoção da esteatose alcoólica)^{18,19} vêm a desenvolver esteatose hepática evidente, apesar de o fígado ser proporcionalmente (relação *peso fígado/peso corporal*) menor que o fígado do grupo controlo e, neste não haver depósito de gordura.

Em experiência paralela simultânea (não publicada), submetemos um lote de 6 animais provenientes da mesma colónia a tratamento com uma bebida alcoólica fermentada comercializada administrada por via oral ad libitum com uma captação média diária de cerca de 2 gramas de etanol; ao fim de 6 semanas, o valor percentual da relação ponderal (*fígado/peso corporal*) é de 4.6 ± 0.4 e de 4.0 ± 0.3 para o respectivo grupo controlo. É curiosa a diferença entre os resultados das duas metodologias experimentais, sugerindo que neste contexto além da alcoolémia o tracto digestivo tem influência determinante no que se passa no fígado.

Tem-se readmitido a interacção, entre outras, do estado nutricional-consumo de etanol no desenvolvimento da lesão hepática alcoólica primária²⁰. No entanto, nas condições experimentais por nós utilizadas, os resultados permitem admitir a responsabilidade independente do etanol (álcool comum aos três grupos) no desenvolvimento da esteatose hepática e a não influência dos outros constituintes voláteis introduzidos, verificando-se mesmo que no grupo D este depósito de gordura é menos marcado que nos outros dois grupos. É curioso verificar que neste grupo a necrose e inflamação são mais intensas.

Vários autores nas últimas décadas vêm admitindo a existência doutros factores além da utilização do etanol no desenvolvimento da doença alcoólica do fígado, órgão alvo preferencial pela sua posição topográfica no eixo vascular esplâncnico e pela sua actividade metabólica na sujeição prolongada directa e indirecta, a muitas e variadas noxas, a qual poderá fundamentar a razão de alguns paradoxos epidemiológicos que escapam à relação linear determinista consumo de álcool/doença de órgão.

A co-administração experimental de etanol e outros constituintes existentes nas bebidas alcoólicas suporta a razão das diferentes alterações qualitativas e quantitativas estruturais do fígado nos vários grupos, que se tornam mais evidentes e gravosas no grupo de animais D.

Sabe-se que a via de metabolização oxidativa MEOS sofre indução enzimática específica (citocromo P 450 2E1) e é comum ao etanol e a outros seus congéneres, podendo ser mais prejudicial que adaptativa, conduzindo potencialmente à activação metabólica de vários compostos que se tornarão hepatotóxicos^{8,9}.

Embora este estudo, obviamente, não represente as características essenciais do alcoolismo crónico, o modelo utilizado e as lesões hepáticas encontradas pode ser uma base útil para avaliar o efeito de potenciais cofactores químicos, além do etanol, que facilitem ou concorram para a promoção de lesão hepática alcoólica. Com efeito, os resultados sugerem um reforço da toxicidade do etanol pelos constituintes voláteis existentes em determinadas proporções em bebidas alcoólicas, frequentemente consumidas. Nesta base, é permissível uma interpretação não conservadora que admita a não equivalência entre diferentes tipos de bebidas alcoólicas, pois a influência do metanol, dos álcoois superiores e acetaldeído nelas coexistentes concorrem para o desenvolvimento de lesões estruturais no fígado sujeito à exposição alcoólica. Estes resul-

tados fundamentam a continuidade da investigação na importante área da alcoologia. Actualmente aguardamos a finalização do desenvolvimento experimental sob diferente metodologia, já em fase avançada, a fim de confrontar os resultados aqui apresentados com os a alcançar na experiência a decorrer.

AGRADECIMENTOS

Às Sras. D. M^a. Teresa Venâncio e D. Ana M^a. Ribeiro, Técnicas de Análises Clínicas e de Saúde Pública do INSA, pelo empenhamento nas tarefas do biotério e excelente colaboração; à Sra. D. Rosebel Baptista que executou a técnica de histopatologia; ao Sr. Jorge Almeida pelo tratamento de texto.

BIBLIOGRAFIA

1. FEIMMAN, L.; LIEBER, CS: Toxicity of ethanol and other components of alcoholic beverages. *Alcoholism: Clin. Exp. Res.*, 1988; 12, ed.
2. KLARSEN, C.D.: Principles of Toxicology. In: Goldman and Gilman: Toxicology. 1985; 1592-1604.
3. CARROL, R.B.: Analysis of alcoholic beverages by GHPLC. *J. Stud. Alcohol*, 1970; 5: 6-25.
4. CURVELO-GARCIA A.S.: Controlo de Qualidade dos Vinhos - Química enológica; métodos analíticos. Instituto da Vinha e do Vinho, 1988, ed.
5. GREIZERSTEIN, H.B.: Congeners contents of alcoholic beverages. *J. Stud. Alcohol*, 1981; 42: 1030 - 37.
6. NAVEAU, S.; PERRIER, C.; INK, D.; MORY, B.; POYNARD, T.; CHAPUT, J.C: Are alcoholic beverages equivalent in their potential to cause alcoholic liver disease? *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.*, 1991; 3: 265-69
7. TESCHKE, R.; HASUMURA, Y.; LIEBER, CS Hepatic microsomal alcohol oxidizing system affinity for methanol, ethanol and propanol. *J. Biol. Chem.*, 1975; 250: 7379-404.
8. LIEBER, C.S.: Metabolic effects of ethanol and its interaction with other drugs, hepatotoxic agents, vitamins and carcinogens: a 1988 update. *Semin. Liver Dis.*, 1988; 8: 47-68.
9. LIEBER, C.S.: Hepatic, metabolic and toxic effects of ethanol: 1991 update. *Alcoholism: Clin. Exp. Res.*, 1991; 15: 573-92.
10. MANSO, C.F.; MIRA, M.L: The effects of different alcohols on microsomal lipid peroxidation. *Alcohol and Alcoholism*, 1991; 26: 252 (abstract).
11. PENEDA, J. Cirrose hepática alcoólica em Portugal - Problemas na patogenia da doença. Ed. do autor, 1991.
12. GVOZDJAK, A.; BROVIC, F.; BADE, V.; KRUTY, F.; NIEDERLAND, TR.; GVOZDJAK, J: Myocardial cell damage due to ethanol - Recent Advances on Cardiac Structure and Metabolism. In: Harris, P.; Bing, R.J. and Fleckenstein: *Biochemistry and Pharmacology of Myocardial Hypertrophy, Hypoxia, and Infarction* Baltimore: A University Park Press, 1976; 7: 451-57.
13. LIEBER, C.S.; DECARLI, L.M.; SORREL, M.F Experimental methods of ethanol administration. *Hepatology*, 1989; 10: 501-10.
14. DOLE, V.P.; GENTRY, R.T: On the relevance of animal models to alcoholism in humans. *Alcoholism: Clin Exp. Res* 1986; 10: 361-63.
15. DOLE, V.P.; GENTRY, R.T: Toward and analog of alcoholism in mice: Scale factor in the model. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*; 1984; 81: 3543-46.
16. OSSWALD, W.: Ética da investigação no animal e aplicação ao homem. *Acta Méd. Port.*, 1992; 5: 222-25
17. PENEDA, J.; SERRANO, I.; MARTINS, M.C.; BATISTA, A.: Etanol, metanol e álcoois congêneres do etanol na doença hepática alcoólica. *Rev. Gastroenterologia* 1990; VII: 42-53.
18. LIEBER, C.S.; DECARLI, L.M: Quantitative relationship between the amount of dietary fat and the severity of the alcoholic fatty liver. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1970; 23: 474-78.
19. LIEBER, C.S.; SAVOLAINEN, M: Ethanol and Lipids. *Alcoholism: Clin Exp Res*, 1984; 8: 409-23.
20. RAO, G.A.; LARKIN, E.C: Role of nutrition in causing the effects attributed to chronic alcohol consumption. *Med. Sci. Res.* 1988; 2: 53-7.