

Análise histomorfométrica do coração de ratos expostos indiretamente ao etanol e à desnutrição crônica durante o período perinatal

Jorge Luiz Silva Araújo-Filho¹

Mario Ribeiro de Melo-Júnior²

Renata Kelly de Araújo Veiga³

Marcos Cezar Feitosa de Paula Machado³

Vasco José Ramos Malta Patu⁴

Nicodemos Teles de Pontes-Filho⁵

Resumo

Mães alcoolistas, em humanos e animais de laboratório, vêm sendo responsáveis por distúrbios sistêmicos em seus descendentes. O presente estudo avaliou, através da histoquímica e da análise digital de imagem, o perfil histológico do coração de ratos (ratos Wistar) submetidos indiretamente ao etanol e à desnutrição crônica, durante o período perinatal, gerados por matrizes submetidas aos seguintes tratamentos: dieta padrão do biotério, dieta experimental hipoprotéica, ingestão de água e ingestão crônica de etanol (3g/kg do peso corporal). Foram originados quatro grupos experimentais (Grupo Controle – GC, Etanol– GE, Desnutrido – GD, Etanol – Desnutrido – GED), avaliando-se a evolução do peso corporal em três períodos: 3º (P3), 25º (P25) e 40º (P40) dia de vida. Na análise morfométrica, avaliaram-se as áreas de depósito de colágeno, o número e o diâmetro médio dos vasos cardíacos e as inclusões PAS-positivas e lipofucsina. Os resultados demonstraram que, em P3, apenas o grupo etanol (GE) tinha peso significativamente menor, quando comparado com os demais grupos. Houve diferença significativa de peso entre os grupos com o mesmo tratamento e dietas diferentes (GE x GED) em P25 e P40, tendo o GED o menor peso. A análise de imagens dos depósitos de colágeno revelou um aumento significativo no GE. O GD exibiu uma redução no número médio de vasos, quando comparado a outros grupos. O GED apresentou um aumento significativo no diâmetro médio dos vasos do endomiocárdio, bem como inclusões PAS-positivas, com distribuição difusa dos cardiomiócitos e do endotélio vascular. Pode-se, então, concluir que a exposição pré e pós-natal ao etanol induz alterações morfológicas importantes no tecido cardíaco dos descendentes, e muitas dessas alterações são intensificadas pelo estado de desnutrição protéica.

Palavras-chave: coração; etanol; desnutrição; período perinatal; etanol, exposição ao.

INTRODUÇÃO

O alcoolismo é um dos maiores problemas de saúde pública mundial. O consumo de álcool tem impacto nos diferentes sistemas or-

gânicos, como, por exemplo, no sistema nervoso central, no trato gastrointestinal, nos órgãos hematopoiéticos e no sistema cardiovascular. ⁽¹⁾

¹ Mestre em Patologia – CCS – UFPE. Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA, setor de Patologia, Universidade Federal de Pernambuco - UFPE. Recife. PE.

² Doutor em Ciências Biológicas – CCB. Universidade Federal de Pernambuco - UFPE. Recife. PE.

³ Bacharel em Biomedicina. Universidade Federal de Pernambuco - UFPE. Recife. PE.

⁴ Bacharel em Ciências Biológicas. Universidade Federal de Pernambuco - UFPE. Recife. PE.

⁵ Doutor em Nutrição – CCS. Universidade Federal de Pernambuco - UFPE. Recife. PE.

Correspondência para / Correspondence to:

Av. Moraes Rego, s/n - Campus Universitário

50670-910. Recife - Pernambuco - Brasil.

Tel.: (81) 8801-4528.

E-mail: jorgeufpe@gmail.com

Por ser uma molécula pequena, solúvel em água e lipídios, o etanol permeia todos os tecidos e pode, quando em uso crônico e abusivo, causar uma ampla variedade de alterações sistêmicas, entre elas a cardiomiopatia alcoólica. ⁽²⁾

Dentre os efeitos deletérios do álcool no coração, podemos destacar a perda da contratilidade do miocárdio, a arritmia átrio-ventricular e a cardiopatia dilatada não-iscêmica. ⁽¹⁾ Contudo alguns estudos defendem que o consumo moderado de álcool protege contra doenças coronárias cardíacas por mecanismos ainda não totalmente esclarecidos. ^(3, 4)

O uso moderado de etanol está associado ao dano oxidativo nas mitocôndrias dos cardiomiócitos e na síntese de fibronectina, uma das principais proteínas componentes da matriz extracelular. ⁽⁵⁾ A doença alcoólica cardíaca (DAC) é caracterizada por alterações estruturais que incluem dilatação das câmaras, hipertrofia ventricular e danos aos miócitos. ⁽⁶⁾ Os achados histológicos em alcoolistas crônicos, com ou sem manifestações clínicas, consistem de fibrose miocárdica de intensidade e distribuição variáveis, inclusões PAS-positivas no endotélio arteriolar, depósitos de lipofucsina e vacuolização no citoplasma dos miocardiócitos. ⁽⁷⁾

O estudo dos efeitos teratogênicos do álcool inclui, entre eles, desnutrição materna, disfunção placentária e distúrbios na formação dos órgãos ⁽⁸⁾. A interação de etanol e desnutrição tem sido implicada na patogênese das principais cardiomiopatias. ⁽⁹⁾

Apesar de existirem, na literatura, vários relatos com a quantificação das alterações morfológicas no tecido cardíaco, através da utilização concomitante de métodos fotolorimétricos e morfométricos ^(10, 11), pouco se sabe sobre os efeitos da desnutrição protéica associada à ingestão crônica de etanol na histo-arquitetura cardíaca, nos períodos pré e pós-natal.

A partir desses dados, objetivou-se, neste estudo, avaliar os efeitos indiretos da exposição crônica ao etanol e da desnutrição protéica de matrizes (mães), em ratos recém natos, ava-

liando-se a evolução do peso corporal e do coração dos filhotes e as possíveis alterações histomorfométricas dos cardiomiócitos no endomiocárdio

MÉTODOS

Animais e dietas

Para o acasalamento, foram colocadas, em cada gaiola, três ratas fêmeas e um macho da linhagem Wistar. A gestação era confirmada pela identificação de células decamativas, muco gestacional e espermatozoides, em exame microscópico (Microscópio Zeiss Standard 25, 10x).

No período compreendido entre o primeiro dia de gravidez e o último do aleitamento, as matrizes foram submetidas a um dos quatro diferentes protocolos resultantes da combinação de dois tratamentos nutricionais: ração comercial LABINA^a ou dieta básica regional (DBR), uma dieta experimental hipoprotéica, com, respectivamente, 23% e 8% de proteínas, com dois tratamentos por gavagem: administração diária de água filtrada ou de etanol. A gavagem foi executada sempre entre 7 e 8 horas da manhã. Os filhotes das matrizes assim tratadas originaram os quatro grupos experimentais, descritos a seguir.

Grupo-controle (GC, n=13): ratos oriundos de mães mantidas com a ração LABINA^a e doses de 3,8 ml de água filtrada. Assim, as matrizes desse grupo foram submetidas ao mesmo estresse, causado pela contenção e gavagem, sofrido pelas gestantes dos demais grupos.

Grupo Etanol (GE, n=17): ratos procriados por matrizes mantidas com LABINA^a, as quais recebiam etanol na dose de 3g/kg de peso corporal, diluído em água filtrada, em volume total de 3,8 ml (Álcool Etilico Absoluto P.A. – VETEC^a, Lote: 013471).

Grupo Desnutrido (GD, n=11): ratos gerados por mães mantidas com a dieta experimental hipoprotéica (DBR), as quais recebiam, também, 3,8 ml de água filtrada.

Grupo Etanol-Desnutrido (GED, n=16) ratos gerados por matrizes alimentadas com dieta experimental hipoprotéica (DBR), as quais recebiam etanol.

No terceiro dia após o parto, executou-se a sexagem, excluindo-se as fêmeas, devido à conhecida influência dos hormônios sexuais femininos no metabolismo do álcool.⁽¹²⁾ Os filhotes machos de cada grupo experimental, gerados por diferentes matrizes, foram misturados entre si e mantidos em ninhadas de 4 a 6 animais. A padronização do tamanho da ninhada teve como objetivo eliminar a desnutrição induzida por grandes ninhadas durante a lactação.⁽¹³⁾ A contagem dos animais era realizada diariamente, e foram estabelecidos métodos para evitar a coprofagia e o canibalismo.

Peso corporal

Os animais foram pesados no 3º dia após o nascimento (P3), no final da lactação (P25) e aos 40 dias de vida (P40), utilizando-se balança eletrônica (Marte, modelo S-000). A opção pela pesagem a partir do 3º dia após o nascimento foi decorrente da observação de aumento da agressividade e canibalismo entre as matrizes submetidas ao tratamento com etanol e DBR, quando os filhotes eram manipulados nos dois primeiros dias de vida.

Estudo histológico

Perfusão

Aos 40 dias de vida, os filhotes foram pesados e anestesiados por via intraperitoneal, com solução aquosa que continha uma mistura de Uretana a 10% (1g/Kg) e Cloralose a 0,4% (40 mg/Kg), de acordo com o peso corporal. Para a execução da perfusão, procedeu-se a uma 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. Dessa forma, tanto o sangue quanto as soluções de perfusão eram eliminadas por aquela abertura.

Após o bloqueio da artéria aorta abdominal com uma pinça hemostática, procedeu-se à perfusão, com o auxílio de um compressor com pressão regulada em torno de 90 mmHg. Para a remoção do sangue e a manutenção da

integridade tecidual, injetou-se, através da cânula, um volume em torno de 100 a 150ml de uma solução de tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7,2, com 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 salina a 0,9%, controlando-se a fixação do tecido pelo volume inoculado e a rigidez do pescoço e dos membros superiores. Finalizada a perfusão, procedeu-se à retirada do coração e mergulhou-se o mesmo em formalina a 10% tamponada.

Microtomia e histoquímica

Os corações, após a fixação (tempo mínimo de 48h), foram cortados transversalmente na região média, obtendo-se um fragmento do ventrículo esquerdo e direito, com espessura de 0,5 cm. Esses fragmentos 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 morfológica; em Tricômico de Masson (hematoxilina de Harris) e PAS (***Periodic Acid Schiff***), para o estudo da distribuição dos depósitos de colágeno e mucopolissacarídeos, respectivamente.

Análise morfométrica e estatística

A análise morfométrica foi executada quantificando-se o número dos vasos (5 campos aleatórios por lâmina de cada animal), a área dos depósitos de colágeno perivascular e diâmetro das artérias coronárias (3 campos aleatórios por lâmina de cada animal), através de um sistema computacional de análise de imagens (softwares TCI-Pro[®] e OPTIMAS 6.1[®]). As medidas obtidas foram submetidas ao estudo estatístico, utilizando-se o teste de Tukey, com $p < 0,05$, através do software PRISMA 3.0[®].

Aspectos éticos

O protocolo experimental desenvolvido no presente trabalho foi submetido e aprovado pela comissão de ética em experimentação animal da Universidade Federal de Pernambuco (CCB-UFPE-Ofício 120/2003).

RESULTADOS

Evolução ponderal

O peso corporal médio do grupo etanol (GE) apresentou-se significativamente menor ($p < 0,05$) apenas no período P3, quando comparado ao grupo-controle.

Entre os grupos desnutridos, observou-se que o grupo etanol desnutrido (GED) não diferiu estatisticamente em P3, quando comparado com o grupo desnutrido (GD), embora, em P25 e P40, o GED apresentasse peso médio significativamente mais baixo.

Por outro lado, a comparação entre grupos com o mesmo tratamento, porém com dietas diferentes, isto é, GE *versus* GED, demonstrou que a diferença de peso era significativa nos períodos P25 e P40.

Finalmente, a análise relacionada apenas à dieta empregada mostrou que, nos três períodos estudados, o peso médio dos grupos GC e GD diferiam significativamente entre si, sendo mais baixos nesse último (FIGURA 1).

Estudo histológico

No grupo-controle, não foram encontradas alterações na arquitetura celular nem no sistema vascular cardíaco. Também não ficou evidente a presença de infiltrado inflamatório ou depósitos alterados de colágeno intersticial.

Entre o grupo experimental, apenas no GD e GED observou-se uma intensa vacuolização dos miocardiócitos.

O GE apresentou uma maior quantidade de colágeno perivascular e intersticial, em comparação com o padrão observado nos outros grupos experimentais.

Não foram identificadas diferenças na distribuição de lipofuscina no endo-miocárdio entre os grupos estudados.

Em relação às inclusões PAS-positivas, os grupos GE, GD e GED apresentaram uma distribuição difusa nos cardiomiócitos e marcação intensa no endotélio vascular, diferindo do grupo GC, que exibiu um padrão de marcação bastante restrito.

Análise morfométrica

A análise de imagens para quantificação do endo-miocárdio apresentou número médio de vasos significativamente menor apenas no GD (FIGURA 2), quando comparado ao grupo-controle e demais grupos experimentais, que apresentaram valores assemelhados.

Quanto ao diâmetro médio dos vasos, os grupos GE ($p < 0,001$), GD ($p < 0,05$) e GED ($p < 0,001$) diferiram estatisticamente do grupo-controle, apresentando valores maiores (FIGURA 3).

A análise da fibrose cardíaca perivascular foi realizada através das medidas da espessura do anel de colágeno dos vasos, no endo-miocárdio. Os resultados obtidos indicaram que apenas o grupo GE apresentou valores médios significativamente maiores ($p < 0,01$), em comparação com os demais grupos (FIGURA 4).

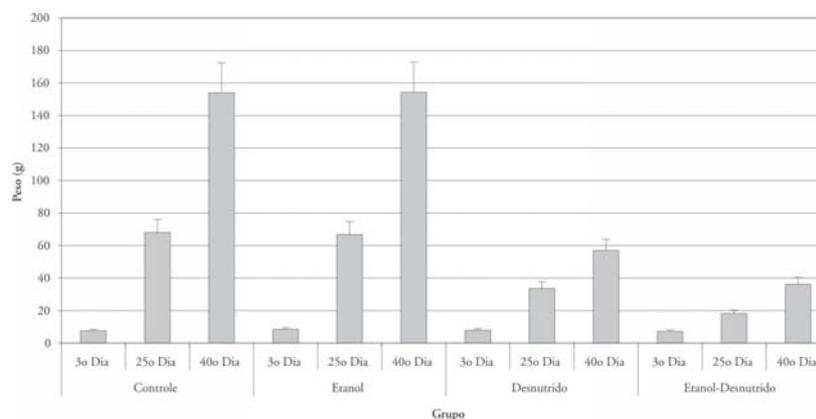


Figura 1 - Evolução ponderal de ratos wistar recém-natos em diferentes períodos de vida (3º a 40º dia) submetidos ao alcoolismo e desnutrição maternos.

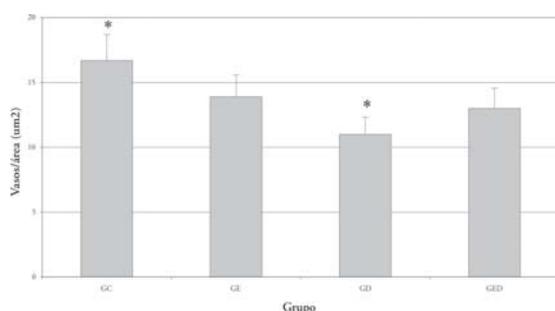


Figura 2 - Número médio de vasos do endo-miocárdio de ratos recém-natos submetidos ao alcoolismo e desnutrição maternos.

Nota: área 12234um², p<0,05)

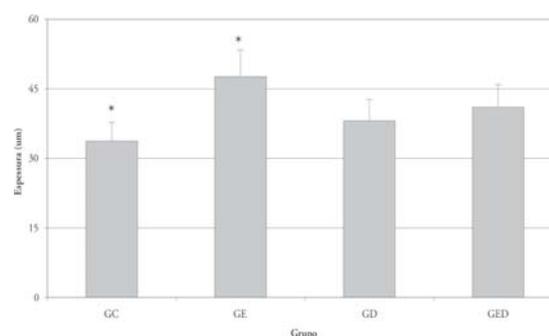


Figura 4 - Espessura média do anel de colágeno perivascular em ratos recém-natos submetidos ao alcoolismo e desnutrição maternos.

Nota: * p<0,01

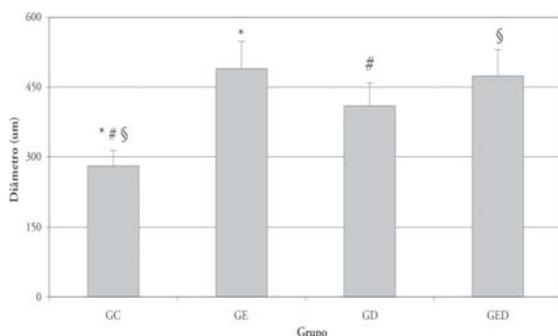


Figura 3 - Diâmetro médio de vasos do endo-miocárdio de ratos recém-natos submetidos ao alcoolismo e desnutrição maternos.

Nota: * § p<0,001; # p<0,05)

DISCUSSÃO

O consumo excessivo do etanol pode resultar numa alta taxa de mortalidade, causando várias doenças, entre as quais se incluem o câncer e a cirrose hepática. Além disso, mais recentemente, as doenças do coração têm representado uma importante causa de morbidade entre alcoolistas crônicos. ⁽¹⁴⁾

A análise do peso corporal médio demonstrou que os grupos etanol (GE) e etanol-desnutrido (GED) tinham peso significativamente menor, quando comparados aos demais grupos. Esse resultado é concordante com o estudo Vary, Lynch e Lang ⁽¹⁴⁾, que também concluiu que a administração crônica de álcool resulta em redução no peso corporal com 25% de perda em proteínas, quando comparado com

o grupo-controle. Embora não tenhamos identificado, na literatura, trabalhos experimentais relacionados ao alcoolismo fetal, comparando os efeitos tóxicos do etanol com os da desnutrição protéica, constatamos que esses fatores isolados e (ou) conjugados contribuem para uma diminuição importante da evolução ponderal dos indivíduos estudados.

Além disso, a desnutrição, determinada pelo reduzido aporte de nutrientes, pode ser agravada no recém-nascido, que, sob a ação indireta do etanol, reduz sua capacidade de mamar e de metabolizar nutrientes, em razão das alterações hepáticas que apresenta. ⁽¹⁵⁾

É possível que radicais livres, resultantes do metabolismo do álcool, participem da patogênese da cardiomiopatia alcoólica. ⁽¹⁶⁾ Eles também podem desempenhar um papel importante nas deficiências nutricionais. No entanto, mesmo assim, a cardiomiopatia alcoólica pode manifestar-se em pessoas com nutrição e suprimento vitamínico normal. ^(17, 18)

Quanto à vacuolização dos cardiomiócitos no grupo desnutrido exposto ao etanol (GED), trabalhos anteriores ^(19, 7) apóiam esses resultados, ao afirmarem que o dano às células miocárdicas, na ingestão excessiva e prolongada de álcool, é atribuído a uma ação tóxica direta do próprio álcool ou de seus metabólitos, especialmente o acetaldeído. E, de fato, uma possível explicação para a vacuolização de cardiomiócitos se deve, pelo menos em parte, ao acúmulo citoplasmático de triglicerídeos.

De acordo com nossos resultados, o grupo etanol (GE) apresentou uma maior quantidade de colágeno perivascular e intersticial, contrariando um estudo morfométrico anterior sobre a cardiomiopatia alcoólica, que revelou um diâmetro menor dos miócitos e um grau leve de fibrose intersticial. ⁽²⁰⁾ Entretanto, estudos mais recentes afirmam que a existência de uma cardiomiopatia diretamente relacionada à ação tóxica do álcool sobre a fibra cardíaca é hoje aceita pela maioria dos autores, tendo em vista evidências clínicas, epidemiológicas, anatomo-patológicas e experimentais. ^(7, 21)

Os resultados obtidos reforçam a idéia de que alterações no citoesqueleto e na matriz colágena extracelular podem afetar a função contrátil, a partir de distúrbios na organização dos componentes que formam a arquitetura intra e intercelular, que é responsável pela organização do tecido cardíaco. ⁽²²⁾

Além das alterações morfológicas resultantes da ingestão de etanol, pode ocorrer uma série de distúrbios bioquímicos que geram acúmulo de substâncias indicadoras de estresse celular, dentre elas a presença de lipofucsina.

Embora Maia e colaboradores ⁽⁷⁾ relatem a presença de pigmento acastanhado (lipofucsina) nos cardiomiócitos de alcoolistas, no presente trabalho esse achado não diferiu entre os grupos experimentais e o grupo-controle (GC). Esse resultado contraditório era esperado, pelo fato de que, em nosso estudo, foram utilizados ratos jovens, enquanto que, no trabalho citado, foram estudados corações humanos em idade avançada.

O aumento dos depósitos de lipofucsina intracelular está classicamente associado com o avanço da idade do indivíduo, sendo normalmente encontrado em neurônios e miócitos cardíacos. Entretanto, não existem evidências de que esse pigmento interfira no metabolismo celular. ⁽²³⁾

Fibrose, infiltrado inflamatório mononuclear, vacuolização de miocardiócitos e acúmulo de lipofucsina são alterações histológicas que têm sido descritas em alcoolistas crônicos, com ou sem manifestações clínicas. ⁽²⁴⁾

Em relação à quantificação do diâmetro e do número médio de vasos do endo-miocárdio,

foram reveladas alterações significativas nos nossos grupos experimentais, havendo concordância com estudo angiográfico e histopatológico *post mortem* em humanos, que demonstrou a existência de alterações na microcirculação coronária em pacientes com cardiomiopatia alcoólica. ⁽²⁵⁾ Na verdade, distúrbios na circulação cardíaca têm sido cada vez mais valorizados na patogênese de doenças cardíacas congestivas ⁽²⁶⁾ e de etiologia chagásica. ⁽²⁷⁾

Utilizamos-nos de uma dieta experimental, Dieta Básica Regional (DBR), que contém apenas 8% de proteínas, o que reproduz as condições alimentares da população pobre da Zona da Mata de Pernambuco ⁽²⁸⁾, a fim de desenvolver um modelo de desnutrição protéica e estudar seus efeitos nas alterações induzidas pelo etanol.

Estudo anterior, de Teodósio e colaboradores ⁽²⁹⁾, que utilizou a DBR, evidenciou que ratas grávidas submetidas a essa dieta geraram proles cujo desenvolvimento corporal era comprometido, semelhante ao encontrado entre as crianças desnutridas, principalmente com corpo de dimensões reduzidas e desproporção entre a cabeça e o resto do corpo. Esse dado também foi observado no presente trabalho, quando se avaliou o peso corporal.

No estudo do alcoolismo em modelos animais, muitas questões podem ser simplificadas em relação ao estudo em humanos, e essa possibilidade facilita a sensibilidade dos estudos e justifica a utilização desses modelos. ⁽³⁰⁾ Este trabalho vem contribuir para reafirmar que a meta da pesquisa animal não é simplesmente mostrar que fetos de roedores podem reagir ao álcool como fetos humanos o fazem, mas estudar a natureza das reações comuns ao álcool, para identificar fatores de risco, para descobrir mecanismos e explorar potenciais tratamentos. ⁽³¹⁾

A análise dos resultados obtidos pela metodologia empregada nos permite concluir que:

- a exposição crônica ao etanol favoreceu uma maior deposição de colágeno perivascular e intersticial no coração;
- apenas os indivíduos expostos à desnutrição protéica exibiram uma diminuição significativa no número de vasos do endo-miocárdio.

Várias pesquisas têm objetivado analisar o efeito isolado e combinado do etanol e da desnutrição na alteração das fibras musculares esqueléticas e cardíacas em ratos, confirmando que a desnutrição potencializa os efeitos do etanol. ⁽⁹⁾

O alcoolismo e a desnutrição protéica experimental promoveram:

- diminuição importante do peso corporal médio, no período a partir do 25º dia de vida;

- inclusões PAS positivas, com distribuição difusa nos cardiomiócitos e deposição intensa no endotélio vascular;

- aumento significativo no diâmetro médio dos vasos do endo-miocárdio.

A partir dos dados obtidos neste trabalho, pode-se constatar que a exposição pré e pós-natal ao etanol induz alterações morfológicas significantes na arquitetura do tecido cardíaco, e muitas dessas alterações são intensificadas pelo estado de desnutrição protéica.

Histochemical and morphometric analysis of the rat cardiac tissue exposed to ethanol and chronic malnutrition

Abstract

Alcoholic mothers, in human and laboratory animals, have been responsible for systemic disturbances in their offspring. The present study evaluated, using the histochemistry and digital analysis of image, the histologic profile of the heart of male newborn rats (Wistar rats) from mothers submitted to two nutritional treatments: 1) commercial laboratory diet (Labina®, with 23% of protein) and 2) low-protein diet (Basic Regional Diet-BRD, with 8% of protein) and chronic ingestion of ethanol (3g/kg/day) or filtered water. It was used four experimental groups Control Group (CG), Ethanol Group (EG), Malnourished Group (MG) and Ethanol-Malnourished Group (EMG). The body weights was evaluated at 3 (P3), 25 (P25) and 40 (P40) days. Morphometric analysis of the perivascular and interstitial collagen, number and average diameter of the cardiac vessels and PAS-positive inclusions in the cardiomyocytes were also studied. The results showed that in P3 only the EG animals had significant lower weight when compared to other groups while. In P25 and P40 the EMG presented significant weight reduction when compared with CG and MG. Significant difference of weight was observed among the different groups with same treatment and diets (EG x EMG) in P25 and P40, having the EMG the lower weight. The image analysis of the perivascular and interstitial collagen demonstrated a significant increase in EG. The MG showed a reduction in the average number of endo-myocardium vessels when compared with other groups. The relationship between ethanol ingestion and malnutrition (EMG) favored a significant increase in the average vessels diameter of the endo-myocardium, as well as PAS-positive inclusions with diffuse distribution in the cardiomyocytes and vascular endothelium. It could be concluded that pre and postnatal exposure to ethanol induces important morphologic changes in the cardiac tissue of the offspring and many of these changes are intensified by the proteic malnutrition.

Keywords: Heart – Ethanol – Malnutrition – Perinatal period; Ethanol exposure

REFERÊNCIAS

1 SCHOPPET, M.; MAISCH, B. Alcohol and the heart. *Herz*, Munchen, v.26, n.5, p.345-352, 2001.

2 LIEBER, C.S. Medical disorders of alcoholism. *N. Engl. J. Med.*, Boston, v.333, p.1058-1065, 1995.

- 3 MANN, L.B.; FOLTS, J.D. Effects of ethanol and other constituents of alcoholic beverages on coronary heart disease: a review. *Pathophysiology*, Amsterdam, v.10, n.2, p.105-112, 2004.
- 4 GU, J.W. et al. Moderate levels of ethanol induce expression of vascular endothelial growth factor and stimulate angiogenesis. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, Bethesda, v.281, n.1, p.R365-R372, 2001.
- 5 VENDEMIALE, G. et al. Mitochondrial oxidative damage and myocardial fibrosis in rats chronically intoxicated with moderate doses of ethanol. *Toxicol. Lett.*, Amsterdam, v.123, n.2/3, p.209-216, 2001.
- 6 MEEHAN, J. et al. Heavy long-term ethanol consumption induces an alpha- to beta-myosin heavy chain isoform transition in rat. *Basic Res. Cardiol.*, Darmstadt, v.94, n.6, p.481-488, 1999.
- 7 MAIA, L.C. et al. Doença do coração em alcoolistas crônicos: estudo de 19 casos. *An. Fac. Med. Univ. Fed. Pernambuco*, Recife, v.47, n.1, p.4-8, 2002.
- 8 SHIBLEY, I.A.; MCINTYRE, T.A.; PENNINGTON, S.N. Experimental models used to measure direct and indirect ethanol teratogenicity. *Alcohol Alcohol.*, Oxford, v.34, p.125-140, 1999.
- 9 CONDEMARTEL, A. et al. Relative and combined roles of ethanol and protein-malnutrition on skeletal-muscle. *Alcohol Alcohol.*, Oxford, v.27, n.2, p.159-163, 1992.
- 10 ADLER, C.P. et al. Regeneration processes in human myocardium after acute ischaemia: quantitative determination of DNA, cell number and collagen content. *Virchows Arch.*, Berlin, v.430, p.149-153, 1997.
- 11 LAGUENS, R.P. et al. Reduced injury and scar in acute myocardial infarctions treated with human growth hormone. *Jpn. Heart J.*, Tokyo, v.39, p.809-817, 1998.
- 12 BERMAN, R.F. et al. Prenatal alcohol exposure and effects of environmental enrichment on hippocampal dendritic spine density. *Alcohol*, New York, v.13, p.209-216, 1996.
- 13 DE LUCA, B.; CIOFFI, L.A.; BURES, J. Cortical and caudate spreading depression as an indicator of neural changes induced by early malnutrition in rats. *Act. Nerv. Sup.*, Praha, v.19, p.130-131, 1977.
- 14 VARY, T.C.; LYNCH, C.J.; LANG, C.H. Effects of chronic alcohol consumption on regulation of myocardial protein synthesis. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, Bethesda, v.281, n.3, p.H1242-H1251, 2001.
- 15 MANSOURI, A. et al. Acute ethanol administration oxidatively damages and depletes mitochondrial DNA in mouse liver, brain, heart, and skeletal muscles: protective effects of antioxidants. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, Bethesda, v.298, n.2, p.737-743, 2001.
- 16 JAARTINEN, P.; SAUKKO, P.; HERVONEN, A. Chronic ethanol exposure increases lipopigment accumulation in human heart. *Alcohol Alcohol.*, Oxford, v.28, p.559-569, 1993.
- 17 SOKOLOW, M.; MCLROY, M.B.; CHEITLIN, M.D. *Clinical cardiology*. 5th ed. London: Prentice-Hall, 1990.
- 18 ROSENBERG, A. Brain damage caused by prenatal alcohol exposure. *Sci. Med.*, Narberth, v.4, p.42-50, 1996.
- 19 SCHOENN, R.J. The heart. In: COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S.L. (Ed.) *Pathologic basis of disease*. 5th ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1994. p.564.
- 20 TERAGAKI, M.; TAKEUCHI, K.; TAKEDA, T. Clinical and histological features of alcohol drinkers with congestive heart failure. *Am. Heart J., St. Louis*, v.125, p.808-817, 1993.
- 21 KIM, S.D. et al. Cardiac structure and function after short-term ethanol consumption in rats. *Alcohol*, New York, v.29, n.1, p.21-29, 2003.
- 22 WILKE, A. et al. Alcohol and myocarditis. *Herz*, Munchen, v.21, n.4, p.248-257, 1996.
- 23 RUBIN, E.; FARBER, J.L. Cell injury. In: RUBIN, E.; FARBER, J. (Ed.) *Pathology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1999. p.13.

- 24 MAIA, L.C. et al. Estudo morfométrico da rede arteriolar miocárdica em indivíduos alcoolistas crônicos. *An. Fac. Med. Univ. Fed. Pernambuco*, Recife, v.44, p.31-33, 1999.
- 25 ESTRUCH, R. et al. Relationship between cardiopathy and liver disease in chronic alcoholism. *Hepatology*, Baltimore, v.22, p.532-537, 1995.
- 26 FACTOR, S.M.; SONNENBLICK, E.H. Hypothesis: is congestive cardiomyopathy caused by a hyperreactive myocardial microcirculation (microvascular spasm)? *Am. J. Cardiol.*, New York, v.50, p.1149-1152, 1982.
- 27 ROSSI, M.A. Microvascular changes as a cause of chronic cardiomyopathy in Chaga's disease. *Am. Heart J., St. Louis* v.120, p.222-236, 1990.
- 28 GUEDES, R.C.A. O cérebro desnutrido. *Ci. Hoje*, Rio de Janeiro, v.3, n.18, p.61-65, 1985.
- 29 TEODÓSIO, N.R. et al. A regional basic diet from Northeast Brazil as a dietary model of experimental malnutrition. *Arch. Latinoam. Nutr.*, Caracas, v.40, p.533-545, 1990.
- 30 LOPES, J.D.M. et al. Correlações entre o teor de colágeno no miocárdio ventricular esquerdo humano medido através de métodos bioquímico e morfométrico. *Arq. Bras. Cardiol.*, São Paulo, v.79, n.1, p.10-14, 2002.
- 31 HANNIGAN, J.E. What research with animals is telling us about alcohol-related neurodevelopmental disorder. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, Tarrytown, v.55, n.4, p.489-499, 1996.

Recebido em / **Received** 30/03/2007
Aceito em / **Accepted** 27/04/2007