

Influência da icterícia obstrutiva na capacidade reprodutiva, desenvolvimento fetal e morfologia ovariana em ratas

Influence of jaundice in the reproductive capacity, fetal development and ovarian morphology in rats

VIVIAN RESENDE, TCBC-MG¹; ANDY PETROIANU, TCBC-MG²; MARLENE SOARES DIAS ALVES³; LUIZ RONALDO ALBERTI, ACBC-MG⁴

R E S U M O

Objetivo: Estudar a influência da icterícia obstrutiva sobre a capacidade reprodutiva e desenvolvimento fetal em ratas. **Métodos:** Foram utilizadas 60 ratas sexualmente maduras e sabidamente férteis distribuídas em dois grupos: grupo 1 (n=30)- submetidas a ligadura do ducto biliopancreático e grupo 2 (n=30) -controles. A partir do 23º dia pós-operatório, as ratas foram acasaladas e seus ciclos estrais avaliados diariamente por meio de esfregaços vaginais, que permitiram determinar o dia da cópula e a idade gestacional em que foram mortas. Realizou-se estudo histológico dos corpos lúteos nos ovários de todas as ratas e analisou-se macroscopicamente a morfologia externa dos fetos. **Resultados:** Observou-se que 23 ratas controle (92%) e 11 ratas ictéricas (39,3%) desenvolveram prenhez (p=0,0002). As 17 ratas com hiperbilirrubinemia e sem prenhez (60,7%) apresentaram somente corpos lúteos com aspecto involutivo em seus ovários e sofreram modificações em seus ciclos estrais, permanecendo vários dias em proestro ou estro. As ratas prenhes com hiperbilirrubinemia não apresentaram alterações em seus corpos lúteos, porém os seus fetos eram anormais. **Conclusão:** Em presença de hiperbilirrubinemia, a fertilização é viável, a capacidade reprodutiva é muito reduzida, os ciclos estrais tornam-se irregulares, o epitélio vaginal permanece cornificado, os corpos lúteos ovarianos regridem, os corpos lúteos gravídicos não são alterados aumentando progressivamente durante a prenhez e o desenvolvimento fetal é gravemente alterado.

Descritores: Hiperbilirrubinemia. Icterícia obstrutiva. Fertilização. Desenvolvimento fetal. Ciclo estral.

INTRODUÇÃO

A icterícia caracteriza-se por disfunção do metabolismo hepático das bilirrubinas e sua consequente impregnação em todos os tecidos e líquidos orgânicos. Traduz-se clinicamente pelo aspecto amarelado das mucosas e secreções. Entre as afecções que mais freqüentemente determinam icterícia encontram-se as cirroses, hepatites, obstruções das vias biliares e icterícia colestática da gravidez¹.

A colestase específica da gestação ocorre principalmente no terceiro trimestre e desaparece com o término da gravidez. Supõe-se que ocorram mudanças nos sistemas enzimáticos dos hepatócitos envolvendo o metabolismo das bilirrubinas e sua excreção². Nos casos em que essa afecção ocorre, observa-se mais recém-nascidos com sofrimento fetal intra-uterino, além de alto índice de prematuridade³⁻⁵.

Hepatites virais agudas e crônicas são afecções que podem acometer pacientes grávidas. As hepatites virais agudas estão em seu período de incubação quando do início da gravidez ou são adquiridas durante a gestação. As hepatites crônicas podem cursar com quadro de icterícia subclínica. A icterícia, quando se instala, é do tipo colestático,

permanecendo durante quatro ou mais semanas. Sabe-se que as hepatites cursam com grande morbidade materno-fetal, determinando muitas vezes prematuridade e óbito fetal⁶.

Têm sido descritas pacientes cirróticas ictéricas que engravidaram, apesar dos riscos maternos serem maiores e de haver alto índice de abortamentos espontâneos e fetos prematuros⁷.

A litíase da vesícula biliar é uma ocorrência relativamente comum em mulheres, já a coledocolitíase ou litíase das vias biliares extra-hepáticas é de ocorrência menos freqüente nos dias atuais pela difusão dos recursos diagnósticos (ultrassom) e pela segurança do tratamento cirúrgico da litíase da vesícula biliar (cirurgia videoassistida). Sabe-se que a gestação pode aumentar a incidência dessa afecção^{8,9} em decorrência de ação litogênica dos estrogênios provavelmente em decorrência da colestase e da diminuição dos ácidos biliares⁸⁻¹⁰, podendo levar a quadros de colecistite aguda e até mesmo colangite e pancreatite aguda biliar.

Os efeitos da icterícia vem sendo investigados em modelos animais. Em estudos com ratas ictéricas observou-se redução da capacidade reprodutiva¹¹. Ratas com

Trabalho realizado no Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Minas Gerais - MG-BR.

1. Professora Adjunta do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da UFMG, Doutora em Cirurgia - UFMG - MG-BR; 2. Professor Titular do Departamento de Cirurgia da UFMG - MG-BR; 3. Professora Adjunta do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, Doutora em Morfologia ICB - UFMG - MG-BR; 4. Professor Adjunto do Departamento de Cirurgia da UFMG - MG-BR.

hiperbilirrubinemia apresentam maturação sexual precoce, ovulação tardia, diminuição no número de corpos lúteos e abertura vaginal precoce¹¹. É provável que as bilirrubinas compitam com os estrogênios pelo mesmo local de ligação na albumina e, como conseqüência, o nível sérico de estrogênios eleva-se, estimulando o desenvolvimento sexual precoce^{12,13}.

Considerando as complicações gestacionais, que são mais freqüentes em pacientes com icterícia obstrutiva e os poucos estudos relacionados a essa condição, realizou-se o presente estudo, cujo objetivo foi verificar se há alterações no processo de fertilização e desenvolvimento fetal de ratas com hiperbilirrubinemia por ligadura do ducto biliopancreático.

MÉTODOS

Este trabalho foi realizado de acordo com as recomendações das Normas Internacionais de Proteção aos Animais e do Código Brasileiro de Experimentação Animal (1988) e foi aprovado pela Câmara do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina e pelo Comitê de Ética em Pesquisa Experimental da Universidade Federal de Minas Gerais (CETEA)^{14,15}.

Foram utilizadas 53 ratas da raça Lewis, sexualmente maduras e sabidamente férteis, por gravidez prévia, com quatro a cinco meses de idade e peso inicial variando entre 191 g e 220 g. Elas foram mantidas no Biotério do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, em temperatura e iluminação ambientes, recebendo diariamente água e alimento completo para ratos. Todas as ratas foram pesadas no início e no final do experimento. Os animais foram aleatoriamente distribuídos em dois grupos:

-Grupo 1 (n=30): animais submetidos a ligadura do ducto biliopancreático,

-Grupo 2 (n=30): grupo controle – animais submetidos apenas a laparotomia seguida de laparorrafia (sham operation).

A regularidade dos ciclos estrais nos animais destinados ao experimento foi avaliada por meio de esfregaços vaginais diários durante sete dias. Imobilizando a rata, introduziu-se solução salina a 0,9% na vagina utilizando ponteira de micropipeta acoplada a pera de borracha para aspiração controlada. Coletou-se o lavado vaginal e fez-se o esfregaço que foi fixado com álcool-éter 1:1 e corado pelo método de Shorr (1941)¹⁶. Duas ratas com ciclo fixo em estro foram excluídas do Grupo 1 e cinco foram excluídas do Grupo 2, resultando em 28 e 25 ratas no grupo 1 e 2, respectivamente.

Sob anestesia geral com cloridrato de quetamina (90mg/kg) e cloridrato de xilazina (10mg/kg), ambos por via intraperitoneal, os animais do grupo 1 foram submetidos a laparotomia mediana. O ducto biliopancreático foi identificado e seccionado entre ligaduras, a um centímetro da cabeça do pâncreas, utilizando fio de seda 3-0 e seccionado. A síntese da parede abdominal foi com sutura

contínua em dois planos, utilizando-se fio de poliglactina 3-0. Durante todo o período anestésico, foram observadas a freqüência cardíaca e a respiratória, além da movimentação voluntária dos ratos, com vista a detectar possíveis complicações anestésicas. Os animais do grupo 2 foram submetidos ao mesmo procedimento anestésico, de laparotomia e laparorrafia para simular o efeito do trauma operatório.

No décimo dia pós-operatório, coletou-se de sangue para dosagem quantitativa dos níveis de bilirrubinas circulantes, após anestesia e dissecação da veia femoral. Utilizando-se uma agulha fez-se um ferimento puntiforme na veia femoral por onde extravasou o sangue que foi rapidamente aspirado (1ml) e transferido para um tubo de Eppendorf. O sangue coletado foi centrifugado e a fração plasmática retirada para dosagem de bilirrubinas. As dosagens de bilirrubinas foram realizadas em aparelho automático (Cobas Mira Suíço) utilizando "kit" de bilirrubina monomérica (Merck).

A partir do vigésimo terceiro dia pós-operatório, as ratas foram acasaladas com um macho sabidamente fértil, na proporção de duas a três fêmeas para cada macho. Nos dias seguintes ao acasalamento, os esfregaços vaginais continuaram a ser feitos diariamente para verificar a presença da cópula mediante a observação de espermatozoides e das características do epitélio vaginal. A presença de espermatozoides no esfregaço era considerada o dia zero da prenhez, a partir do qual a rata era separada do macho. Os espermatozoides foram observados a fresco ao microscópio óptico e em lâminas coradas pelo método de Shorr (1941)¹⁶. Os esfregaços vaginais continuaram a ser realizados durante sete dias após a cópula para verificar a permanência ou não da rata em diestro. Os animais não copulados permaneceram acasalados durante quinze dias nos quais os esfregaços vaginais continuaram a ser realizados diariamente.

A morte dos animais foi processada com dose inalatória letal de éter, após anestesia com cloridrato de quetamina e cloridrato de xilazina no 12º e 20º dias após cópula (distribuído igualmente entre os animais que copularam) e no 15º dia após o acasalamento, nos animais em que não se constatou a cópula. As ratas não acasaladas foram mortas 35 dias após a ligadura do ducto biliopancreático, no período de diestro. Os animais mortos tiveram seus ovários e um fragmento do fígado ressecados para avaliação histológica.

Os fetos das ratas com 20 dias de prenhez e que foram submetidas a ligadura do ducto biliopancreático foram macroscopicamente comparados entre si e com aqueles das ratas não operadas, analisando-se seu aspecto morfológico e medida céfalo-caudal. A vitalidade dos fetos foi avaliada pela presença de movimentos ativos no momento em que foram removidos do útero, com a rata ainda viva, sob anestesia com cloridrato de quetamina e xilazina nas doses anteriormente descritas.

Os ovários de todos os animais mortos foram retirados, pesados e fixados em líquido de Bouin por 12 horas. Foram obtidos cortes histológicos de 7mm de espessura.

ra, semi-seriados a cada 15 cortes, seguidos de coloração com hematoxilina e eosina, e tricrômico de Masson. O número e tamanho dos corpos lúteos foram determinados após examinar cada corpo lúteo em toda sua extensão. Não foram considerados os corpos lúteos com aspecto involutivo, não secretores e que poderiam ser provenientes de ciclos anteriores. Os corpos lúteos funcionantes se repetiam em vários cortes sendo possível acompanhá-los e determinar seu maior diâmetro. Para medida dos diâmetros dos corpos lúteos e das células lúteas, utilizou-se uma ocular integradora de 16 X contendo um retículo com um régua milimetrada, e objetiva de 4 X. A partir da comparação entre as medidas dos diâmetros de um mesmo corpo lúteo nas lâminas seriadas, determinou-se a medida que traduzia os dois maiores diâmetros desse corpo lúteo. Essas medidas foram somadas e divididas por dois, sendo este valor considerado o diâmetro médio do corpo lúteo. Após obtenção (quatro campos por lâmina em cinco lâminas) do diâmetro médio de cada corpo lúteo foi feita a somatória das medidas encontradas para os vários corpos lúteos dos dois ovários. Obteve-se uma média desses valores que foi considerada o diâmetro médio dos corpos lúteos por animal. O aspecto morfológico das células lúteas (número e tamanho) foi analisado nos diversos grupos e em seguida foram comparados, tendo como padrão os animais não acasalados do grupo E, mortos no período de diestro.

As comparações entre os corpos lúteos, peso dos ovários e peso dos animais foram realizadas utilizando-se o teste da análise de variância com um fator. Para avaliação da influência da hiperbilirrubinemia na prenhez utilizou-se o teste do qui-ao-quadrado. Utilizou-se a análise de correlação de Sperman (*r*) para comparar a proporção de animais com prenhez em relação às concentrações de bilirrubinas. Os dados foram considerados significativos para $p < 0,05$.

RESULTADOS

Desde o dia da operação todos os animais apresentaram-se sem anormalidades e sem sinais de sofrimento. Sua movimentação dentro das gaiolas e a alimentação foram as habituais para ratos normais. Houve ganho de peso e crescimento dos animais durante o período de observação, com conseqüente prenhez. Não houve mortalidade entre os animais deste estudo. (Tabela 1).

A tabela 2 mostra os valores de bilirrubinas entre os grupos 1 e 2. Observa-se que o grupo 1 apresentou valor

maior tanto da bilirrubina direta quando da indireta em relação ao grupo 2 ($p = 0,021$). Todos os animais submetidos a ligadura do ducto biliopancreático apresentaram elevação das bilirrubinas (bilirrubina total de $7,81 \pm 2,68$ mg/dl), sendo de $6,61 \pm 2,49$ nos animais não prenhes e de $8,68 \pm 0,47$ nas ratas prenhes ($p > 0,05$). Também não houve diferença com significância estatística entre a bilirrubina direta e indireta nos animais ictericos ($p > 0,05$). (Tabela 3).

Ao exame macroscópico da cavidade abdominal, não foi verificada alteração inflamatória sugestiva de colangite ou pancreatite. Não houve coleção purulenta, mas a saída de líquido biliar de aspecto normal do ducto biliopancreático. A superfície do pâncreas não mostrava alterações macroscópicas. Houve aderências em torno do pedículo hepático.

A proporção de animais prenhes foi de 39,3 % (11 ratas) no grupo submetido à ligadura do ducto biliopancreático e de 92,0 % no grupo controle – operação simulada - (23 ratas) ($p=0,0002$), mostrando que existe diferença entre os animais com e sem icterícia (OR = 17,8) ($3,04 < OR < 135,55$).

Das dezessete ratas com ligadura do ducto biliopancreático que não desenvolveram prenhez, nove foram copuladas e em oito não se constatou a cópula. Entre as nove ratas copuladas, duas permaneceram em diestro durante seis dias após a cópula. As outras sete ratas copuladas apresentaram ciclos estrais atípicos após a cópula, com períodos prolongados (seis dias) em proestro ou estro. As onze ratas que tiveram prenhez permaneceram em diestro após a cópula. Ainda com relação ao grupo 1, entre as oito ratas em que não se constatou a cópula, cinco apresentaram também ciclos estrais atípicos após o acasalamento, com períodos prolongados que variaram entre quatro e seis dias em proestro ou estro. Das duas ratas do grupo-controle que não desenvolveram gravidez,

Tabela 1 - Peso inicial e final (g) dos animais do grupo 1 e 2 com 12 dias e 20 dias de prenhez.

Animal	Peso inicial	Peso final
A	202,4 ± 11,5	220,7 ± 18,85
B	201,5 ± 9,6	219,6 ± 20,57
C	202,3 ± 14,3	203,8 ± 15,98
D	201,2 ± 13,5	213,2 ± 17,29

A → Animais com 12 dias de prenhez, com ligadura do ducto biliopancreático;
 B → Animais com 20 dias de prenhez, com ligadura do ducto biliopancreático;
 C → Animais com 12 dias de prenhez, sem ligadura do ducto biliopancreático;
 D → Animais com 20 dias de prenhez, sem ligadura do ducto biliopancreático.

Tabela 2 - Dosagem das bilirrubinas em mg/dl (média ± desvio padrão da média) dez dias após a ligadura do ducto biliopancreático (Grupo 1) e nos animais submetidos apenas a laparotomia seguida de laparorráfia (sham operation) (Grupo 2).

	Bilirrubina total *	Bilirrubina direta	Bilirrubina indireta
Grupo 1	7,81 ± 2,68	3,83 ± 2,25	3,92 ± 1,57
Grupo 2	0,31 ± 0,13	0,12 ± 0,05	0,23 ± 0,11

* $p = 0,021$.

Tabela 3 - Dosagem das bilirrubinas em mg /dl (média ± desvio padrão da média) dez dias após a ligadura do ducto biliar pancreático, de acordo com a ocorrência de acasalamento e prenhez.

	Bilirrubina total	Bilirrubina direta	Bilirrubina indireta
Animais não prenhes	7,81 ± 2,68	3,78 ± 2,49	4,02 ± 1,41
Animais prenhes	6,61 ± 2,49	3,84 ± 1,51	2,35 ± 0,98
Não acasalados	8,68 ± 0,47	3,28 ± 0,38	5,40 ± 0,85

$P > 0,05$.

Obs: Os animais não acasalados foram aqueles em que apesar de terem sido deixados em uma gaiola com macho sabidamente fértil, não houve a identificação de espermatozoides no esfregaço vaginal, indicando que não haviam copulados.

uma permaneceu em diestro durante sete dias após a cópula e na outra observou-se uma má-formação uterina (útero unicorno). Nas outras 23 ratas em que se evidenciou a cópula e que tiveram prenhez, houve a permanência em diestro nos sete dias subsequentes à cópula. (Figura 1). Houve cornificação do epitélio vaginal das ratas ictericas.

Em cinco ratas do grupo 1 com 20 dias de prenhez, observaram-se 47 fetos sendo que, apesar de terem a mesma idade gestacional, eles tiveram diferentes estádios de desenvolvimento, com medida cefalocaudal variando entre 1 e 2 cm (Figura 2). Por outro lado, as ratas do grupo 2 também com 20 dias de prenhez, observaram-se 40 fetos com igual tempo de gestação, sendo que os mesmos apresentaram comprimentos com pequena variação de tamanho (2,1 a 2,2 cm) e a morfologia externa indicava o mesmo estágio de desenvolvimento. Observou-se, ainda,

que no grupo 1 alguns fetos estavam tão deformados e pequenos, que não foi possível medi-los. Todos os fetos do grupo 2 apresentaram movimentos ativos no momento em que foram retirados do útero, ao contrário dos fetos do grupo 1 que estavam inativos, sugerindo que estivessem mortos.

Em relação ao aspecto das células lúteas, nas ratas grávidas, essas células não diferiram entre os grupos com e sem icterícia, porém seis ratas que não desenvolveram gravidez do grupo 1, apresentaram somente corpos lúteos em fase de regressão e em outras oito ratas do mesmo grupo somente *corpo albicans* foram observados. Essas ratas foram as que tiveram os ciclos estrais alterados.

A figura 3 representa o diâmetro dos corpos lúteos nos animais do grupo 1 e grupo 2 em dois períodos da

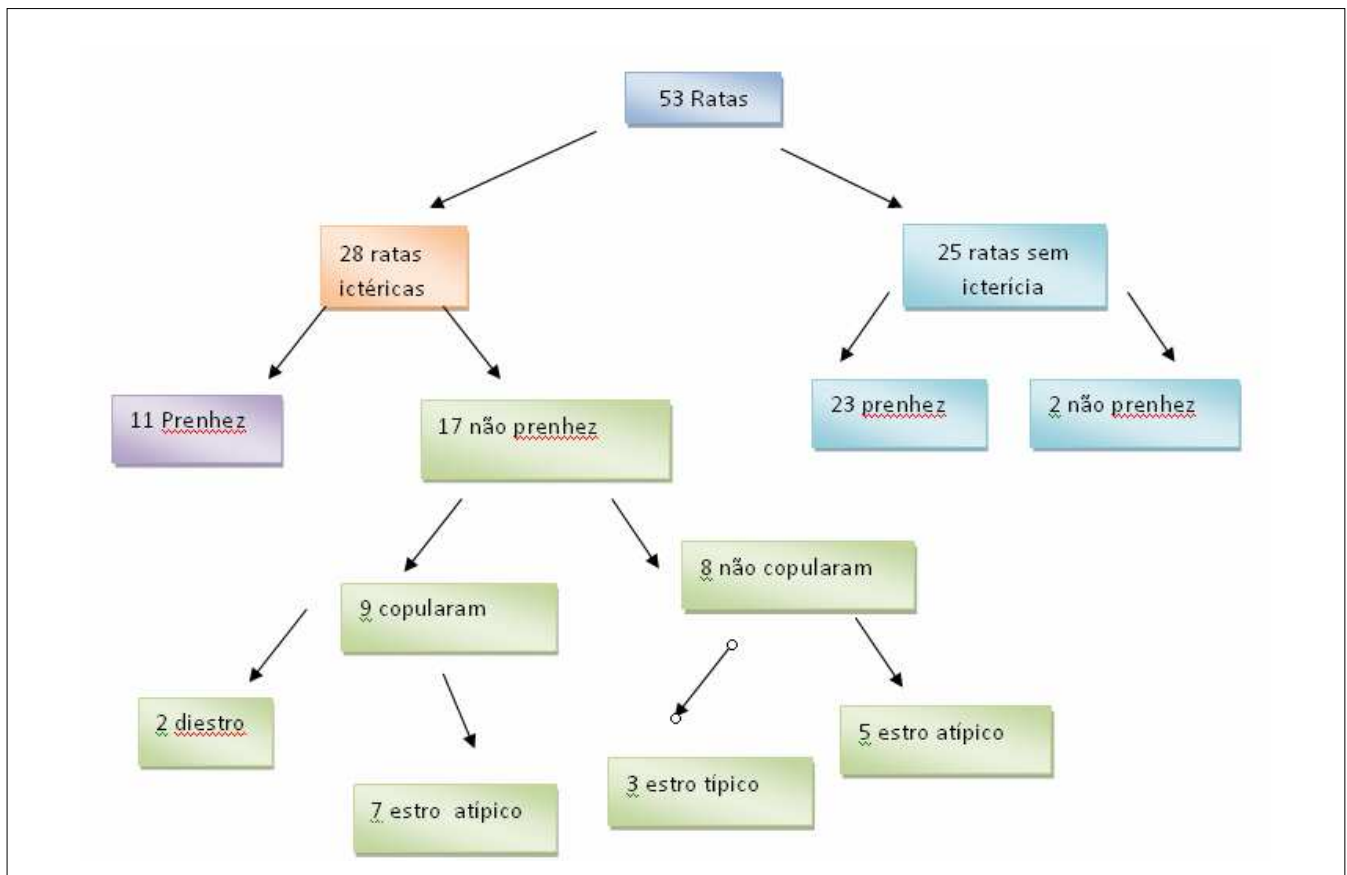


Figura 1 - Distribuição dos animais segundo a evolução de prenhez e cópulas.

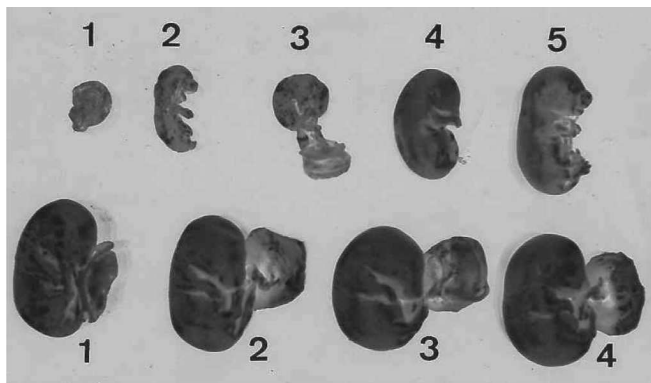


Figura 2 - Cinco fetos do grupo 1 (20 dias de prenhez com ligadura do ducto biliopancreático) (região superior da figura) e quatro do grupo 2 (com 20 dias de prenhez, sem ligadura do ducto biliopancreático) (região inferior da figura). Fixação em Bouin. Observar os diferentes comprimentos e características externas dos fetos do grupo 1, mostrando diferentes estágios de desenvolvimento, diminuição da medida cefalocaudal.

prenhez (12 e 20 dias). Observa-se que os animais com 20 dias de prenhez apresentaram maior diâmetro do corpo lúteo gravídico em ambos os grupos quando comparados aos animais com 12 dias de prenhez ($p < 0,0001$). Entretanto, não foram verificadas diferenças entre os animais do grupo 1 e grupo 2, mostrando não haver influência da hiperbilirrubinemia no desenvolvimento do corpo lúteo gravídico. (Figura 3)

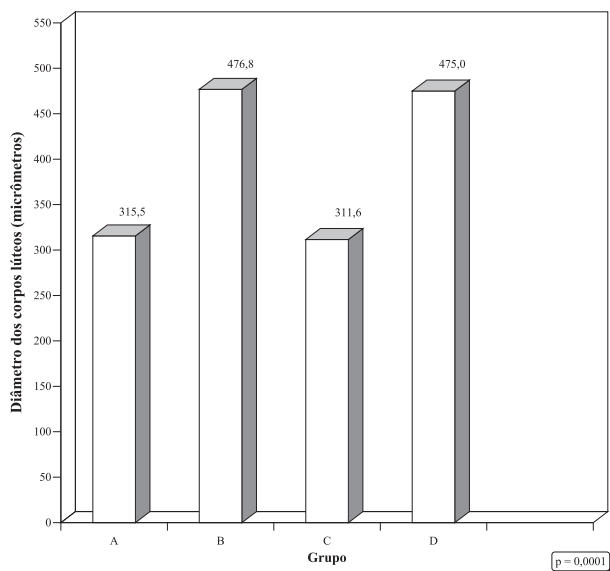


Figura 3 - Comparação do diâmetro médio (em micrômetros) dos corpos lúteos entre os grupos de interesse.

GRUPOS:

A à Animais com 12 dias de prenhez, com ligadura do ducto biliopancreático
 B à Animais com 20 dias de prenhez, com ligadura do ducto biliopancreático
 C à Animais com 12 dias de prenhez, sem ligadura do ducto biliopancreático
 D à Animais com 20 dias de prenhez, sem ligadura do ducto biliopancreático
 $A = C < B = D$ ($p = 0,0001$) (Análise de variância)

Em relação ao peso dos ovários, observou-se um resultado semelhante ao encontrado no diâmetro do corpo lúteo gravídico, onde os animais com 20 dias de prenhez apresentaram maior peso ovariano quando comparados as ratas prenhas com 12 dias ($p < 0,0001$). Da mesma maneira, não houve diferença do peso dos ovários entre os grupos 1 e 2. (Figura 4).

Ressalta-se que não foi observada correlação significativa entre o peso dos animais e as medidas do diâmetro do corpo lúteo e as medidas do peso dos ovários ($p > 0,05$), ou seja, o peso do animal não afeta o diâmetro do corpo lúteo e peso dos ovários. Porém, existe correlação significativa entre o diâmetro do corpo lúteo e o peso dos ovários ($p = 0,0001$ e $r = 0,7038$).

Todos os animais que tiveram o ducto biliopancreático ligado apresentaram alterações microscópicas no fígado. Observou-se intensa proliferação dos ductos intra-hepáticos e infiltrado leucocitário compatíveis com colestase. O aspecto microscópico do fígado nos animais sem ligadura do ducto biliopancreático

DISCUSSÃO

A escolha do rato como o modelo experimental foi baseada em estudos prévios que relatam ser esse o melhor modelo experimental para estudar fenômenos da reprodução por ter seu ciclo estral caracterizado por uma fase lútea curta, permitindo estudos em pequeno intervalo de tempo¹⁷ e de acordo com o modelo de indução de icte-

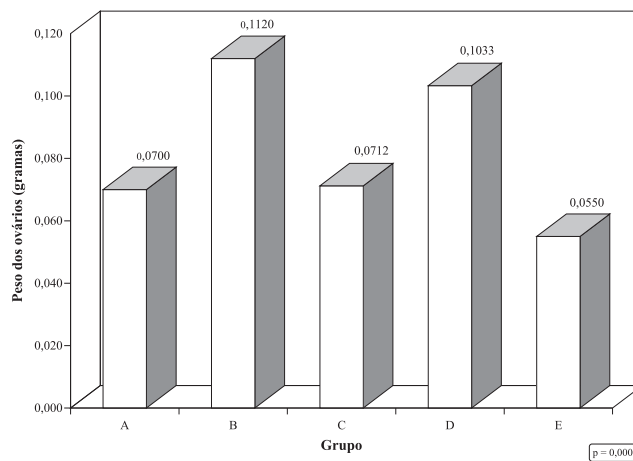


Figura 4 - Comparação do peso (em gramas) dos ovários entre os grupos de interesse.

GRUPO:

A à Animais com 12 dias de prenhez, com ligadura do ducto biliopancreático;
 B à Animais com 20 dias de prenhez, com ligadura do ducto biliopancreático;
 C à Animais com 12 dias de prenhez, sem ligadura do ducto biliopancreático;
 D à Animais com 20 dias de prenhez, sem ligadura do ducto biliopancreático;
 $A = C < B = D$ ($p = 0,0001$) (Análise de variância)

ria descrito por Davis & Yeary (1979) e Zimmermann *et al* e Vasconcellos *et al*.^{11,18,19}. Fatores como a iluminação podem interferir nos ciclos reprodutivos desses animais. Por isso, eles foram mantidos sob condições de iluminação ambiente, com períodos diurnos de claridade e noturnos sem luminosidade.

Por meio dos esfregaços vaginais realizados durante sete dias nos animais destinados ao experimento, foi possível selecionar as ratas com ciclos estrais normais e excluir aquelas com ciclos anormais que permaneciam somente em estro. Nas ratas com ciclos anormais não foram observados corpos lúteos em seus ovários, apenas grandes folículos secundários, indicando a existência de alguma anormalidade intrínseca dos próprios animais. Os esfregaços vaginais realizados nos dias subsequentes ao acasalamento permitiram observar espermatozoides, confirmando a cópula e possível prenhez.

Determinou-se o acasalamento para após o vigésimo terceiro dia pós-operatório, por considerar tempo suficiente para que os animais sofressem as conseqüências da hiperbilirrubinemia e surgimento da fibrose biliar¹⁸. Utilizando-se um macho sabidamente fértil a partir de outros cruzamentos, teve-se a certeza de que o insucesso da fertilização estava relacionado à fêmea, que também havia apresentado prenhez anteriormente a realização do experimento. Em vigência de insucesso na prenhez, a rata poderia voltar a ciclar. Assim, optou-se por separar do macho a fêmea copulada, evitando que um novo cruzamento acontecesse, caso o primeiro não tivesse sucesso.

Os mecanismos que determinam as alterações reprodutivas em mulheres com doenças hepáticas ainda são pouco elucidados. O presente estudo indica que, em presença de icterícia, ocorre cornificação do epitélio vaginal das ratas^{11,18}. Essa alteração poderia ser causada pela hiperbilirrubinemia, que estimula a elevação de estrogênios livre no plasma, pelo deslocamento de seus locais de ligação na albumina²⁰. Hiperplasia uterina já foi descrita em mulheres com doenças hepáticas, sendo que muitas delas foram submetidas a histerectomia por recidivas de hemorragia, devido a hiperestrogenismo²¹.

A constatação de que os diâmetros médios dos corpos lúteos e pesos dos ovários não diferiam entre os animais prenhes operados e não operados sugeriu que a hiperbilirrubinemia não interferiu no desenvolvimento das células lúteas durante a prenhez. O crescimento do corpo lúteo durante a gestação pôde ser comprovado ao se constatar um aumento progressivo no peso dos ovários, tamanho das células e corpos lúteos das ratas dos grupos com doze e vinte dias de prenhez. Entretanto, parece que o crescimento do corpo lúteo foi mais significativo após os doze primeiros dias de prenhez, pois as medidas das células lúteas, diâmetro dos corpos lúteos e peso dos ovários nos grupos com doze dias de prenhez (grupos A e D) não demonstraram alterações estatisticamente significativas em relação ao grupo controle não acasalado sem ligadura do ducto biliopancreático.

O estudo histológico dos ovários das ratas ictericas desta pesquisa mostrou ausência de corpos lúteos funcio-

nais sugerindo a existência de anovulação. A permanência desses animais em uma única fase do ciclo estral (proestro ou estro) reforça a hipótese de anovulação. As ratas que apresentavam apenas corpos brancos em seus ovários tinham também grandes folículos com aspecto cístico. A hipótese de anovulação foi reforçada quando se observou que todos os animais sem ligadura do ducto biliopancreático que foram mortos no período de diestro apresentavam corpos lúteos funcionais em seus ovários.

Ratas prenhes permanecem em diestro durante a gestação²². Nesse período, o principal hormônio secretado pelos corpos lúteos e placenta é a progesterona. Os animais com ligadura do ducto biliopancreático que tiveram prenhez, também permaneceram em diestro, indicando que a hiperbilirrubinemia não interferiu na função secretora dos corpos lúteos gravídicos.

A falta de prenhez em alguns animais copulados pode ter sido decorrente de interferência da hiperbilirrubinemia na fertilização. Outra possibilidade é a ausência de desenvolvimento inicial do ovo ou anomalia em sua implantação²²⁻²⁴. Abortamentos imperceptíveis podem ter ocorrido em decorrência de múltiplas má-formações, como as detectadas no presente trabalho.

Em ratos são descritos quatro estádios de regulação do desenvolvimento fetal intra-uterino. O primeiro se refere à maturação do oócito. O segundo ao período e implantação, quando, por volta do nono dia de prenhez, todos os embriões tendem a estar no mesmo estádio de desenvolvimento. O terceiro é aquele em que a placenta inicia o suplemento de maior quantidade de sangue materno aos embriões, que ainda estão pouco desenvolvidos. O quarto período é antes do nascimento, em que os fetos menores apresentam maior crescimento²¹. É provável que os fetos com desenvolvimento anormal, como os observados neste estudo, cessaram seu crescimento em fases iniciais do desenvolvimento intra-uterino, uma vez que próximo ao nascimento, todos os fetos tendem a apresentar o mesmo estádio de desenvolvimento²¹.

Yeary (1977) não encontrou alterações da prenhez em ratas com icterícia provocada por ligadura do ducto biliopancreático no nono dia de prenhez²⁵. É possível que esse resultado favorável decorra de a colestase ser provocada já no segundo estádio do desenvolvimento embrionário ou talvez porque o tempo de hiperbilirrubinemia tenha sido curto para que se desenvolvesse acentuado acometimento do fígado.

É possível que a passagem das bilirrubinas maternas pelas membranas placentárias contribua para os danos fetais encontrados nesta pesquisa. Estudos prévios em macacos mostraram que a bilirrubina direta não atravessa a membrana placentária^{26,27}. Por outro lado, existe transporte bidirecional da bilirrubina indireta através da placenta.

Novos estudos estão sendo conduzidos em nosso grupo de pesquisa relativos aos aspectos hormonais. A investigação da viabilidade e segurança da fertilização artificial na presença de hiperbilirrubinemia também está sendo investigada, para trazer subsídios ao conhecimento da icterícia e sua relação com a fertilização.

Concluindo, em presença de icterícia obstrutiva, a fertilização é viável, porém a capacidade reprodutiva é reduzida e os ciclos estrais tornam-se irregulares. Nessa situação, o epitélio vaginal permanece cornificado e os corpos lúteos ovarianos regridem. Quando a prenhez acontece, os corpos lúteos gravídicos não são alterados e aumentam de tamanho progressivamente, porém o desenvolvimento fetal é alterado.

Agradecimento

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Ciência e Tecnologia (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa em Minas Gerais (FAPEMIG) e a Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (PRPq) pelos auxílios financeiros que permitiram a realização deste trabalho.

A B S T R A C T

Objective: To assess the influence of jaundice on the reproductive capacity and fetal development in rats. **Methods:** 60 sexually mature rats were divided into two groups: Group 1 (n=30) - submitted to ligation of the biliopancreatic duct and Group 2 (n=30) -control- submitted only to sham operation. 23 days later, the animals were mated with sexually mature males for copulation. Vaginal smears were daily collected in order to verify the presence of spermatozooids and copula. The morphologic aspect of the ovaries and the corpi lutea diameter were studied. The morphology of the embryos of rats that became pregnant were assessed. Serum bilirubin levels were also determined. **Results:** It was observed that 23 rats of the control group (92%) and 11 jaundiced rats (39.3%) became pregnant ($p=0,0002$). The 17 rats with hyperbilirubinemia that did not become pregnant (60.7%) present only involutive corpi lutea and had suffered modifications in their estrous cycles, remaining some days in proestro or estro. The pregnant rats with hyperbilirubinemia did not presented corpi lutea alterations, however their embryos were abnormal. **Conclusion:** In jaundice rats fertilization is viable, the reproductive capacity is intensive reduced, the estrus cycles becomes irregular, the corpi lutea is presented in regression, the gravidic lutea is not modified increasing gradually during the pregnancy and the fetal development is seriously impaired.

Key words: Hiperbilirubinemia. Jaundice, obstructive. Fertilization. Fetal development. Estrous cycle.

REFERÊNCIAS

- Hofmann AF. Biliary secretion and excretion in health and disease: current concepts. *Ann Hepatol.* 2007; 6(1):15-27.
- Arrese M, Reyes H. Intrahepatic cholestasis of pregnancy: a past and present riddle. *Ann Hepatol.* 2006; 5(3):202-5.
- Bruce K, Watson S. Management of intrahepatic cholestasis of pregnancy: a case report. *J Midwifery Womens Health.* 2007; 52(1):67-72.
- Fagan EA. Intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Clin Liver Dis.* 1999; 3(3):603-32.
- Odegaard I, Stray-Pedersen B, Hallberg K, Haanaes OC, Storrøsten OT, Johannesson M. Maternal and fetal morbidity in pregnancies of Norwegian and Swedish women with cystic fibrosis. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2002; 81(8):698-705.
- Ropponen A, Sund R, Riikonen S, Ylikorkala O, Aittomaki K. Intrahepatic cholestasis of pregnancy as an indicator of liver and biliary diseases: a population-based study. *Hepatology.* 2006; 43(4):723-8.
- Sookoian S. Liver disease during pregnancy: acute viral hepatitis. *Ann Hepatol* 2006; 5(3):231-6.
- Rutherford AE, Pratt DS. Cholestasis and cholestatic syndromes. *Curr Opin Gastroenterol.* 2006; 22(3):209-14.
- Mendez-Sanchez N, Chavez-Tapia NC, Uribe M. Pregnancy and gallbladder disease. *Ann Hepatol.* 2006; 5(3):227-30.
- Petroianu A, Oliveira LC, Vieira MI. Delay in gallbladder emptying during the perimenopausal period. *Braz J Med Biol Res.* 2000; 33(9):1037-40.
- Davis DR, Yeary RA. Impaired fertility in the jaundiced female (Gunn) rat. *Lab Anim Sci.* 1979; 29(6):739-43.
- Watchko JF. Hyperbilirubinemia and bilirubin toxicity in the late preterm infant. *Clin Perinatol.* 2006; 33(4):839-52.
- Saiduddin S, Davis DR. Reproductive abnormalities in the prebubertal jaundiced Gunn rat. *Bio Neonate.* 1993; 63(3):177-82.
- Petroianu A. Pesquisa experimental. In: Petroianu A, editor. Ética, moral e deontologia médicas. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000. p.185-90.
- Croney CC, Millman ST. Board-invited review: the ethical and behavioral bases for farm animal welfare legislation. *J Anim Sci.* 2007; 85(2):556-65.
- Shorr E. A new technic for staining vaginal smears. *Science.* 1941; 94(2449): 545-6.
- Ojeda SR, Urbanski HF. Puberty in the rat. In: Knobil E, Neil JD, editors. *The physiology of reproduction.* 2nd ed. New York: Raven Press; 1994. p. 363-408.
- Zimmermann H, Blaser H, Zimmermann A, Reichen J. Effect of development on the functional and histological changes induced by bile-duct ligation in the rat. *J Hepatol.* 1994; 20(3):231-9.
- Vasconcellos LS, Alberti LR, Romeiro JR, Petroianu A. Alterações da morfologia hepática após ligadura do ducto biliopancreático em ratos. *Anais da Faculdade de Medicina do Centro de Ciências da Saúde da UFPE* 2005, 50: 81 – 7.
- Mancuso C, Bonsignore A, Capone C, Di Stasio E, Pani G. Albumin-bound bilirubin interacts with nitric oxide by a redox mechanism. *Antioxid Redox Signal.* 2006; 8(3):487-94.
- Parolin MB, Rabinovitch I, Urbanetz AA, Scheidemantel C, Cat ML, Coelho JC. Impact of successful liver transplantation on reproductive function and sexuality in women with advanced liver disease. *Transplant Proc.* 2004; 36(4):943-4.
- Freman ME. The neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat. In: Knobil E, Neil JD, editors. *The physiology of reproduction.* 2nd ed. New York: Raven Press; 1994. p. 613-4.
- Smith MS, Freeman ME, Neill JD. The control of progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat. *Endocrinology.* 1975; 96(1): 219-26.
- Crisp T. Organization of the ovarian follicle and events its biology: oogenesis, ovulation or atresia. *Mutation Res.* 1992; 296(1):89-106.
- Odegaard I, Stray-Pedersen B, Hallberg K, Haanaes OC, Storrøsten OT, Johannesson M. Maternal and fetal morbidity in pregnancies of Norwegian and Swedish women with cystic fibrosis. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2002; 81(8):698-705.
- Yeary RA. Embryotoxicity of bilirubin. *Am J Obstet Gynecol.* 1977; 127(5):497-8.

27 .Briz O, Macias RI, Serrano MA, Gonzalez-Gallego J, Bayon JE, Marin JJ. Excretion of foetal bilirubin by the rat placenta-maternal liver tandem. *Placenta*. 2003; 24(5): 462-72.

Recebido em 20/10/2008

Aceito para publicação em 08/01/2009

Conflito de interesse:

Fonte de financiamento: FAPEMIG/ CNPq/ PRPq-UFMG.

Como citar este artigo:

Resende V, Petroianu A, Alves MSD, Alberti LR. Influência da icterícia obstrutiva na capacidade reprodutiva, desenvolvimento fetal e morfologia ovariana. *Rev Col Bras Cir*. [periódico na Internet] 2009; 36(2). Disponível em URL: <http://www.scielo.br/rcbc>

Endereço para correspondência:

Prof. Andy Petroianu

E-mail: petroian@medicina.ufmg.br