

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA

ALEXANDRE SERGIO CABRAL DE BRITO

EXPOSIÇÃO DE RATAS ADULTAS A DOSES CRÔNICAS DE
AGUARDENTE: ESTUDO PONDERAL E
HISTOMORFOLÓGICO DO CORAÇÃO

Recife, 2004

ALEXANDRE SERGIO CABRAL DE BRITO

***EXPOSIÇÃO DE RATAS ADULTAS A DOSES CRÔNICAS DE
AGUARDENTE: ESTUDO PONDERAL E
HISTOMORFOLÓGICO DO CORAÇÃO***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Anatomia Patológica do Departamento de Patologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco para obtenção do grau de Mestre em Anatomia Patológica

ORIENTADOR:

Prof. Dr. NICODEMOS TELES DE PONTES FILHO

Professor do Departamento de Patologia
Centro de Ciências da Saúde
Universidade Federal de Pernambuco

CO-ORIENTADOR:

Prof. Dr. AGEU MAGALHÃES FILHO

Professor do Departamento de Patologia
Centro de Ciências da Saúde
Universidade Federal de Pernambuco

RECIFE

2004

Brito, Alexandre Sergio Cabral de

Avaliação das alterações ponderais e histomorfológicas do coração de ratas adultas expostas a doses crônicas de aguardente / Alexandre Sergio Cabral de Brito. – Recife: O Autor, 2004.

45 folhas : il., graf.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Anatomia Patológica, 2004.

Inclui bibliografia e anexos.

1. Coração – Fibrose – Alcoolismo. 2. Fibrose – Coração – Uso do álcool. 3. Morfometria – Metodologia – Uso. 4. Histologia – Colágeno – Fibroblasto. I. Título.

616.12-007.61CDU (2.ed.) UFPE

616.12 CDU (21.ed.) BC2004-033

ALEXANDRE SERGIO CABRAL DE BRITO

***EXPOSIÇÃO DE RATAS ADULTAS A DOSES CRÔNICAS DE
AGUARDENTE: ESTUDO PONDERAL E
HISTOMORFOLÓGICO DO CORAÇÃO***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Anatomia Patológica do Departamento de Patologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco para obtenção do grau de Mestre em Anatomia Patológica



Prof. Dr. José Valfrido de Santana UFPE – PE



Prof (a). Dr (a). Paloma Lys de Medeiros UFPE – PE



Prof. Dr. Roberto José Vieira de Mello UFPE – PE

RECIFE

2004

Mestrado em Anatomia Patológica - UFPE

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Dermeval e Joselma Cabral

Ao meu irmão Dermeval Filho

A minha namorada Andrea Palmeira

Ao Orientador Prof. Dr. Nicodemos Teles Pontes Filho

AGRADECIMENTOS

Prof. Dr. Roberto Vieira - Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Anatomia Patológica.

Sônia e Zenaide – Secretarias da coordenação do Programa de Pós-Graduação em Anatomia Patológica.

Silvânia – Laboratório de Histopatologia do Programa de Pós-Graduação em Anatomia Patológica.

Carmelita e Mário - Setor de Patologia, LIKA - UFPE

França, Amilton e Ana - Biotério de Nutrição - UFPE

Ulisses Montarroyos – confecção dos gráficos e análises dos resultados.

As professoras Maria do Carmo Santos e Liliana Vieira – correção gramatical portuguesa e inglesa.

A Etiene Lima – bibliotecária do CCB/UFPE, correção pelas normas da ABNT.

RESUMO

A proposta do presente estudo foi de avaliar as alterações ponderais e histomorfológicas do coração de ratas Wistar adultas expostas a doses crônicas de aguardente. Os animais (n = 48), foram alimentados com dieta contendo 23% de proteína (“Labina” - Purina), e divididos em dois grupos experimentais a partir do 50º dia de vida: 1) Grupo Controle (GC), (n = 24) recebendo 3,8 ml de água filtrada por gavagem e 2) Grupo aguardente (GA), (n = 24) recebendo 3,8 ml de aguardente “*in natura*” por gavagem. As gavagens foram feitas, diariamente a partir do 50º dia de vida e durante 40 (n = 8); 50 (n = 8); e, 60 (n = 8) dias de experimento. Durante o experimento os animais foram pesados diariamente. Após a perfusão foi extraído o coração, que foi pesado e fixado em formalina tamponada a 10% por 48h. Posteriormente, foi retirada a parede ventricular esquerda, e desta foram obtidos três fragmentos: superior, médio e inferior, obtendo-se de cada um deles dois cortes histológicos corados pela Hematoxilina-Eosina e Tricrômico de Masson. Não se observou diferença estatística no peso corporal nos três períodos do experimento 40 (p = 0,287), 50 (p = 0,659) e 60 (p = 0,369) dias, entre os grupos. Em relação ao peso cardíaco úmido, também não houve diferença estatística, nos três períodos do experimento 40 (p = 0,125), 50 (p = 0,337) e 60 (p = 0,599) dias. Na morfometria, constatou-se aumento do número médio de vasos cardíacos do grupo aguardente em relação ao grupo controle em todos os períodos de tratamento, havendo diferença tanto no fragmento superior (p < 0,001), médio (p < 0,001), e inferior (p < 0,001). Em relação ao diâmetro médio dos vasos cardíacos do endomiocárdio, não houve diferença estatística entre os fragmentos (superior, médio e inferior) estudados: 40 (p = 0,957), 50 (p = 0,268) e 60 (p = 0,296) dias, nos dois grupos analisados. No aspecto histológico, não se observou a presença de áreas de depósito de colágeno perivascular e intersticial, nos grupos estudados. Concluiu-se que, ratas expostas a doses crônicas de aguardente “*in natura*” por 40, 50 e 60 dias não tem alteração na evolução do peso corporal e cardíaco. Ainda que não tenha ocorrido fibrose cardíaca com o protocolo adotado, mas foi observado um aumento no número de vasos, o que acarretaria maior oxigenação ao músculo cardíaco, e conseqüentemente a inibição das lesões provocadas pelo álcool. Desta forma, acreditamos que novos estudos precisam ser desenvolvidos no sentido de melhor compreender os mecanismos patológicos através dos quais o álcool, presente nas bebidas alcoólicas, atua na patogênese da Doença Cardíaca Alcoólica (DCA).

Palavras-chaves – alcoolismo, fibrose, rato.

ABSTRACT

The proposal of the study present was to evaluate the alterations ponders and histomorfological of the heart of adult Wistar rats exposed chronic doses of alcohol. The animals (n = 48), had been fed with diet contend 23% of protein ("Labina" - Purina), and divided in two experimental groups from the 50th day of life: 1) Control group (GC), (n = 24) receiving 3,8 ml from water percolated for gavage and 2) Alcohol Group (GA), (n = 24) receiving 3,8 ml from alcohol "*in natura*" for gavage. The gavagens had been made, daily from the 50th day of life during 40 (n = 8); 50 (n = 8); and, 60 (n = 8) days of experiment. During the experiment the animals had been weighed daily. After the perfusion was extracted the heart, that was weighed and fastened in formalin buffered to 10% for 48h. Afterwards, it was removed the left ventricular wall, and of these three fragments had been gotten: superior, medium and inferior, getting itself of each one of them two cuts histological colored by Hematoxilina-Eosina and Tricrômico de Masson. Statistical difference in the corporeal weight in the three periods of the experiment 40 was not observed (p = 0,287), 50 (p = 0,659), and 60 (p = 0,369) days, among groups. In relation to the humid cardiac weight, also it did not have statistical difference (p = 0,395). In the morphometric study, it verified increase of the average number of cardiac vases of the alcohol group in relation to the control group in all treatment periods, having difference so much in the superior fragment (p < 0,001), medium (p < 0,001), and inferior (p < 0,001). In relation to the average diameter of the cardiac vases of endomyocardiac, it did not have statistical difference among studied fragments (superior, medium and inferior): 40 (p = 0,957), 50 (p = 0,268) and 60 (p = 0,268) das, in the two analyzed groups. In the aspect histological, the presence of collagen per vascular deposit areas was not observed and interstitial, in the groups. It concluded that, rats exposed the chronic doses of alcohol "*in natura*" for 40, 50 and 60 days do not have alteration in the evolution of the corporeal and cardiac weight. Still that cardiac fibrosis with the adopted protocol, observed an increase in the number of vases, followed a rise oxigenation by cardiac muscle, in this wa an inibithion of alcoholic injuries. Thus, we believe that new studies need to be developed in the direction of better to understanding the pathological mechanisms through which the alcohol, present in alcoholic beverages, act in pathogeneses of the Alcoholic Cardiac Disease (DCA).

Key words – alcoholism, fibrosis, rat.

LISTA DE FIGURAS

	Pág
Figura I. Peso corporal médio dos animais do grupo aguardente (GA) e grupo controle (GC), aos 40 dias de tratamento. Ratas Wistar (n = 8). 40 dias (p = 0,287).	25
Figura II. Peso corporal médio dos animais do grupo aguardente (GA) e grupo controle (GC), aos 50 dias de tratamento. Ratas Wistar (n = 8). 50 dias (p = 0,659).	25
Figura III. Peso corporal médio dos animais do grupo aguardente (GA) e grupo controle (GC), aos 60 dias de tratamento. Ratas Wistar (n = 8). 60 dias (p = 0,369).	26
Figura IV. Peso cardíaco médio dos animais do grupo aguardente (GA) e grupo controle (GC) nos diferentes tempos de tratamento. Ratas Wistar. 40 dias (n = 8; p = 0,125); 50 dias (n = 8; p = 0,337) e 60 dias (n = 8; p = 0,599).	26
Figura V. Número médio de vasos cardíacos do endomiocárdio dos animais do grupo aguardente (GA) e do grupo controle (GC) aos 40 dias de tratamento. Ratas Wistar (n = 8). 40 dias (p < 0,001).	27
Figura VI. Número médio de vasos cardíacos do endomiocárdio dos animais do grupo aguardente (GA) e do grupo controle (GC) aos 50 dias de tratamento. Ratas Wistar (n = 8). 50 dias (p < 0,001).	28
Figura VII. Número médio de vasos cardíacos do endomiocárdio dos animais do grupo aguardente (GA) e do grupo controle (GC) aos 60 dias de tratamento. Ratas Wistar (n = 8). 60 dias (p < 0,001).	28
Figura VIII. Diâmetro de vasos cardíacos médios dos animais do grupo aguardente (GA) e do grupo controle (GC) aos 40 dias de tratamento. Ratas Wistar (n = 8). 40 dias (p = 0,957).	29
Figura IX. Diâmetro de vasos cardíacos médios dos animais do grupo aguardente (GA) e do grupo controle (GC) aos 50 dias de tratamento. Ratas Wistar (n = 8). 50 dias (p = 0,268).	29
Figura X. Diâmetro de vasos cardíacos médios dos animais do grupo aguardente (GA) e do grupo controle (GC) aos 60 dias de tratamento. Ratas Wistar (n = 8). 60 dias (p = 296).	29

SUMÁRIO

	Pág
1. INTRODUÇÃO	9
1.1 Álcool e Doença Cardíaca Alcoólica (DCA)	9
1.2 Cardiomiopatias e Doenças Cardíacas Alcoólicas (DCA)	11
1.3 Organização histológica e matriz colágena do coração	15
2. OBJETIVOS	19
2.1 Objetivos específicos	19
3. MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1 Animais	20
3.2 Análise do peso corporal	20
3.3 Perfusão	21
3.4 Procedimento histológico	22
3.5 Estudo morfométrico	22
3.6 Estudo estatístico	23
3.7 Aspectos éticos	24
4. RESULTADOS	25
4.1 Peso corporal	25
4.2 Peso úmido cardíaco	26
4.3 Análise morfométrica e histológica do coração	27
4.3.1 Contagem do número médio dos vasos do endomiocárdio	27
4.3.2 Diâmetro médio dos vasos cardíacos do endomiocárdio	27
4.3.3 Análise histológica	28
5. DISCUSSÃO	30
6. CONCLUSÕES	31
7. REFERÊNCIAS	36
ANEXOS	45

1. INTRODUÇÃO

1.1 ÁLCOOL E DOENÇA CARDÍACA ALCOÓLICA (DCA)

O termo alcoolismo foi proposto pelo médico sueco Magnus Huss (1849) e inclui alterações que atingem vários órgãos e sistemas do organismo humano, principalmente o digestivo, o endócrino, o nervoso central e periférico (HUSS, 1849 apud RAMOS; BERTOLOTE, 1997).

Defini-lo não é tarefa simples, mas segundo a Décima Classificação Internacional de Doenças (CID-10) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1993), o alcoolismo é entendido “como o uso padronizado de uma substância alcoólica que causa dano físico ou mental”.

Segundo Chick (1994), Joyce (1994), Ramos; Bertolote (1997), o alcoolista crônico é acometido por três desordens:

- Social (dificuldade em se relacionar com a família e o emprego);
- Psiquiátrica (presença de distúrbios depressivos e ansiedade); e,
- Patofisiológica (anormalidade da função fisiológica).

O álcool é um líquido incolor, volátil, com odor etéreo, obtido por meio da fermentação de uma solução que contém açúcar. O álcool etílico, ou etanol cuja fórmula química é C_2H_5OH (hidróxido ou radical orgânico), é encontrado em todas as bebidas ditas alcoólicas. Tais bebidas são descritas literalmente como qualquer líquido potável, dotado de teor alcoólico, entre 37 a 50% por volume. Todas elas estão enquadradas dentro de três categorias básicas (ALCOOLISMO E RECUPERAÇÃO, 2003):

- Fermentadas: produzidas por meio da fermentação de grãos e frutas;
- Destiladas: resultantes da destilação de bebidas fermentadas; e,

- Compostas: resultantes da combinação entre bebida fermentável e destilada, contendo substâncias aromatizantes.

O álcool ingerido é rapidamente absorvido no estômago (20%) e no intestino delgado (80%), distribuindo-se praticamente por todos os tecidos, em ordem crescente, a maior concentração ocorre no sangue, cérebro, rins, pulmões, coração, paredes intestinais, músculos estriados e fígado (SEIZI, 1996).

Os mecanismos fisiopatológicos que levam o álcool, a lesar as células miocárdicas, continuam sendo intensamente investigados (SEGEL, 1988; RIBIERE et al., 1992). Vários mecanismos, tais como: acúmulo de triglicérides, diminuição de catecolaminas e da resposta do miofilamento ao Ca^{2+} e inibição da síntese protéica cardíaca, foram postulados para justificar o efeito lesivo do álcool sobre o coração (TERAGAKI; TAKEUCHI; TAKEDA, 1993; PREEDY; RICHARDSON, 1994; THOMAS et al., 1994; BARAONA; LIEBER, 1998). Segundo Wynne; Braunwald (1987), Diamond (1989), Zamorano (1995), ocorre perda ou rompimento de miofibrilas, e dilatação do retículo endoplasmático dos miócitos após consumo de álcool em longo prazo.

Substâncias adicionais, como os sais de cobalto, utilizados na fabricação de bebidas alcoólicas têm sido apontadas como elementos co-determinantes das lesões celulares na musculatura cardíaca (OKADA, 1989). O cobalto junto com o álcool encontrado na composição da aguardente eleva a cardiotoxicidade (KESTELOOT et al., 1992).

Radicais livres como ânions de oxigênio, gerados pelo metabolismo do álcool, influem na disfunção cardíaca, esta alteração cardíaca foi observada

em animais intoxicados pelo álcool (McCORD, 1986; REINKE et al., 1987). Tais disfunções estão relacionadas às lesões das mitocôndrias do músculo cardíaco (VENDEMIALE et al., 1998; GRATAGLIANO et al., 1999), o qual, contribui para a patogênese da DCA (JAARTINEM; SANKKO; HERVONEN, 1993).

O dano às células miocárdicas tem sido atribuído a uma ação tóxica direta do próprio álcool ou por meio de seus metabólitos, especialmente o acetaldeído (SCHOENN, 1994). Estudo realizado por Ren; Brown (2000), demonstrou que o acetaldeído, causa disfunção cardíaca, porque atua reduzindo a contratilidade dos miocardiócitos.

Experiências em ratos demonstraram que o álcool e o acetaldeído, em doses agudas podem produzir necrose cardíaca, desde que essas substâncias sejam mantidas em níveis elevados no sangue, como por exemplo, através da administração intragástrica de álcool ou por repetidas inalações de acetaldeído (ZABIROVA, 1983).

1.2 CARDIOMIOPATIAS E DOENÇA CARDÍACA ALCOÓLICA (DCA)

Os efeitos clínicos e patológicos do álcool no trato gastrointestinal e no sistema nervoso central já foram descritos na literatura (HOGNESTAD; TEISBERG, 1973). Da mesma forma hepatopatias decorrentes do abuso do álcool são amplamente relatadas desde o período Hipocrático (RUBIN, 1979). No entanto, apenas na década de 1970, foi reconhecida a participação do álcool como fator desencadeante de disfunções cardíacas (BURCH; GILES, 1977).

A primeira descrição de insuficiência cardíaca crônica relacionada ao uso abusivo do álcool foi feita por Wood em 1847, reforçada por Walshe, em 1873, e posteriormente por Bolliger, em 1884, e Stell (1893 apud RUBIN, 1979). A partir de então, a associação entre alcoolismo e doença cardíaca alcoólica é reconhecida, estudada e documentada, repetidamente (EDMONDSON, 1980; URBANO-MÁRQUEZ et al., 1995).

A definição de cardiomiopatia como “uma doença subaguda ou crônica do miocárdio, sem componente vascular ateromatoso presente”, foi proposta por Goodwin em 1951 (GOODWIN, 1951 apud GOODWIN; OAKCLEY, 1972). Posteriormente, em 1971, Oakcley a descreveu como um “distúrbio do músculo cardíaco de causa ou associações desconhecidas” (GOODWIN; OAKCLEY, 1972), sendo assim aceita pela Organização Mundial de Saúde e pela International Society and Federation of Cardiology (GOODWIN, 1990).

Goodwin (1970), baseado em achados clínicos e hemodinâmicos, classificou as cardiomiopatias em:

- Congestiva;
- Hipertrofica (obstrutiva); e,
- Restritiva.

A cardiomiopatia congestiva produz uma síndrome clínica e hemodinâmica representada por redução da função sistólica, decorrente da diminuição da força de ejeção ventricular esquerda. Seus portadores usualmente desenvolvem insuficiência cardíaca congestiva com cardiomegalia, dilatação das cavidades ventriculares (principalmente esquerda) e hipertrofia miocárdica difusa (SILVA, 1995). Uma possível causa

dessa doença parece ser a ação de drogas, tais como: adriamicina, furazolidona e o álcool (CZARNECKI, 1984).

A cardiomiopatia hipertrófica, também referida como cardiomiopatia obstrutiva, caracteriza-se por prejuízo da função diastólica em face de acentuada hipertrofia miocárdica. Na maioria dos pacientes, a hipertrofia está presente no septo interventricular e na parede ântero-lateral do ventrículo esquerdo. Histologicamente, além de hipertrofia, observa-se intensa desorganização das células miocárdicas. É dita obstrutiva, quando há impedimento ao trajeto do fluxo sanguíneo no ventrículo esquerdo, simulando estenose aórtica (CECCHI et al., 1990; SILVA, 1995).

A cardiomiopatia restritiva, outrora denominada obliterativa, é definida como resultante de um defeito primário no relaxamento diastólico, sendo a forma menos comum das cardiomiopatias.

As formas congestiva e hipertrófica, embora sejam raras nas regiões temperadas, corresponde a grande maioria dos casos estudados (SILVA, 1995).

Em 1991, uma quarta modalidade foi incluída no grupo das cardiomiopatias, consistindo em uma displasia arritmogênica do ventrículo direito, caracterizada por infiltração gordurosa, fibrose focal miocárdica e elevada incidência de perturbações no ritmo cardíaco (DÉCOURT, 1995; SILVA, 1995).

Considerando-se que o termo cardiomiopatia inclui alterações primárias do músculo cardíaco de etiologia desconhecida, denominam-se como doenças específicas do músculo cardíaco ou cardiomiopatias secundárias, as disfunções ou alterações miocárdicas de origem e etiologia conhecidas, como:

a miocardite infecciosa e as miocardiopatias por hemocromatose ou amiloidose (EDWARDS, 1987; GOODWIN, 1990; SCHOENN, 1996).

Pelo mesmo motivo, prefere-se denominar doença cardíaca alcoólica (DCA), aquela relacionada ao abuso do álcool (OKADA, 1989). A doença cardíaca alcoólica possui um quadro clínico bastante similar a cardiomiopatia dilatada decorrente do uso abusivo e prolongado do álcool, sendo por isso, chamada erroneamente, cardiomiopatia alcoólica (URBANO-MÁRQUEZ et al., 1995). Segundo os trabalhos de Richardson; Wodak (1983) e Richardson et al. (1986), a DCA somente se desenvolve em indivíduos que consomem em torno de 80 miligramas diários de álcool, por 10 anos ou mais, ou fazem uma ingestão excessiva de 250 gramas em curto intervalo de tempo. Clinicamente, os pacientes com DCA têm função cardíaca mais preservada do que os pacientes com cardiomiopatia dilatada.

Macroscopicamente, observou-se nas autópsias, aumento do volume e peso cardíaco, dilatação das câmaras e hipertrofia das paredes ventriculares, envolvendo, particularmente, o ventrículo esquerdo (ASKANAS; UDOSHI; SADJAD, 1980; OKADA, 1989), diferentemente da cardiopatia beri-bérica, que é clinicamente semelhante a DCA, porém de caráter basicamente nutricional, e onde a dilatação das câmaras e a hipertrofia das paredes ocorrem no ventrículo direito (SOKOLOW; MCILROY; CHEITLIN, 1990).

Para estabelecer a diferença entre a doença cardíaca alcoólica e a cardiomiopatia dilatada, é necessária a biopsia endomiocárdica ventricular. Microscopicamente, a hipertrofia dos miócitos, a fibrose, e as mudanças nucleares são menos significativas na DCA em relação a cardiomiopatia dilatada. A morfometria comparativa das duas doenças revela que na DCA os

miócitos têm menor diâmetro e a fibrose intersticial é menor em comparação a cardiomiopatia dilatada (TERAGAKI; TAKEUCHI; TAKEDA, 1993). Maia et al. (2002) referem que a DCA apresenta fibrose perivascular e intersticial miocárdica de intensidade variável, assim como depósitos de lipofuscina e vacuolização dos miocardiócitos. A vacuolização para esses autores corresponde, pelo menos em parte, a acúmulo de lipídios neutros.

Além das alterações das fibras musculares cardíacas, há indícios de que o álcool altera a microcirculação miocárdica, e também distorce o diâmetro do lúmen vascular (HOGNESTAD; TEISBERG, 1973; FACTOR, 1976). Em 1963, Benchimol; Schlesinger já descreviam hemorragias nos vasos coronarianos em alcoolistas, no estágio inicial da DCA (BURNS; HULEWIEZ, 1990). Uma das hipóteses levantadas para explicar a patogênese dessas lesões é a isquemia crônica que causa lesão degenerativa das principais artérias coronárias, que assim originam a hipóxia e os distúrbios circulatórios que contribuem para a gênese da DCA (GRATTAGLIANO et al., 1999; MANSOURI et al., 2001; VENDEMIALE et al., 2001).

1.3 ORGANIZAÇÃO HISTOLÓGICA E MATRIZ COLÁGENA DO CORAÇÃO

O coração é um órgão muscular que se contrai ritmicamente, impulsionando o sangue no sistema circulatório. Suas paredes apresentam-se constituídas por três túnicas: a interna, o endocárdio; a média, o miocárdio; e a externa, o pericárdio. O coração tem uma porção central fibrosa que lhe serve de ponto de apoio: é o esqueleto fibroso do coração. Além dessas estruturas observam-se neste órgão as válvulas cardíacas e um sistema gerador e condutor do estímulo elétrico cardíaco (BRAUNWALD, 1991).

O miocárdio é composto pelos compartimentos muscular, vascular e intersticial. O interstício, que serve como suporte para músculos cardíacos e vasos sanguíneos, é constituído pelo epi-, peri- e endomísio que são compostos principalmente por fibras colágenas. A proteína elastina está presente, porém em menor extensão, principalmente no interior do endocárdio e epicárdio (DOERING et al., 1988). O epimísio é uma bainha de tecido conectivo que envolve todo músculo cardíaco. O perimísio está associado ao agrupamento celular, e o endomísio envolve e interconecta as células individualmente (ROBINSON et al., 1988).

A matriz colágena do miocárdio é composta, primariamente, por colágeno tipo I (85%), predominantemente agregado a fibras espessas, e tipo III (11%), organizado em fibrilas menores. Sintetizada por fibroblastos cardíacos, essa matriz é o principal fator determinante da arquitetura e integridade estrutural sendo responsável pelas propriedades mecânicas do miocárdio (WEBER, 1989).

O fibroblasto é a célula responsável pela síntese das proteínas da matriz extracelular cardíaca, (CARVER; TERRACIO, 1993; BELARDINELLI et al., 1995). Essas células são sensíveis às mudanças nas propriedades mecânicas e químicas no tecido cardíaco, como por exemplo, a pressão alta, a alteração mecânica na força de contração e a alteração dos perfis dos mediadores químicos. O fibroblasto cardíaco adapta-se a essas alterações fisiológicas e químicas modificando sua estrutura e organização (McCEWAN et al., 1998), por meio da síntese de proteínas da matriz (principalmente colágeno) e de receptores para mediadores químicos, e pela secreção de enzimas proteolíticas (TERACCIO et al., 1991; MANN; SPINALE, 1998; TYAGI et al., 1998;

VILLAREAL; BAHNSON; KIM, 1998) o que contribui para remodelar a matriz extracelular cardíaca (SUN et al., 2000).

É nesta matriz que, em resposta a estados alterados da função cardíaca, ocorre proliferação fibroblástica, havendo aumento da síntese de colágeno, levando à hipertrofia dos miocardiócitos e distúrbios das funções cardíacas (DOERING et al., 1988). Como conseqüência, há aumento da pressão no ventrículo esquerdo, levando a hipocontratibilidade cardíaca (TURTO; LINDY; HALME, 1987), condições observadas nas cardiopatias hipertensiva e cardiomiopatias hipertrófica e dilatada (WEBER, 1989; UNVERFERTH et al., 1996).

A fibrose é caracterizada por acúmulo de colágeno proveniente do tecido conjuntivo, no coração, podendo ser perivascular e/ou intersticial (WEBER; BRILLA, 1991) A área fibrótica consiste principalmente de fibroblastos e proteínas da matriz extracelular (GRIMM et al., 2001). Esta alteração na estrutura cardíaca traz como conseqüência o surgimento de hipóxia e alteração na contratilidade cardíaca, o que contribui para a hipertrofia ventricular esquerda, a qual, está por sua vez associada às disfunções cardiovasculares, como o infarto do miocárdio, a congestão cardíaca e a falência cardíaca (LEVY et al., 1990).

Embora o consumo de bebidas alcoólicas, seja considerado nocivo ao coração (RIBIERE et al., 1992) estudos epidemiológicos recentes, sugerem que o consumo moderado de álcool reduz o risco de doenças cardiovasculares (CRIQUI, 1996; HEIN; SUADICANI; GYNTELBERG, 1996; RIMM et al., 1996).

Bebidas como o vinho, largamente consumido em países de clima frio, possuem efeito cardioprotetor, sugerindo-se que essa ação seja decorrente dos antioxidantes presentes nessas bebidas (LAUTERBURG et al., 1995).

No entanto, segundo Pontes-Filho (2003), não há referência sobre o padrão de consumo de bebidas alcoólicas pela população do nordeste brasileiro, embora seja bastante difundida, nessa região, a ingestão de bebida alcoólica extraída da cana-de-açúcar denominada “aguardente” com teor de etanol em torno de 42%. Se tal prática for significativa, poderá pôr em risco essa população, pela possibilidade do desenvolvimento da DCA em indivíduos expostos a doses crônicas dessa bebida destilada, trazendo prejuízos econômicos e da qualidade de vida, nesta região.

Assim, pareceu-nos oportuno o desenvolvimento de um protocolo experimental utilizando a bebida acima referida. Para tal finalidade baseamos-nos na hipótese de que ratas expostas de forma crônica à aguardente podem apresentar alterações cardíacas.

2. OBJETIVOS

Realizar o estudo ponderal e histomorfológico do coração de ratas submetidas a doses crônicas de aguardente.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.1.1 – Avaliar a evolução do peso corporal;

2.1.2 – Comparar o peso úmido cardíaco dos diferentes grupos; e,

2.1.3 – Proceder à análise morfométrica e o estudo histológico do coração, analisando os seguintes parâmetros no endomiocárdio:

- Número médio dos vasos;
- Diâmetro médio dos vasos; e,
- Área do depósito do colágeno perivascular e intersticial.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram utilizadas 48 ratas da linhagem Wistar com 50 dias de vida, provenientes da colônia do Biotério do Departamento de Nutrição do CCS / UFPE, as quais foi mantido em ambiente com ciclo claro-escuro por 12 horas (luminosidade entre 7:00 e 19:00 horas), com temperatura de $23 \pm 1^\circ\text{C}$, com sistema de exaustão, em gaiolas plásticas com grades metálicas (33x40x17 cm) e com oferta de água filtrada *ad libitum* e alimentadas com dieta comercial de manutenção com 23% de proteínas (LABINA® – Purina do Brasil) durante todo o experimento.

Os animais foram divididos em dois grupos:

Grupo controle (GC)

Constituído por 24 ratas submetidas à gavagem (técnica de administração de líquidos no animal, via intragástrica por meio de cânula), recebendo 3,8ml de água filtrada. As gavagens foram feitas, diariamente (entre as 7:00 e 9:00 horas da manhã) a partir do 50º dia de vida e durante 40 (n = 8); 50 (n = 8); e, 60 (n = 8) dias de experimento.

Grupo aguardente (GA)

Constituído por 24 ratas que receberam por gavagem 3,8ml de aguardente “*in natura*”, em lugar de água, em mesmo número e períodos do grupo controle.

A composição química da aguardente apresenta diversos tipos de álcoois e é adocicada (Anexo 1).

3.2 ANÁLISE DO PESO CORPORAL

Os animais foram pesados a partir do 50º dia de vida, diariamente, até o final do experimento (90, 100, 110 dias de vida).

3.3 PERFUSÃO

A perfusão foi realizado no setor de Patologia do LIKA, onde os animais foram anestesiados, por via intraperitoneal, com solução aquosa contendo uma mistura de Uretana a 10% (1g/kg) e Cloralose a 0,4% (40 mg/kg) de acordo com o peso corporal. Para execução da perfusão procedeu-se ampla abertura do tórax para exposição do coração. Após a injeção de 0,1 ml de heparina (Liquemine®) no ventrículo esquerdo, para evitar a coagulação sanguínea, introduziu-se na mesma região uma cânula de polietileno (por onde foram injetadas as soluções de perfusão) e concomitantemente fez-se a abertura do átrio direito. Desta forma, tanto o sangue quanto as soluções de perfusão eram eliminadas por aquela abertura, com o auxílio de um compressor com pressão regulada em torno de 90 mmHg. Para a remoção do sangue e manutenção da integridade tecidual, injetou-se através da cânula um volume em torno de 100 a 150 ml de uma solução de tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7.2, contendo 0,9 % por volume de NaCl. A seguir, perfundiu-se um volume em torno de 150 a 300 ml de formaldeído a 10%, diluído em tampão fosfato, controlando-se a fixação do tecido pelo volume inoculado e a rigidez do pescoço e dos membros. Finalizada a perfusão procedeu-se à retirada do coração que foi lavado e pós-fixado em formalina tamponada a 10% por 48h. Posteriormente, após a pesagem da viscera, foi retirada a parede ventricular esquerda, a partir da inserção da aorta, dissecando-se toda a parede ventricular. Desse segmento da parede

foram feitos dois cortes transversais obtendo três fragmentos: superior, médio e inferior, com espessura média de 1 a 1,5µm.

3.4 PROCEDIMENTO HISTOLÓGICO

Para o estudo histológico foram utilizados dois cortes histológicos de cada fragmento obtidos da parede ventricular esquerda, os quais foram submetidos à rotina histológica e incluídos em parafina. Os cortes histológicos (4µm) foram obtidos em micrótomo horizontal Yamato (Japan) e corados com Hematoxilina-Eosina (HE) para avaliação histológica geral; e o Tricrômico de Masson (TM) para o estudo da distribuição dos depósitos de colágeno. Em seguida, as preparações foram examinadas em microscópio óptico (Olympus, BH – 2).

3.5 ESTUDO MORFOMÉTRICO

O estudo morfométrico foi realizado no Laboratório de Análise de Imagens do Departamento de Patologia CCS/UFPE, utilizando-se um microcomputador com programas de controle de captura e análises automáticas de imagens (Bioscan®, Image hyperlink® e Optimetric®) interligado a uma câmara de vídeo JVC, modelo CV – 730, e esta a um microscópio (Leica, modelo ATC 2000).

Nesse sistema, as imagens coloridas captadas e digitalizadas e convertidas em imagens com diferentes tonalidades de cinza foram arquivadas. Para o estudo de determinada imagem de interesse, executava-se a transformação da imagem cinza em uma imagem bidimensional (2D) bem delimitada. Dessa forma, foi possível medir a imagem (2D) em pixels, e

converter o valor da leitura automaticamente para a unidade de medida desejada conforme o aumento conferido pelo microscópio. As funções matemáticas para medidas morfológicas, tais como área do diâmetro dos vasos coronarianos e da área do depósito do colágeno, foram executadas automaticamente por um programa (Optimas® macros, 1996, Optimas Corporation, Washington, USA) com linguagem orientada para leitura de imagem, instalada no microcomputador.

A análise morfométrica foi executada quantificando-se em toda extensão da parede ventricular esquerda o número de vasos coronarianos, o diâmetro desses vasos, e a área de depósitos de colágeno perivascular e intersticial.

As amostras foram analisadas por dois observadores diferentes, por meio de duplo-cego, não havendo diferença estatística ($p = 0,729$).

3.6 ESTUDO ESTATÍSTICO

Para a análise estatística do peso cardíaco úmido, usou-se análise de variância com um fator (ANOVA). A análise do peso corpóreo para comparação dos grupos: aguardente e controle ao longo do tempo de experimento foram feitos por meio de análises multivariadas utilizando os Modelos Gerais Linearizados – GLM.

Para comparação do diâmetro e números de vasos do endomiocárdio, aplicou-se a ANOVA com múltiplas comparações e o teste de Tukey.

Foi utilizado o software SPSS versão 10.0 e os resultados analisados ao nível de confiança de 95% ($p < 0,05$).

3.7 ASPECTOS ÉTICOS

O protocolo experimental desenvolvido neste trabalho foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEEA - UFPE) ofício 095/2002. (Anexo 2)

4. RESULTADOS

4.1 PESO CORPORAL

O estudo da evolução do peso corporal durante os três períodos do experimento não apresentou diferença significativa, 40 dias ($p = 0,287$), 50 dias ($p = 0,659$), e 60 dias ($p = 0,369$), entre os grupos controle e aguardente, figuras I, II e III.

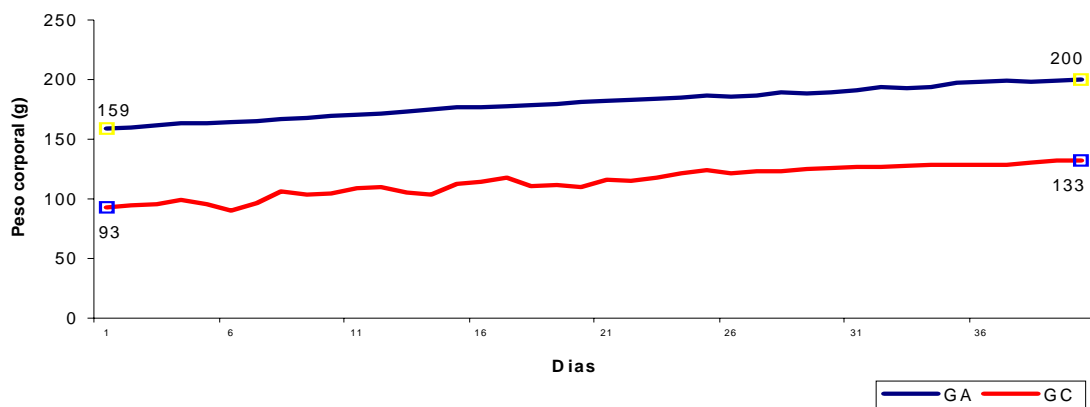


Figura I. Peso corporal médio dos animais do grupo aguardente (GA) e grupo controle (GC), aos 40 dias de tratamento. Ratas Wistar ($n = 8$). 40 dias ($p = 0,287$).

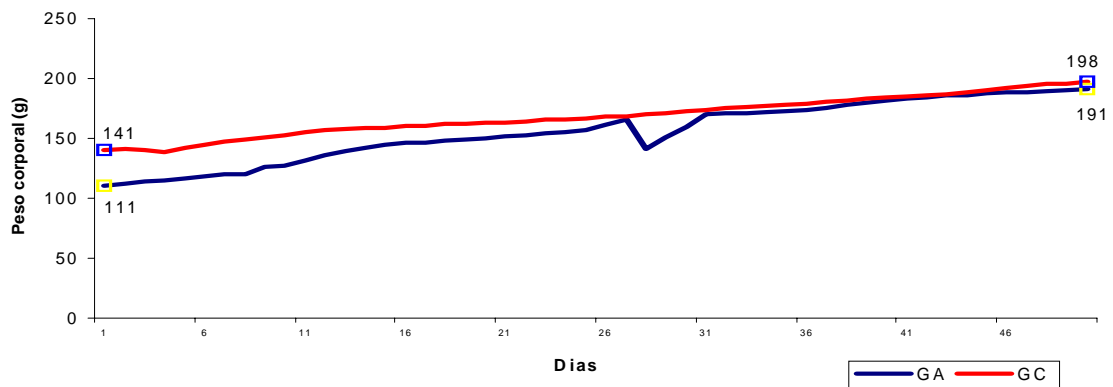


Figura II. Peso corporal médio dos animais do grupo aguardente (GA) e grupo controle (GC), aos 50 dias de tratamento. Ratas Wistar ($n = 8$). 50 dias ($p = 0,659$).

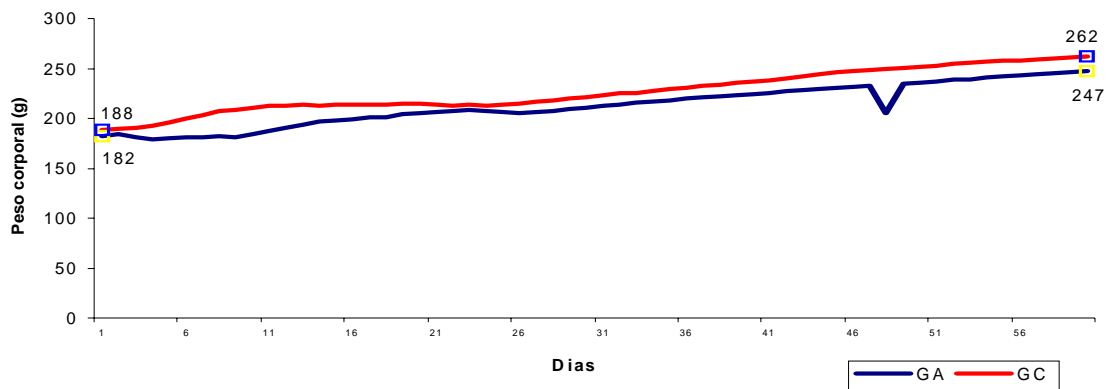


Figura III. Peso corporal médio dos animais do grupo aguardente (GA) e grupo controle (GC), aos 60 dias de tratamento. Ratas Wistar (n = 8). 60 dias (p = 0,369).

4.2 PESO ÚMIDO CARDÍACO

Em relação ao peso cardíaco (figura IV), foi feita a análise de variância com um fator (ANOVA), observou-se que durante os três períodos do experimento não apresentou diferença significativa, 40 dias (p = 0,125), 50 dias (p = 0,337), e 60 dias (p = 0,599), entre os grupos controle e aguardente nos períodos observados.

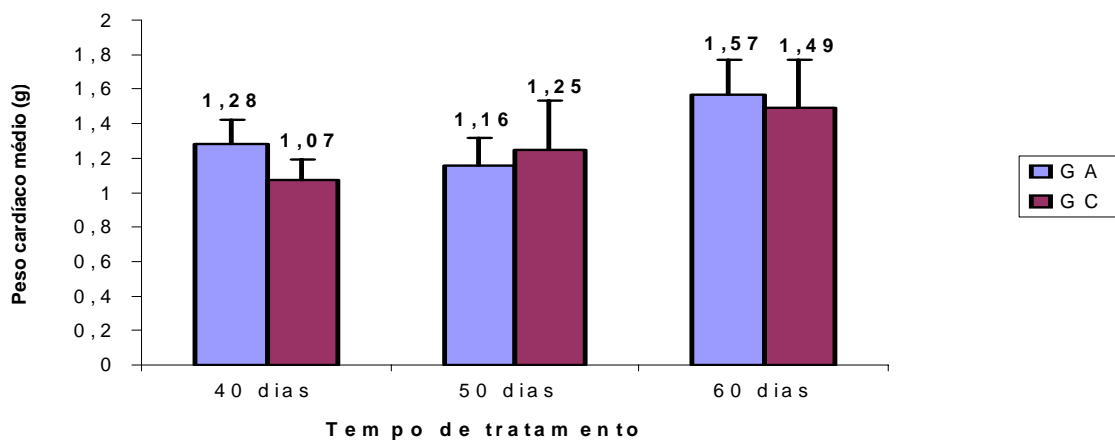


Figura IV. Peso cardíaco médio dos animais do grupo aguardente (GA) e grupo controle (GC) nos diferentes tempos de tratamento. Ratas Wistar. 40 dias (n = 8; p = 0,125); 50 dias (n = 8; p = 0,337) e 60 dias (n = 8; p = 0,599).

4.3 ANÁLISE MORFOMÉTRICA E HISTOLÓGICO DO CORAÇÃO

4.3.1 Contagem do número médio dos vasos do endomiocárdio

Constatou-se que em todos os períodos de tratamento (40, 50 e 60 dias) o número médio dos vasos foi maior no grupo aguardente, apresentando diferenças estatisticamente significativas, tanto no fragmento superior, médio e inferior, nos períodos 40 dias (p < 0,001), 50 dias (p < 0,001) e 60 dias (p < 0,001) figuras V, VI e VII.

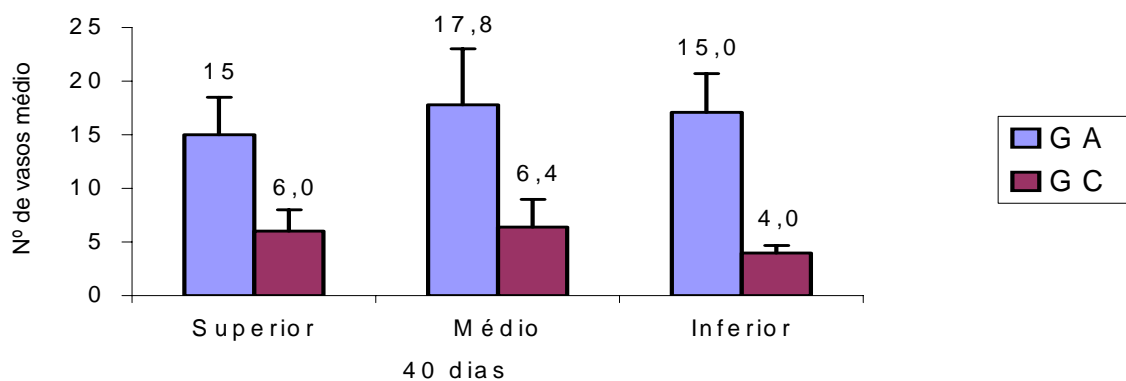


Figura V. Número médio de vasos cardíacos do endomiocárdio dos animais do grupo aguardente (GA) e do grupo controle (GC) aos 40 dias de tratamento. Ratas Wistar (n = 8). 40 dias (p < 0,001).

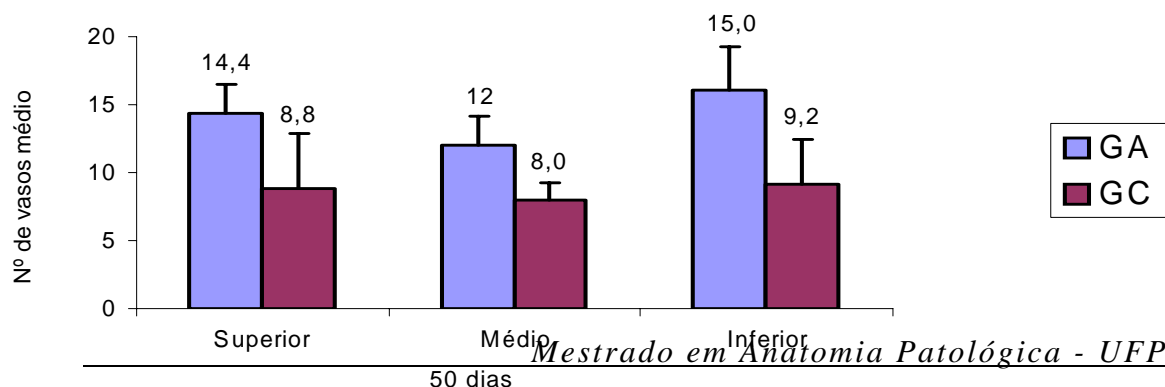


Figura VI. Número médio de vasos cardíacos do endomiocárdio dos animais do grupo aguardente (GA) e do grupo controle (GC) aos 50 dias de tratamento. Ratas Wistar (n = 8). 50 dias (p < 0,001).

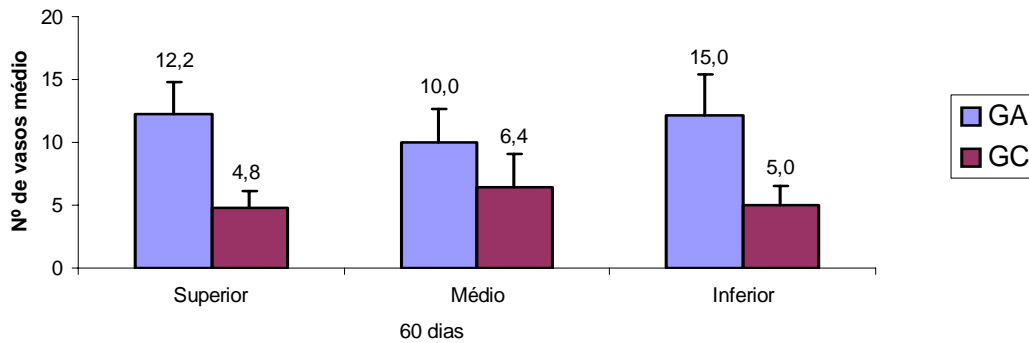


Figura VII. Número médio de vasos cardíacos do endomiocárdio dos animais do grupo aguardente (GA) e do grupo controle (GC) aos 60 dias de tratamento. Ratas Wistar (n = 8). 60 dias (p < 0,001).

4.3.2 Diâmetro médio dos vasos cardíacos do endomiocárdio

Em relação aos diâmetros dos vasos, não se observou diferença estatisticamente significativa, quando comparados os grupos aguardente e o grupo controle, em relação ao fragmento superior, médio e inferior, nos períodos 40 dias (p = 0,957), 50 dias (p = 0,268) e 60 dias (p = 0,296) figuras VIII, IX, e X.

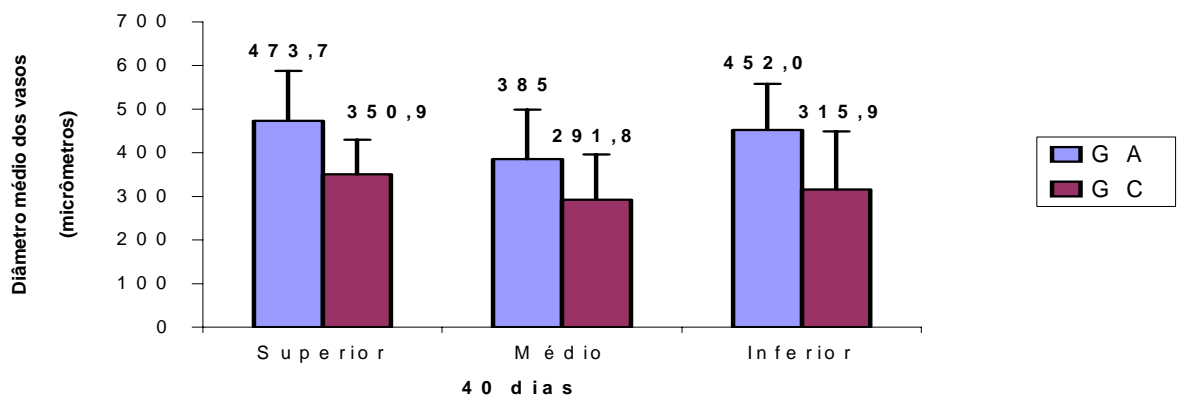


Figura VIII. Diâmetro de vasos cardíacos médios dos animais do grupo aguardente (GA) e do grupo controle (GC) aos 40 dias de tratamento. Ratas Wistar (n = 8). 40 dias (p = 0,957).

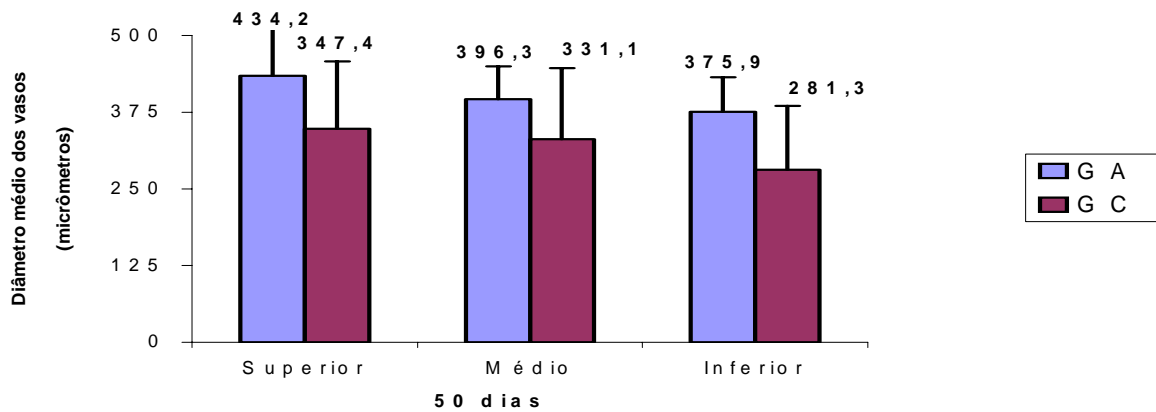


Figura IX. Diâmetro de vasos cardíacos médios dos animais do grupo aguardente (GA) e do grupo controle (GC) aos 50 dias de tratamento. Ratas Wistar (n = 8). 50 dias (p = 0,268).

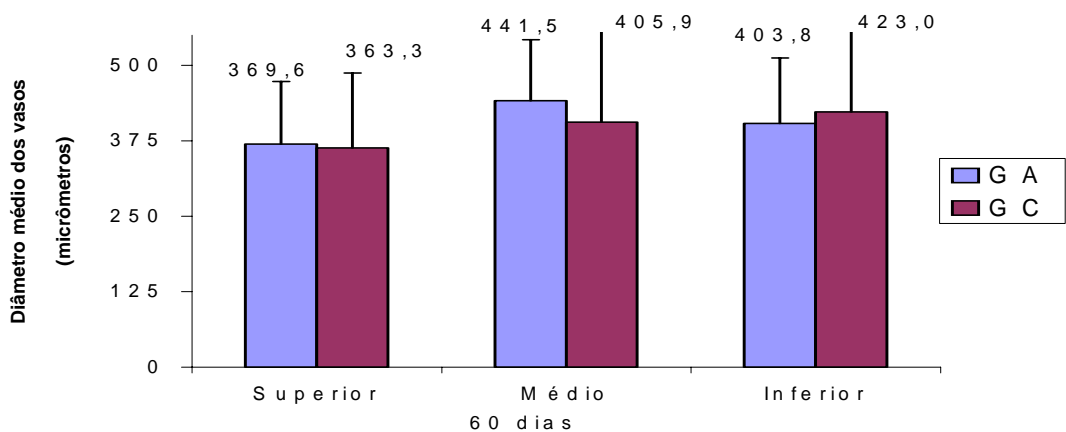
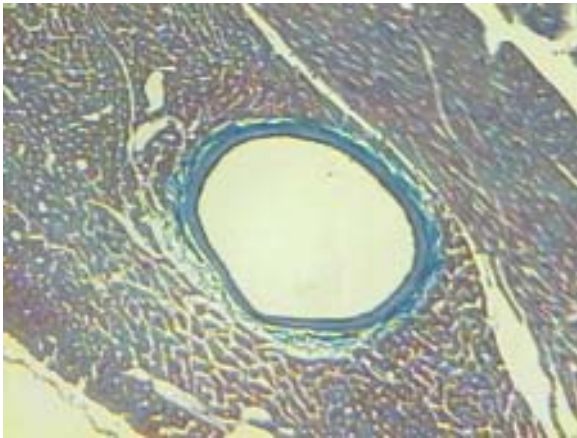


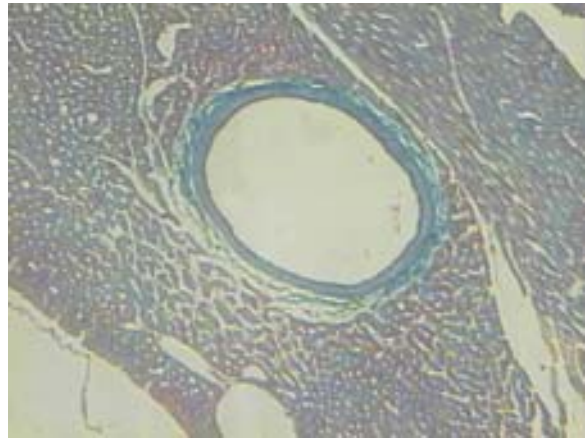
Figura X. Diâmetro de vasos cardíacos médios dos animais do grupo aguardente (GA) e do grupo controle (GC) aos 60 dias de tratamento. Ratas Wistar (n = 8). 60 dias (p = 296).

4.3.3 Análise histológica

Não foram encontradas alterações na arquitetura celular e nem no sistema vascular cardíaco, tanto no grupo controle quanto no grupo aguardente, também não ficou evidente a presença de infiltrado inflamatório ou depósitos de colágeno nos espaços intersticial e perivascular.



Grupo Controle (GC)



Grupo Aguardente (GC)

5. DISCUSSÃO

A associação entre alcoolismo crônico e disfunção cardíaca tem sido estudada e documentada repetidamente (ASKANAS; UDOSHI; SADJAD, 1980; EDMONDSON, 1980; URBANO-MÁRQUEZ et al., 1995). Considerado grave problema social, o alcoolismo é entendido como uma doença que envolve fatores familiares, culturais, raciais, religiosos e distúrbios fisiológicas ante os efeitos do álcool (EDMONDSON, 1980; ROBINSON et al., 1987; ESTRUCH et al., 1995).

O uso abusivo do álcool pode levar ao desenvolvimento de alterações em um ou mais sistemas orgânicos, acarretando doenças no fígado, pâncreas, coração e determinando, no geral, maior comprometimento em apenas um deles (EDMONDSON, 1980). Nesse contexto, embora não sejam disponíveis dados epidemiológicos exatos, a doença cardíaca alcoólica (DCA) tem recebido atenção progressivamente maior (MAIA et al., 2002).

A DCA é caracterizada por alterações estruturais que incluem: dilatação das câmaras, hipertrofia ventricular e danos aos miócitos (MEEHAN et al., 1999).

Dentre os efeitos deletérios do álcool no coração, podemos destacar: a perda da contratibilidade do miocárdio, arritmia átrio-ventricular e cardiopatia dilatada não-isquêmica (MAISCH, 1996).

O efeito do álcool no desenvolvimento da DCA tem sido estudado em dois modelos animais: o cachorro e o rato. A exposição prolongada ao álcool em cães não tem reproduzido as alterações morfológicas e funcionais observadas no homem (REGAN, 1972; ETTINGER; LYONS, 1976; THOMAS; HAIDER; REGAN, 1980). Em face desta observação, utilizamos ratas

(Wistar), por ser animais de melhor manejo para a aplicação da água e da aguardente e criados em biotério com condições fisiológicas semelhantes ao do humano, o que contribui para a veracidade dos resultados.

A opção de trabalhar com animais de sexo feminino, baseou-se no fato de ser o sexo que aparenta maior risco para o desenvolvimento da doença cardíaca alcoólica, possivelmente por apresentar uma sensibilidade elevada aos efeitos tóxicos do álcool (REGAN, 1972). Segundo Brody (1998), este sexo apresenta déficit da enzima aldeído-desidrogenase hepática, contribuindo para a elevação da concentração de acetaldeído, dessa forma aumentando a prevalência de DCA nas mulheres alcoolistas, apesar de estas ingerirem uma menor quantidade de álcool (URBANO-MÁRQUEZ et al., 1995).

Nossos resultados não demonstraram existir diferenças significativas em relação ao peso corporal, contrariando alguns relatos na literatura. Uma possível explicação para esse resultado se deve ao fato de que a aguardente por ser adocicada contribui para o fornecimento de calorias (PONTES-FILHO, 2003).

Segundo estudos anteriores (ASKANAS; UDOSHI; SADJAD, 1980; OKADA, 1989), na DCA, há aumento do volume e peso cardíaco, dilatação das câmaras e hipertrofia das paredes ventriculares, envolvendo, particularmente, o ventrículo esquerdo. Em relação ao peso cardíaco úmido, os nossos dados, demonstraram que não houve diferença estatística entre os grupos, resultados concordantes com os achados de Maia et al. (2002), que não encontrou diferenças entre alcoolista e não alcoolistas. Possivelmente, o aumento do peso cardíaco só é significativo quando há hipertrofia ventricular esquerda, o que segundo Kino et al. (1981), ocorre apenas em grandes

consumidores. No nosso experimento acreditamos que o período de exposição a aguardente não foi suficiente para induzir tal distúrbio.

Em nosso trabalho quando se comparou o número dos vasos endomiocárdicos, entre o grupo aguardente e controle, foi observado uma diferença estatisticamente significativa. Possivelmente, o encontro de maior número de vasos é decorrente de um processo adaptativo do miocárdio, facilitando a oxigenação do coração, para inibir as lesões provocadas pelo álcool, principalmente no processo de isquemia que irá comprometer os pequenos vasos intramiocárdicos, além dos efeitos tóxicos diretos do álcool sobre as células musculares cardíacas (BURNS; HULEWIEZ, 1990; AHMED; ELTON; BERSEHIL, 1996).

Em camundongos alimentados durante três meses com dieta contendo álcool (15% por volume), verificaram-se alterações ultra-estruturais em capilares miocárdicos entre elas o estreitamento do lúmen dos vasos cardíacos (BURCH et al., 1971). Factor (1976), propôs a ocorrência de um aumento da permeabilidade vascular em alcoolista, e como conseqüência há depósitos protéicos plasmáticos nas paredes vasculares, reduzindo o diâmetro do vaso cardíaco. Nossos resultados não evidenciaram alterações no diâmetro dos vasos cardíacos. Possivelmente, isso se deve ao fato de que houve aumento do número de vasos cardíacos, impedindo a oclusão do lúmen dos vasos cardíacos, evitando lesão isquêmica crônica que causa degeneração das principais artérias coronárias que assim originam hipóxia e distúrbios circulatórios que contribuem para a gênese da DCA. Nossos dados corroboram com os resultados de Ahmed; Elton; Bersehil (1996), e de Maia et al. (2002),

quando foram realizados estudos morfométrico em material de pacientes com DCA, onde não houve alteração do diâmetro dos vasos cardíacos.

Os efeitos tóxicos do álcool, ou de seu metabólito o acetaldeído, no coração têm sido comprovados e mensurados tanto em humanos como em animais de laboratório (WILKE et al., 1996; MAIA et al., 1999; MAIA et al., 2002). Dentre as alterações observadas em ratos expostos a doses moderadas de etanol, a fibrose cardíaca é um dos achados histopatológicos relacionados a DCA, mais evidentes (VENDEMIALE et al., 2001). Em relação a essa evidência nossos resultados são discordantes com os da literatura estudada, uma vez que não encontramos áreas de depósito de colágeno nos espaços perivascular e intersticial, provavelmente decorrente do tempo de exposição utilizado no experimento ou ao processo adaptativo do fibroblasto cardíaco.

6. CONCLUSÃO

Concluimos que quando ratas Wistar são expostas, por gavagem a doses crônicas de aguardente “*in natura*” durante 40, 50, e 60 dias:

- Não há alteração na evolução do peso corporal e do peso cardíaco úmido;
- Ocorre aumento do número de vasos coronarianos;
- Não há aumento do diâmetro dos vasos coronarianos; e,
- Não se observou a presença de áreas de depósito de colágeno nos espaços perivascular e intersticial.

7. REFERÊNCIAS

AHMED, A.N.H.; ELTON, R.A.; BERSEHIL, A. Assesment of myocardial vasculature in chronic alcoholics without established cardiomyopathy. *Inc. Journal Leg. Medicine*, v. 109, p. 167-172, 1996.

ALCOOLISMO E RECUPERAÇÃO – uma abordagem sob enfoque d antropologia simbólica, do ritual de elevação de “status” na recuperação dos alcoolistas, pela incorporação de alcoólicos anônimos. Disponível em: <www.cfh.ufsc.br/~javier/alcoolli.htm>. Acesso em: 23 nov. 2003.

ASKANAS, A.; UDOSHI, M.; SADJAD, S.A. The heart in chronic alcoholism: a noninvasive study. *American Heart Journal*, v. 99, p. 9-16, 1980.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. *NBR 6023*: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. *NBR 14724*: informação e documentação: trabalhos acadêmicos: apresentação. Rio de Janeiro, 2002.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. *NBR 10520*: informação e documentação: citações em documentos: apresentação. Rio de Janeiro, 2002.

BARAONA, E.; LIEBER, C.S. Alcohol and lipids. *Recent Developments in Alcoholism*, v. 14, p. 97–134, 1998.

BELARDINELLI, R.; GEORGIU, D.; SCOCCO, V.; BARSTOW, T.J.; PURCARO, A. Low intensity exercise training in patients with chronic heart failure. *Journal America Coll Cardiology*, v. 26, n. 4, p. 975– 982, 1995.

BRAUNWALD, E. Disorders of the heart. In: J. B. WILSON et al. (Org.). *Harrison's principles of Medicine*. 12^a ed. New York: McGraw Hill, 1991, p. 835, v. 1.

BRODY, T. Alcohol, In: BRODY, T. (Org.). *Nutritional biochemistry*. 9^a ed. London: Academic Press, 1998, p. 201-220, cap. 4.

BURCH, G.E.; GILES, T.D. The small coronary arteries in alcoholic cardiomyopathy. *American Heart Journal*, v. 94, p. 471-478, 1977.

BURCH, G.E., COLCOLOUGH, H.L., HARB, J.H.; TSUI, C.Y. The effects of ingestion of ethyl alcohol, wine and beer on the myocardium of mice. *American Journal Cardiology*, v. 27, p. 522-527, 1971.

BURNS, J.; HULEWIEZ, B. Sudden death in alcoholic with intramyocardial small vessel disease. *Medicine Science Law*, v. 30, p. 106-108, 1990.

CARVER, W.; TERRACIO, L. Integrin-mediated cell – matrix interaction in heart development and disease. *Heart Failure*, v. 8, n. 6, p. 255 –263, 1993.

CECCHI, F.; MONTEREGGI, A.; SQUILANTINI, G.; ZUPPIROLI, A.; DOLARA, A. The natural history and clinical course of hypertrophic cardiomyopathy. In: BAROLDI, G.; CAMERINE, F; GOODWIN, J.F. (Org.). *Advances in cardiomyopathies*. Berlin: Springer-Verlag, 1990, p. 25-31.

CHICK, J. Alcohol Problems in the general hospital. *Br. Med. Bull*, v. 50, p. 200-210, 1994.

CRIQUI, M.H. Alcohol and coronary heart disease: consistent relationship and public health implications. *Clinica Chim. Acta*, v. 246, p. 51-57, 1996.

CZARNECKI, C.M. Animal models of drug-induced cardiomyopathy. *Biochemical physiology*, v. 79, p. 9-14, 1984.

DÉCOURT, L.V. Miocardiopatias: Conceituação e modalidades. In: SILVA, M.A.D. (Org.). *Doenças do miocárdio*. Rio de Janeiro: Savier, 1995, p. 1-15.

DIAMOND, I. Alcoholic myopathy and cardiomyopathy. *N. Journal Medicine*, v. 320, p. 458-468, 1989.

DOERING, C. W.; JALIL, E.J.; JANICKI, J.S.; PICK, R.; AGHILI, S.; ABRAHAMS, C.; WEBER, K.T. Collagen network remodelling and diastolic stiffness of the rat left ventricle with pressure overload hypertrophy. *Cardiovascular Research*, v. 22, p. 686-695, 1988.

EDMONDSON, H.A. Pathology of alcoholism. *American Journal Clinic Pathology*, v. 74, p. 725-742, 1980.

EDWARDS, W.D. Cardiomyopathies. *Hum. Pathology*, v. 18, p. 625-635, 1987.

ESTRUCH, R.; FERNANDEZ-SOLÁ, J.; SACANELLA, E.; PARÉ, C.; RUBIN, E.; URBANO-MARQUEZ, A. Relationship between cardiopathy and liver disease in chronic alcoholism. *Hepatology*, v. 22, p. 532-537, 1995.

ETTINGER, P.O.; LYONS, M.M. Cardiac conduction abnormalities produced by chronic alcoholism. *American Heart Journal*, v. 91, p. 66-78, 1976.

FACTOR, S.M. Intramocardial small-vessel disease in chronic alcoholism. *American Heart Journal*, v. 92, p. 561-575, 1976.

GOODWIN, J.F. Introduction: thirty years of cardiomyopathy. In: BAROLDI, G.; CAMERONI, F.; GOODWIN, J.F. (Org.). *Advances in Cardiomyopathies*. Berlin: Springer-Verlag, 1990, p. 1-4.

GOODWIN, J.F.; OAKCLEY, C.M. The cardiomyopathies. *Br. Heart Journal*, v. 34, p. 545-552, 1972.

GOODWIN, J.F. Congestive and hipertrophic cardiomyopathies. *Lancet*, v. 11, p. 731-739, 1970.

GRATTAGLIANO, I.; PALMIERE, V.; VENDEMIALE, G.; PORTINCASA, P.; ALTOMARE, E.; PALASCIANO, G. Chronic ethanol administration induces oxidative alterations and functional impairment of pancreatic mitochondria in the rat: effect on exocrine secretion. *Digestion*, v. 60, p. 549-553, 1999.

GRIMM, D.; HUBER, M.; JABUSCH, H.C.; SHAKIBAEI, M.; FREDERSDORF, S.; PAUL, M.; RIEGGER, G.A.J.; KROMER, E.P. Extracellular matrix proteins in cardiac fibroblasts derived from rat hearts with chronic pressure overload: effects of beta-receptor blockade. *Journal Molecular Cell Cardiology*, v. 33, p. 487-501, 2001.

HEIN, H.O.; SUADICANI, P.; GYNTELBERG, F. Alcohol consumption, serum low density lipoprotein cholesterol concentration and risk of ischaemic heart disease: 6-year follow up in the Copenhagen male study. *BMJ*, v. 312, p. 736-741, 1996.

HOGNESTAD, J.; TEISBERG, P. Heart pathology in chronic alcoholism. *Acta. Pathology Microbiology Sand.*, v. 81, p. 315-322, 1973.

JAARTINEM, P.; SANKKO, P.; HERVONEN, A. Chronic ethanol exposure increases lipopigment accumulation in human heart. *Alcohol & Alcoholism*, v. 28, p. 559-569, 1993.

JOYCE, E.M. Actiology of alcoholic brain damage: alcoholic neurotoxicity or thiamine malnutrition. *Br. Med. Bull.*, v. 50, p. 99-114, 1994.

KESTELOOT, H.; ROELANDT, J.; WILLEMS, J.; CLAES, J.H.; JOOSSENS, J.V.; et al. An enquiry into the role of cobalt in the heart of chronic beer drinkers. *Circulation*, v. 37, p. 854-864, 1992.

KINO, M.; IMAMITCCH, I.H.; MORIGUTCHI, M.; KAWAMURA, K.; TAKATSU, T. Cardiovascular status in asymptomatic alcoholism, with reference to the level of ethanol consumption. *Br. Heart*, v. 46, p. 545-551, 1981.

LAUTERBURG, B.H.; GRATAGLIANO, I.; GMUR, R.; STALDER, M.; HILDEBRAND, P. Non-invasive assessment of the effect of xenobiotics on mitochondrial function in humans: studies with acetylsalicylic acid and ethanol using the ¹³C-ketoisocaproate breath test. *Journal Lab. Clinic Medicine*, v. 125, p. 378-383, 1995.

LEVY, D.; GARRISON, R.J.; SAVAGE, D.D.; KANNEL, W.B.; CASTELLI, W.B. Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study. *N Engl Journal Medicine*, v. 322, p. 1561-1566, 1990.

MAIA, L.C.; FIGUERÊDO-SILVA, J.; SARAIVA, L.C.R.; CAVALCANTI, C.L.B.; ALBUQUERQUE, P.M.S. Doença do coração em alcoolistas crônicos: Estudo de 19 casos. *Anais Faculdade Medicina Universidade Federal Pernambuco*, v. 47, n. 1, p. 4-8, 2002.

MAIA, L.C.; FIGUERÊDO-SILVA, J.; SILVA, E.C.C.; CAVALCANTI, C.L.B., ALBUQUERQUE, P.M.S.; CABRAL-FILHO, J.E. Estudo morfológico da rede arteriolar miocárdica em indivíduos alcoolistas crônicos. *Anais Faculdade Medicina Universidade Federal Pernambuco*, v. 44, p. 31-33, 1999.

MAISCH, B.M. Alcohol and the heart. *Herz*, v. 21, p. 207-212, 1996.

MANN, D.L.; SPINALE, F.G. Activation of matrix metalloproteinases in the failing human heart: breaking the tie that binds. *Circulation*, v. 98, n. 17, p. 1699–702, 1998.

MANSOURI, A.; DEMEILLIERS, C.; AMSELLEM, S.; PESSAYRE, D.; FROMENTY, B. Acute ethanol administration oxidatively damages and depletes mitochondrial dna in mouse liver, brain, heart, and skeletal muscles: protective effects of antioxidants. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 298, n. 2, p. 737-743, 2001.

McCORD, J.M. Free radical and heart disease. In: SOMOGYI, J.C.; MULLER, H.R. (Org.). *Nutritional Impact of Food Processing*. Karger: Basel, 1986, p. 327–337.

McCEWAN, P.E.; GRAY, G.A.; SHERRY, L.; WEBB, D.J.; KENYON, C.J. Differential effects of angiotensin II on cardiac cell proliferation and intramyocardial perivascular fibrosis in vivo. *Circulation*, v. 98, n. 24, p. 2765–73, 1998.

MEEHAN, J.; PIANO, M. R.; SOLARO, R. J.; KENNEDY, J. M. Heavy long-term ethanol consumption induces an alpha- to beta-myosin heavy chain isoform transition in rat. *Basic Research in Cardiology*, v. 94, n. 6, p. 481-488, 1999.

OKADA, R.E. Enfermedad cardíaca alcohólica. *Ver. Hosp. Univ.*, v. 3, p. 3-16, 1989.

PONTES-FILHO, N.T. *Morfometria e histoquímica do córtex cerebral de ratos jovens submetidos ao álcool e a desnutrição*. Recife, 2003. 63p. Tese (Doutorado em Nutrição), Departamento de Nutrição, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco.

PREEDY, V.R.; RICHARDSON, P.J. Ethanol induced cardiovascular disease. *British Medical Bulletin*, v. 50, p. 152–163, 1994.

RAMOS, S.P.; BERTOLOTE, J.M. Alcoolismo Hoje. 3ª ed. *Artes Médicas*, Porto Alegre, p. 240, 1997.

REGAN, T.J. Alcoholic cardiomyopathy. In: ZIPES, D.P.; ROWLANDS, D.J. (Org.). *Progress in cardiology*. Philadelphia: Lea & Febinger, 1972, p. 129-141.

REINKE, L.A.; LAI, E.K.; Du BOSE, C.M.; MacCAY, P.B. Reactive free radical generation in vivo in heart and liver of ethanol-fed rats: correlation with radical formation in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 84, p. 9223-9227, 1987.

REN, J.; BROWN, R.A. Influence of chronic alcohol ingestion on acetaldehyde-induced depression of rat cardiac contractile function. *Alcohol and Alcoholism*, v. 35, n. 6, p. 554-560, 2000.

RIBIERE, C.; HININGER, I.; ROUACH, H.; NORDMANN, R. Effects of chronic ethanol administration on free radical defence in rat myocardium. *Biochemical Pharmacology*, v. 44, p.: 1495-1500, 1992.

RICHARDSON, P.J.; WODAK, A.A. Alcohol-induced heart muscle disease. In: SYMONS, C.; EVANS, T.; MITCHELL, A. (Org.). *Specific Heart Muscle Disease*. Bristol: G. Wright PSG, 1983, p. 99-122.

RICHARDSON, P.J.; WODAK, A.D.; ATKINSON, L.; SAUNDERS, J.B.; JEWITT, D.E. Relation between alcoholic intake, myocardial enzyme activity and myocardial function in dilated cardiomyopathy. *Br. Heart Journal*, v. 56, p. 165-170, 1986.

RIMM, E.B.; KLATSKY, A.; GROEBBEE, D.; STAMPFER, M.J. Review of moderate alcohol consumption and reduced risk of coronary heart disease: is the effect due to beer, wine or spirits. *BMJ*, v. 312, p. 731-736, 1996.

ROBINSON, T. F.; COHEN-GOULD, L.; FACTOR, S. M.; EGHBALI, M.; BLUMENFELD, O.O. Structure and function of connective tissue in cardiac muscle: collagen types I and III in endomysial structure and pericellular fibers. *Scanning Electron Microsc.*, v. 2, p. 1005-1015, 1988.

ROBINSON, T.F.; FACTRO, S.M.; CAPASSO, J.M.; WITTENBER, B.A.; BLUMENFELD, O.O.; SEIFTER, S. Morphology, composition and function of structures between cardiac myocytes of rat and hamster. *Cell. Tissue research*, v. 249, p. 247-255, 1987.

RUBIN, E. Alcoholic myopathy in heart and skeletal muscle. *N. Engl. Journal Med.*, v. 5, p. 28-33, 1979.

SCHOENN, R.J. O coração. In: COTRAN, R.S.; KUNNAR, V.; ROBBINS, S.L. (Org.). *Patologia Estrutural e Funcional*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996, p. 493-501.

SCHOENN, R. J. The heart. In: COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S.L. (Org.). *Pathologic Basis of Disease*. 5th ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1994, p. 564.

SEGEL, L.D. The development of alcohol-induced cardiac dysfunction in the rat. *Alcohol*, v. 23, p. 391-401, 1988.

SEIZI, O. Fundamentos de Toxicologia. *Atheneu*, São Paulo, 1996. 515p.

SILVA, M.A.D. Miocardiopatia hipertrófica. In: SILVA, M.A.D. (Org.). *Doenças do Miocárdio*. Rio de Janeiro: Sarvier, 1995, p. 89-124.

SOKOLOW, M.; MCILROY, M.B.; CHEITLIN, M.D. Clinical Cardiology. 5th ed. London: London, 1990, p.561-564.

SUN, Y.; ZHANG, J.Q.; ZHANG, J.; LAMPARTER, S. Cardiac remodelling by fibrous tissue after infraction in rats. *Journal Lab Clin Med.*, v. 135, n. 4, p. 316-23, 2000.

TERACCIO, L.; RUBIN, K.; GULLBERG, D.; BALOG, E.; CARVER, W.; JYRING, R.; BORG, T.K. Expression of collagen binding integrins during cardiac development and hypertrophy. *Circ Res*, v. 68, p. 734-44, 1991.

TERAGAKI, M.; TAKEUCHI, K.; TAKEDA, T. Clinical and histopathological features of alcohol drinkers with congestive heart failure. *American Journal Heart*, v. 125, p. 808-817, 1993.

THOMAS, A.P.; ROZANSKI, D.J.; RENARD, D.C.; RUBIN, E. Effects of ethanol on the contractile function of the heart: a review. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, v. 18, p. 121-131, 1994.

THOMAS, G.; HAIDER, B.; REGAN, T. J. Progression of myocardial abnormalities in experimental alcoholism. *American Journal Cardiology*, v. 64, p. 233-241, 1980.

TURTO, H.; LINDY, S.; HALME, J. Protocollagen proline hydroxylase activity in work induced hypertrophy of rat muscle. *American Journal Physiology*, v. 10, p. 1322-1334, 1987.

TYAGI, S.C.; LEWIS, K.; PIKES, D.; MARCELLO, A.; MUJUMDAR, V.S.; SMILEY, L.M.; MOORE, C.K. Stretch-induced membrane type matrix metalloproteinase and tissue plasminogen activator in cardiac fibroblast cells. *Journal Cell Physiol*, v. 176, n. 2, p. 374-82, 1998.

UNVERFERTH, D.V.; BAKER, P.B.; SWIFT, S.E.; CHAFFEE, R.; FETTERS, J.K.; URETSKY, B.F.; THOMPSON, M.E.; LEIER, C.V. Extent of myocardial fibrosis and cellular hypertrophy in dilated cardiomyopathy. *American Journal Cardiology*, v. 57, p. 816-820, 1996.

URBANO-MÁRQUEZ, A.; ESTRUCH, R.; FERNANDEZ-SOLÁ, J.; NICOLÁS, J.M.; PARÉ, J.C.; RUBIN, E. The greater risk of alcoholic cardiomyopathy and myopathy in woman compared with men. *JAMA*, v. 274, p. 149-154, 1995.

VENDEMIALE, G.; GRATAGLIANO, I.; ALTOMARE, E.; SERVIDDIO, G.; PORTINCASA, P.; PRIGIGALO, F.; PALASCIANO, G. Mitochondrial oxidative damage and myocardial fibrosis in rats chronically intoxicated with moderate doses of ethanol. *Toxicology Letters*, v. 123, n. 3, p. 209-216, 2001.

VENDEMIALE, G.; GRATAGLIANO, I.; SIGNORILE, A.; ALTOMARE, E. Ethanol induced changes of intracellular thiol compartmentation and protein redox status in the rat liver: effect of tauroursodeoxycholate. *Journal Hepatology*, v. 28, p. 46-53, 1998.

VILLAREAL, F.J.; BAHNSON, T.; KIM, N.N. Human cardiac fibroblasts receptors for angiotensin II and bradykinin: a potential role for bradykinin in the modulation of cardiac extracellular matrix. *Basic Res Cardiology*, v. 93, n. 3, p. 4-7, 1998.

WEBER, K.T.; BRILLA, C.G. Pathological hypertrophy and cardiac interstitium. Fibrosis and renin-angiotensin-aldosterone system. *Circulation*, v. 83, p. 1849-1865, 1991.

WEBER, K.T. Cardiac Interstitium in Health and Disease: The Fibrillar Collagen Network. *J. A. C. C.*, v. 13, n. 7. p. 1637-52, 1989.

WILKE, A.; KAISER, A.; FERENCY, I.; MAISCH, B. Alcohol and myocarditis. *Herz*, v. 21, n. 4, p. 248-257, 1996.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Classificação de transtornos mentais e de comportamento de CID – 10. *Descrições clínicas e diretrizes diagnósticas*. Porto Alegre: artes médicas, 1993.

WYNNE, J.; BRAUNWALD, E. The cardiomyopathies and myocarditis. In: BRAUNWALD. (Org.). *Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular*. Philadelphia: Saunders, 1987, v. 1, p. 1437–1500, 1987.

ZABIROVA, I.G. Cardionecrotic effect of ethanol, acetaldehyde and teturam in acute experiments on rats. *Kardiologiya*, v. 23, n. 9, p. 90-92, 1983.

ZAMORANO, M.M.B. Patologia e patogenia das doenças miocárdicas. In: SILVA, M.A.D. (Org.). *Doenças do miocárdio*. Rio de Janeiro: Sarvier, 1995, p. 16-35.

ANEXOS

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
LABORATÓRIO DE CROMATOGRAFIA INSTRUMENTAL

Rua Tereza Mellia, s/n Campus.Universitário- Recife- PE – Fone: (081) 3271.8712- FAX (081)3271.0095

ANEXO 1

CERTIFICADO DE ANÁLISE DA AGUARDENTE

Certificado N°: 007 -A/2002

Natureza da Análise: Produtos secundários em aguardente

RESULTADO (expresso em mg/L do produto):

COMPONENTE	TEOR (mg/100 mL)
Acetaldeído	2,7
<i>ciclo</i> - Hexano	n. d.
Acetona	n. d.
Acetato de Etila	1,3
Álcool Metílico	1,6
Álcool <i>n</i> -Propílico	15,5
Álcool <i>iso</i> -Butílico	21,0
Álcool <i>n</i> -Butílico	0,5
Álcool <i>iso</i> -Amílico	71,6

n. d. = não detectado (teor < 0,1 mg/100 mL)

Recife, em 26 de julho de 2002



Prof. Alexandre Ricardo Pereira Schuler

Chefe do Laboratório de Cromatografia

Mestrado em Anatomia Patológica - UFPE

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL**

ANEXO 2

Ofício no 095/2002

Da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPE
Ao Prof. Nicodemos Teles de Pontes Filho
Departamento de Patologia da UFPE

Prezado Professor,

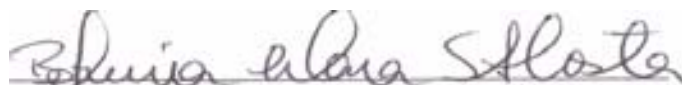
Após o recebimento de sua carta de encaminhamento solicitando análise do procedimento com animais no Projeto de pesquisa intitulado "Avaliação das alterações ponderais e histomorfológicas do coração de ratas adultas expostas a doses crônicas de aguardente", os membros da Comissão de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEEA-UFPE) analisaram os aspectos relativos aos protocolos experimentais a serem adotados.

Concluimos que na versão atual, os procedimentos descritos para o manejo e cuidado dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEEA - UFPE.

De acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 9.605 - art. 32 e Decreto 3.179-art 17, de 21/09/1999, que trata da questão do uso de animais para fins científicos, ressaltamos ainda que o sacrifício dos animais experimentais, realizado no presente trabalho, justifica-se pelo fato de não existirem recursos alternativos para a realização do procedimento científico.

Diante do exposto, emitimos um parecer favorável aos protocolos experimentais propostos.

Atenciosamente,



Profa. Belmira Lara da S. Andrade da Costa
Coordenadora da Comissão de Ética em Experimentação Animal da UFPE
Recife, 02 de setembro de 2002