

Trabalho de Conclusão de Curso

Victória Mokarzel de Barros Camargo

Lesão causada pela cardiomiopatia alcoólica em ratos bebedores espontâneos de etanol

Orientador: Prof. Francisco Eduardo Martinez

Botucatu

2019

Victória Mokarzel de Barros Camargo

Lesão causada pela cardiomiopatia alcoólica em ratos bebedores espontâneos de etanol

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Instituto de Biociências
da Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Campus de
Botucatu, para obtenção do título de
Bacharel em Ciências Biomédicas

Orientador: Prof. Francisco Eduardo Martinez

Botucatu

2019

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família por todo apoio durante esses quatro anos, meu pai Paulo, minha mãe Rita e minha irmã Laila, que durante todo esse tempo não mediram esforços para me verem feliz e realizada. Vocês são meu exemplo de vida e união.

Ao meu companheiro de uma vida toda, Rômulo, que sempre esteve comigo em todos os momentos de trabalho e comemoração, obrigada por ser o meu maior apoio.

Ao meu orientador Professor Dr. Francisco E. Martinez, que me ensinou o que é ser uma cientista de verdade, me fazendo crescer e evoluir de uma maneira que nunca pude imaginar.

A minha coorientadora Professora Dra. Patricia F. F. Pinheiro, que sempre acreditou em mim e me deu todas as oportunidades que sempre precisei.

A todos os meus professores, por me mostrarem um universo de conhecimento e me ensinarem a sempre questionar o mundo ao redor.

“Ao cadáver que, jacente na fria lousa do laboratório, me permitiu aprender Anatomia”.

Obrigada!

“A alegria não chega apenas no encontro do achado, mas faz parte do processo da busca. E ensinar e aprender não pode dar-se fora da procura, fora da boniteza e da alegria”

Paulo Freire

SUMÁRIO

RESUMO	I
ABSTRACT	II
1 INTRODUÇÃO	1
2 METODOLOGIA	3
2.1 Animais	3
2.2 Delineamento experimental	3
2.3 Coleta de dados	3
2.4 Análise histológica	4
2.5 Imunohistoquímica	4
2.6 Estatística	5
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	6
3.1 Hematoxilina e Eosina (HE)	6
3.2 Tricrômio de Masson (TM)	7
3.3 Ki67	9
3.4 Caspase 3	9
3.5 IL 1	10
3.6 TNF α	10
4 CONCLUSÃO	13
5 REFERÊNCIAS	14

RESUMO

Quando se fala em patologias causadas ou agravadas pela ingestão constante de etanol, logo vem à mente das pessoas enfermidades ligadas ao fígado e ao sistema nervoso central, no entanto, a ingestão aguda de grandes quantidades de etanol e o abuso crônico induzem efeitos tóxicos na maioria dos tecidos. O coração ganha destaque, uma vez que a cardiomiopatia alcoólica (CA) possui prevalência, entre os alcoolistas, de 23 a 40%, e ocorre com maior frequência nos homens do que nas mulheres. A CA caracteriza-se por dilatação e contração deficiente de um ou ambos os ventrículos, na presença de aumento da espessura da parede ventricular, juntamente com longa história de abuso de etanol, sem outra causa identificada. Nosso objetivo é quantificar a taxa de reposição tecidual cardíaca, a deposição de feixes de fibras colágenas e as citocinas pró-inflamatórias no miocárdio do ventrículo esquerdo de ratos bebedores voluntários de etanol.

Palavras chave: cardiomiopatia alcoólica, coração, etanol, ratos UChB.

ABSTRACT

When speaking of pathologies caused or aggravated by the constant ingestion of ethanol, people with liver and central nervous system diseases soon come to mind, however, the acute intake of large amounts of ethanol and chronic abuse induce toxic effects in the majority of tissues. The heart is highlighted, since alcoholic cardiomyopathy (AC) has prevalence among alcoholics of 23 to 40%, and occurs more frequently in men than in women. AC is characterized by dilation and poor contraction of one or both ventricles, in the presence of increased ventricular wall thickness, along with a long history of ethanol abuse, with no other cause identified. Our objective is to quantify the rate of cardiac tissue replacement, collagen fiber deposition, and pro inflammatory cytokines in the left ventricle myocardium of volunteer ethanol drinking rats.

Key words: alcoholic cardiomyopathy, heart, ethanol, UChB rats.

1- INTRODUÇÃO

O etanol está presente no cotidiano do ser humano desde a pré-história, quando surgiram as primeiras bebidas alcoólicas, a partir da aparição da agricultura e invenção da cerâmica (CISA, 2018). O etanol é responsável pela morte de aproximadamente 2,5 milhões de pessoas por ano, em todo o mundo, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (O'KEEFE et al., 2014). Ocupa o terceiro lugar na taxa de mortalidade, sendo que mais de 50% dessas mortes são provocadas por causas externas e quase um terço das mortes cardiovasculares ocorrem no contexto de beber em excesso (KRYZHANOVSKII et al., 2017). Quando se fala em patologias causadas ou agravadas pela ingestão constante de etanol, logo vem à mente das pessoas enfermidades ligadas ao fígado e ao sistema nervoso central (SNC), no entanto, a ingestão aguda de grandes quantidades de etanol e o abuso crônico induzem efeitos tóxicos na maioria dos tecidos (MIRIJELLO et al., 2017).

Dentre esses órgãos, o coração ganha destaque, uma vez que a cardiomiopatia alcoólica (CA) possui prevalência, entre os alcoolistas, de 23 a 40%, e ocorre com maior frequência nos homens do que nas mulheres (IACOVONI; DE MARIA; GAVAZZI, 2010). Essa doença caracteriza-se por dilatação e contração deficiente de um ou ambos os ventrículos, na presença de aumento da espessura da parede ventricular, juntamente com longa história de abuso de etanol, sem outra causa identificada. Na avaliação histológica, dilatação, necrose miofibrilar e fibrose estão tipicamente presentes, com redução de miofibrilas e mitocôndrias gigantes (MIRIJELLO et al., 2017). Uma das possíveis explicações envolve a inflamação dos cardiomiócitos, causada pelo etanol e seus metabólitos. Há ligação entre o consumo crônico de etanol e a produção de citocinas pró-inflamatórias e subsequente ativação de vias de sinalização inflamatória no coração e no SNC (OBAD et al., 2018), conseqüentemente há estresse oxidativo e processos degenerativos.

Há perda de cardiomiócitos devido a apoptose frente a altas concentrações de etanol em animais. Além disso, casos de CA apresentam cardiomiócitos com hipertrofia moderada, morte celular e músculo dilatado (GEORGE; FIGUEREDO, 2011). Nosso modelo experimental é a variedade de ratos Wistar UChB, animais que ingerem etanol de forma espontânea e crônica. A linhagem surgiu na Universidade do Chile através do cruzamento consanguíneo de ratos que ingeriam, de forma

voluntária, quantidades elevadas de etanol (MARDONES, 1953). O modelo se assemelha em diversos pontos com o homem alcoólico, o que permite que no primeiro momento, dados obtidos em animais possam direcionar achados clínicos.

Há mecanismos que procuram explicar a diminuição do número de cardiomiócitos na CA: desequilíbrio da taxa de reposição tecidual cardíaca (relação entre mitose e morte celular), lesão direta tecidual (com consequente deposição de tecido conjuntivo denso, processo de cicatrização) e desencadeamento de processo inflamatório crônico (aumento de citocinas pró-inflamatórias). Dessa forma, nosso objetivo é quantificar a taxa de reposição tecidual cardíaca, a deposição de feixes de fibras colágenas e as citocinas pró-inflamatórias no miocárdio do ventrículo esquerdo de ratos bebedores voluntários de etanol.

2- METODOLOGIA

2.1 Animais

Dez ratos machos adultos com 115 dias de idade (adultos), pesando entre 300-400 g, *Rattus norvegicus albinus*, da variedade Wistar, denominados UChB (Universidade do Chile), bebedores espontâneos de alta concentração de etanol (consumo maior que 2 g de etanol/Kg de peso corpóreo/dia) e dez ratos UChB machos adultos com 130 dias de idade, pesando entre 300-400 g, não expostos ao etanol, chamados ratos UChBC obtidos do Departamento de Anatomia, Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP - Univ Estadual Paulista. Os ratos foram alojados individualmente em gaiolas de polipropileno (43X30X15 cm) com maravalha e mantidos em temperatura ambiente constante (23 ± 1 °C) e iluminação (ciclo claro / escuro de 12 h, com as luzes acesas 6 h). Os ratos foram tratados com uma dieta sólida constituída por ração padrão para roedores e água filtrada à vontade.

O protocolo experimental (1185/19-CEUA) seguiu os princípios éticos em pesquisa animal regidos pela Lei Federal 11.794 de 08 de outubro de 2008, regulamentada pelo Decreto nº 6.899 de 2009, segundo as resoluções do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA (BRASIL, 2015).

2.2 Delineamento experimental

Quando os ratos atingiram 65 dias de idade, foram dadas duas garrafas, uma contendo solução de etanol e outra água, para livre escolha durante o período de 15 dias. Os ratos que apresentarem consumo de etanol > 2 g de etanol/kg/dia estavam aptos para o estudo. Posteriormente, os ratos com perfil da variedade UChB foram divididos em dois grupos ($n = 20$): grupo UChB, no qual os ratos tiveram livre acesso a solução de etanol a 10% (v / v) e água à vontade durante 50 dias e o grupo UChBC, no qual os ratos não tiveram acesso a solução de etanol, somente água à vontade durante 50 dias.

2.3 Coleta

Para o procedimento de eutanásia, primeiramente os animais foram colocados em câmaras de saturação de gás carbônico para serem anestesiados.

Posteriormente, os ratos foram decapitados para coleta do sangue e foi realizada a abertura da cavidade torácica para coleta do coração. O coração foi seccionado no plano sagital mediano com o auxílio de lâmina de aço inoxidável (marca Feather) e as partes fixadas em paraformaldeído a 4% durante 24h. Posteriormente, lavadas em água corrente por 72 h e armazenadas em etanol 70%.

2.4 Análise histológica

A análise histológica possibilitou avaliar a integridade da estrutura do tecido cardíaco corado com Hematoxilina & Eosina (HE) e o processo cicatricial, se presente, através da marcação dos feixes de fibras colágenas com Tricrômico de Masson (TM). Os fragmentos do ventrículo esquerdo do coração foram embebidos em parafina, seccionados com quatro μm de espessura e corados com HE e TM. Os cortes foram examinados em microscópio de luz.

2.5 Imunohistoquímica

Para avaliar o desequilíbrio da taxa de reposição tecidual cardíaca foram realizados ensaios relacionados à mitose (Ki67) e à morte celular por apoptose (Caspase 3). Os cortes de tecidos, dos 10 ratos de cada grupo, foram corados com anticorpos contra Ki-67 (Novocastra, *Laboratories Ltd*) e Caspase 3 (Biocare - EUA), de acordo com o protocolo de fabricação. Após imunorreações, as lâminas foram lavadas em tampão TBS-T e incubadas com anticorpos secundários (*Polymer Anti-Mouse IgG ou Anti-Rabbit - DAKO & CYT*) por 1 h. Em seguida, as lâminas foram coradas com diaminobenzidina (DAB; Sigma, St. Louis, MO, EUA) e contrastadas com Hematoxilina. Cinco lâminas de cada ventrículo esquerdo com três secções por lâmina foram coradas. Os cortes foram analisados e fotomicrografados utilizando o microscópio Zeiss, modelo Axiophot2 Plus, com câmera (AxioCam MR1) acoplada ao microscópio e analisados pelo programa Axio Vision 4.61 com 400 X de aumento.

O processo inflamatório foi avaliado pelas citocinas pró-inflamatórias (IL 1 e TNF α). As concentrações das citocinas foram medidas no plasma coletado de ratos por imuno ensaio multiplex, usando o painel magnético MILLIPLEX MAP *RatCytokine / Chemokine* de acordo com as instruções do fabricante (Millipore). A reatividade cruzada da espécie foi avaliada pelo fabricante (<http://www.abacus->

als.com/media/Milliplex_2014.pdf, sistema Millipore, MAGPIX® e software MILLIPLEX® Analyst 5.1).

2.6 Estatística

Os dados foram representados como a média (\bar{X}) \pm desvio padrão da média (DP). Diferenças de $p < 0,05$ foram consideradas significativas. Os resultados foram expressos como $\bar{x} \pm DP$. A significância das diferenças entre as médias foi analisada pelo teste t de *Student*. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo. O *GraphPad Prism 6.0* (GraphPad Software, La Jolla, Califórnia, Estados Unidos) foi usado para calcular os valores de p da diferença.

3- RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Hematoxilina e Eosina (HE)

Verificamos que as fibras cardíacas se apresentaram mais espaçadas e com menor quantidade de núcleos. Além disso, constatamos maior presença de fibroblastos nos ratos do UChB. Notamos maior presença de hemácias e aproximação maior entre os núcleos dos cardiomiócitos nos UChBC.

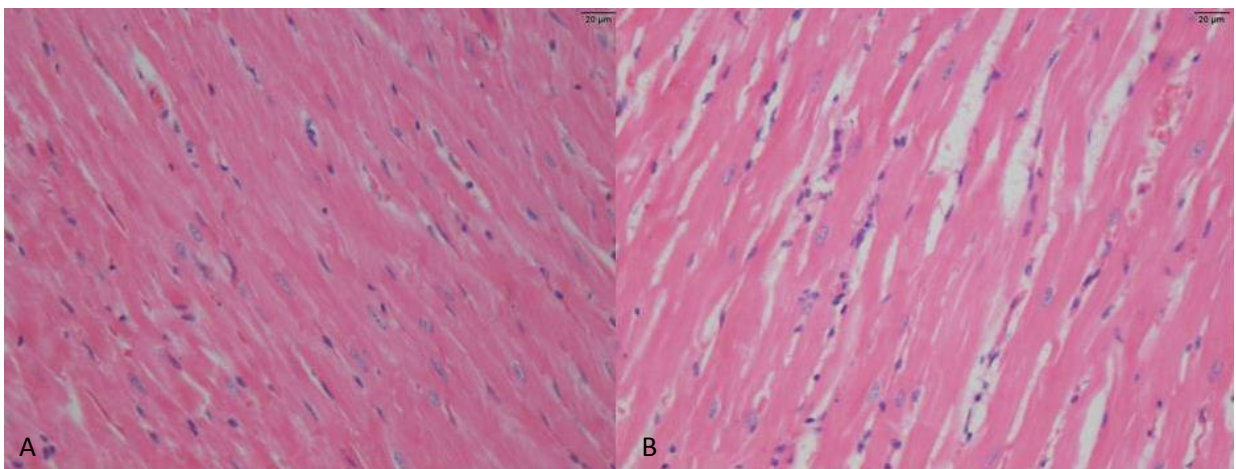


Fig.1. Imagens seccionais do ventrículo esquerdo de ratos UChBC (A) e UChB (B). Ambas coradas com HE.

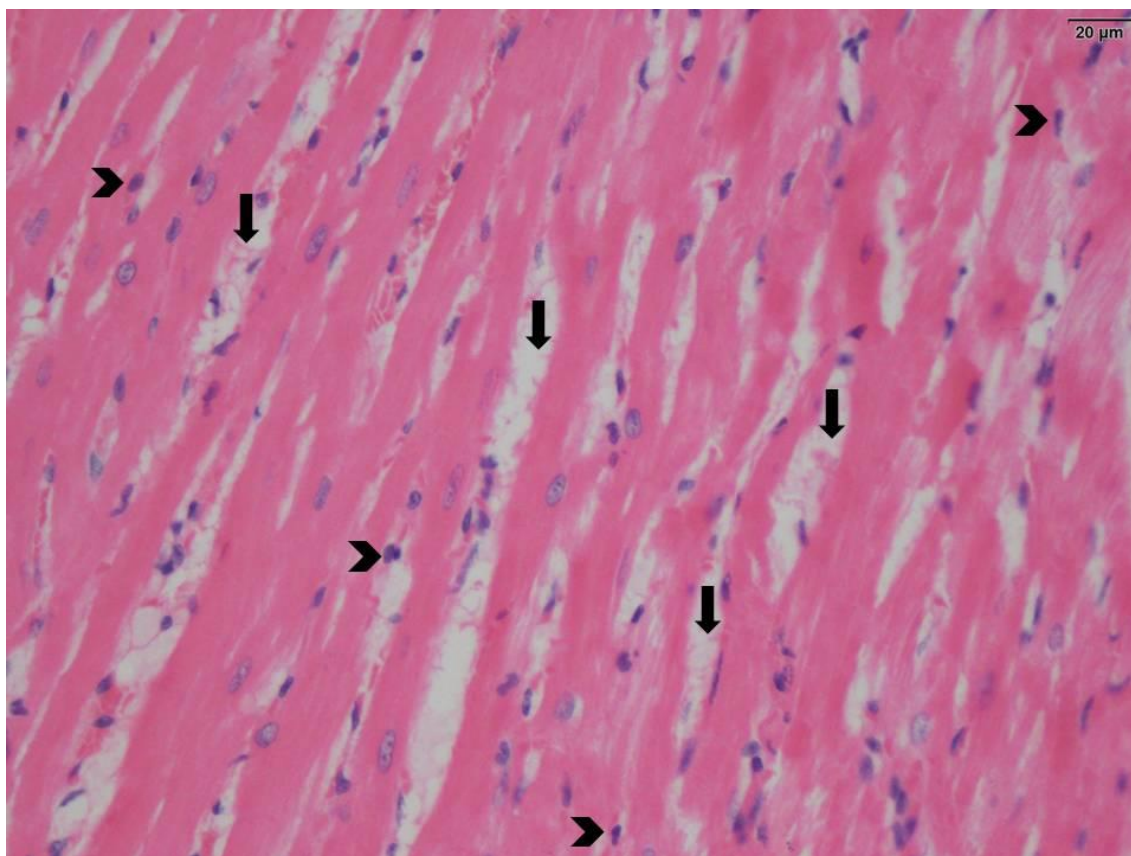


Fig. 2. Corte seccional do ventrículo esquerdo do UChB. Setas indicam os espaços aumentados entre os feixes de fibras (cardiomiócitos) e as cabeças de seta os núcleos dos fibroblastos. HE.

3.2 Tricrômico de Masson (TM)

Verificamos que as estriações das fibras cardíacas são mais evidentes nos UChBC, pois o UChB apresentou miocitólise. Notamos maior presença de deposição de feixes de fibras colágenas no UChB. Além de modificações ligadas a remodelação do tecido, alterações vasculares também se destacaram, sendo que os UChB possuem menor irrigação.

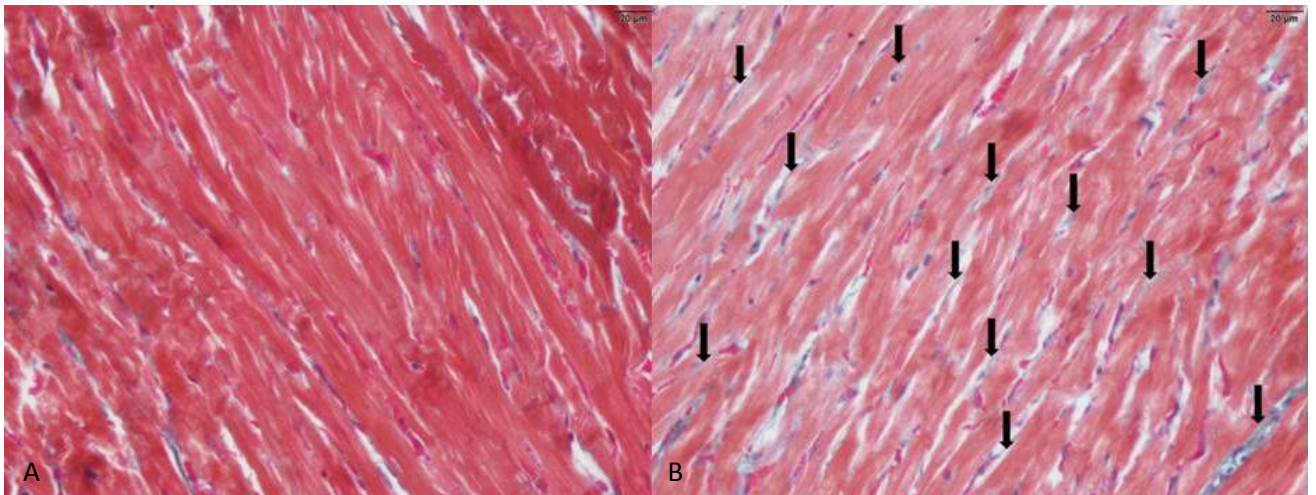


Fig. 3. Imagens seccionais do ventrículo esquerdo de ratos UChBC (A) e UChB (B). Setas apontam os feixes de fibras colágenas. Ambas coradas com TM.

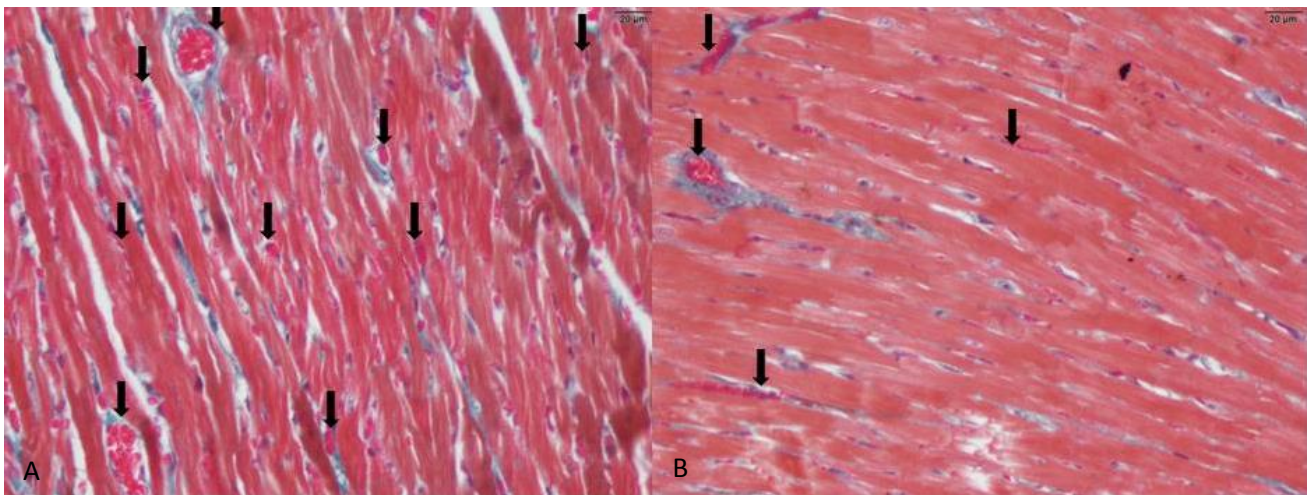


Fig. 4. Imagens seccionais do ventrículo esquerdo de ratos UChBC (A) e UChB (B). Setas apontam os vasos. Ambas coradas com TM.

3.3 Ki67

No teste imunohistoquímico de proliferação celular, verificamos maior atividade proliferativa nos UChB.

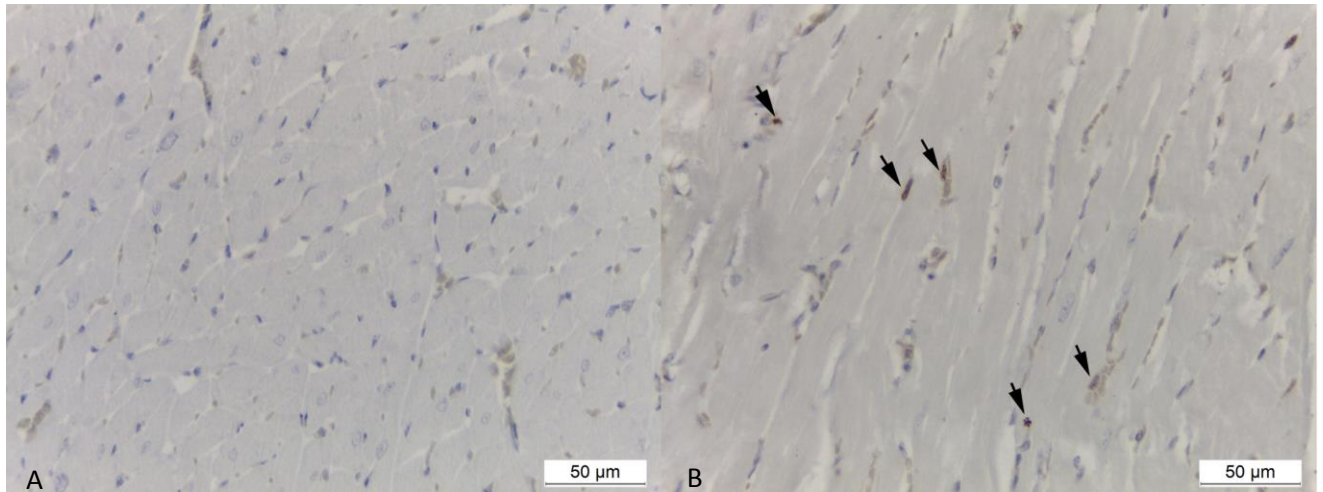


Fig. 5. Imagens seccionais do ventrículo esquerdo de ratos UChBC (A) e UChB (B). Setas apontam núcleos marcados de células em proliferação.

3.4 Caspase 3

No teste imunohistoquímico referente a apoptose, verificamos maior quantidade de núcleos marcados nos UChB.

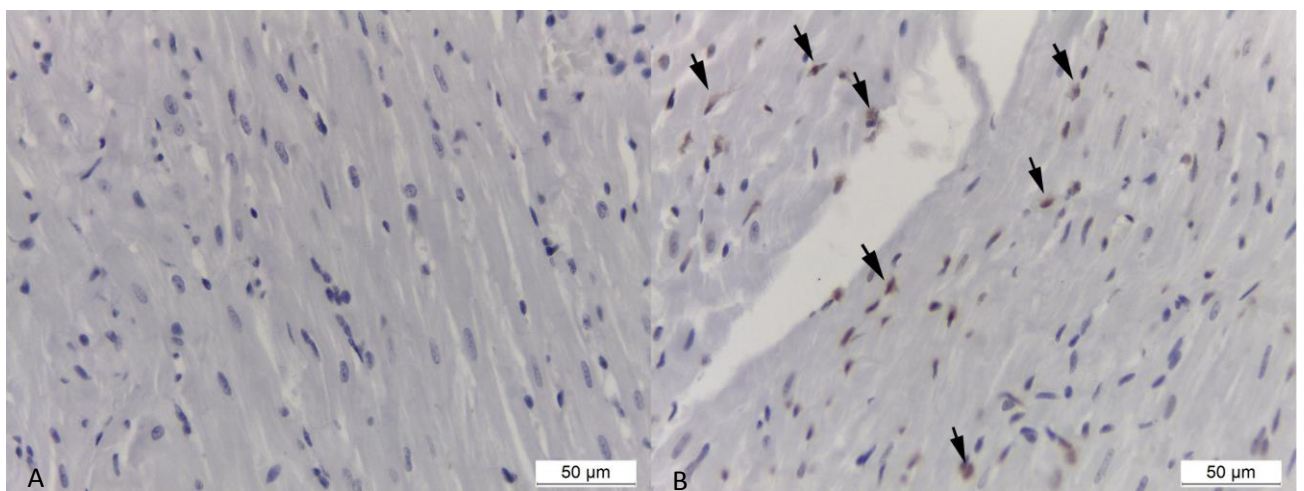


Fig. 6. Imagens seccionais do ventrículo esquerdo de ratos UChBC (A) e UChB (B). Setas apontam núcleos marcados de células em apoptose.

3.5 IL 1

A citocina IL 1 não apresentou diferença entre os grupos.

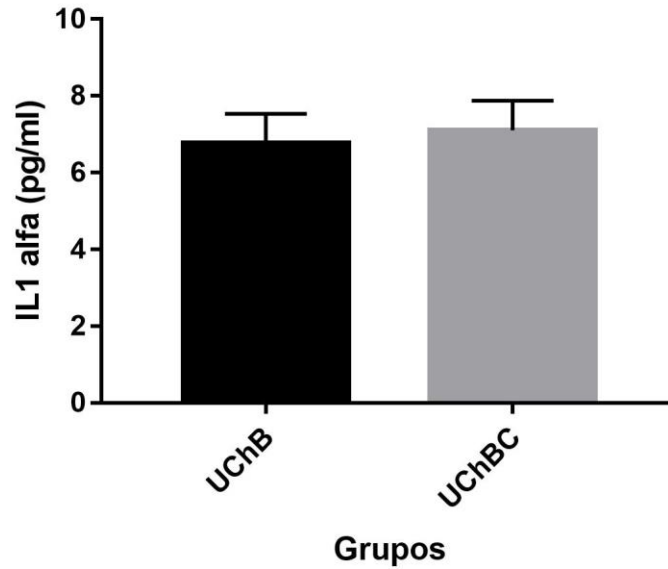


Fig. 7. IL 1 alfa dos grupos UChB e UChBC (dados apresentados como média \pm SEM, n=10 ratos/grupo, p<0,05, teste T não pareado)

3.6 TNF α

A citocina TNF α não apresentou diferença entre os grupos.

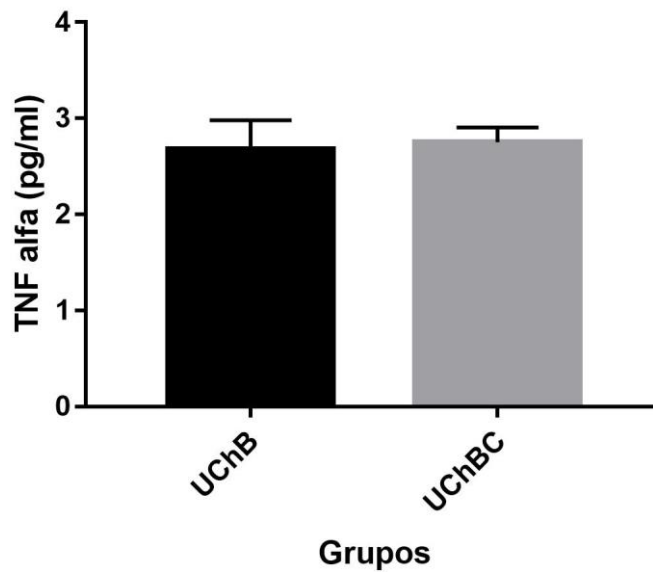


Fig. 8. TNF alfa dos grupos UChB e UChBC (dados apresentados como média \pm SEM, n=10 ratos/grupo, p<0,05, teste T não pareado)

O uso do etanol leva a maior espaçamento entre as fibras cardíacas, menor quantidade de núcleos, maior presença de fibroblastos, alteração das estriações, maior deposição de feixes de fibras colágenas e alterações vasculares. O etanol é uma molécula biologicamente pequena e altamente reativa que se difunde facilmente nas membranas biológicas e compartimentos intracelulares, sendo capaz de atingir todas as organelas. Interage com fosfolipídios de membrana, canais iônicos e receptores, modificando sua estrutura e função, alterando o trânsito intracelular, a energia celular e o estado oxidativo (FERNÁNDEZ-SOLÀ, 2015; REN; WOLD, 2008). Em meio a esse ambiente de injúria, os cardiomiócitos desenvolvem mecanismos de reparo como hipertrofia e graus de reposição celular, podendo de alguma forma atenuar a geração de lesões. Eventualmente lesões estruturais irreversíveis se desenvolvem com apoptose.

O balanço entre mecanismos de proliferação celular e reparo de lesões definem o grau e a reversibilidade do dano cardíaco (FERNÁNDEZ-SOLÀ, 2015). O desenvolvimento da hipertrofia se dá a partir do estresse gerado nas fibras e ocorre juntamente com aumento da montagem de sarcômeros em resposta à alta demanda de débito cardíaco. Tal efeito é provavelmente causado por fatores de crescimento circulantes aumentados e citocinas, juntamente com a ativação neuro-hormonal (JI, 2012; MACHACKOVA; BARTA; DHALLA, 2006). O aumento do volume celular dos cardiomiócitos permite que uma menor quantidade de fibras passe a ocupar o lugar onde antes havia um maior número delas.

Na cardiomiopatia alcoólica há aumento na expressão de Miostatina (Mstn) cardíaca. A Mstn inibi a Proteína Quinase Ativada por Mitogênio (MAPK) (LANG et al., 2004; SHIMIZU; MINAMINO, 2016) e interage com proteínas metabólicas e enzimas (KEMALADEWI et al., 2012). A MAPK faz parte da via de sinalização por fator de crescimento que regula as atividades dos cardiomiócitos e tem relação com a hipertrofia e com mecanismos anti-apoptóticos e de sobrevivência (BIESEMANN et al., 2014). A apoptose de cardiomiócitos é o principal mecanismo de perda celular induzida pelo álcool (FERNANDEZSOLA et al., 2006; WANG et al., 2015).

Além de hipertrofia celular e nuclear, o coração exposto ao etanol apresenta miocitólise e fibrose intersticial. A miocitólise caracteriza-se pela dissolução e desarranjo de miofibrilas e vacuolização celular (FERNÁNDEZ-SOLÀ, 2015). Isso

pode gerar alterações no interstício, afetando o metabolismo e o desempenho dos cardiomiócitos e, em última análise, a função dos ventrículos (SCHNEE, 2000). A observação do maior espaçamento entre os feixes de fibras é indicativo de alteração no espaço intercelular. Possivelmente, o maior espaço está relacionado à fibrose intersticial que aumenta a distância de difusão do oxigênio, reduzindo a pressão arterial parcial de oxigênio para os cardiomiócitos. Além disso, o acoplamento elétrico dos cardiomiócitos pode ser prejudicado pelo acúmulo de proteínas e fibroblastos na matriz extracelular (WEBER; BRILLA, 1991).

Cardiomiócitos são os principais responsáveis pela contratilidade cardíaca, porém representam apenas 30% das células do coração saudável de ratos e 28% nos humanos. Já os fibroblastos cardíacos representam 64% das células cardíacas em ratos e 72% em humanos (BANERJEE et al., 2007; VLIEGEN et al., 1991). Dessa forma, o aumento da quantidade de fibroblastos é preocupante, pois atuam nos processos de hipertrofia e fibrose. O fator de crescimento de fibroblasto 2 (Fgf-2) é o principal promotor parácrino na indução de hipertrofia cardíaca através da via de ativação da MAPK (BOGOYEVITCH et al., 1994; PELLIEUX et al., 2001). A principal fonte de Fgf-2 no coração são os fibroblastos (SANTIAGO et al., 2011). O Fgf-2 possui isoformas, uma de alto peso molecular e outra de baixo, sendo que as duas são produzidas pelo mesmo mRNA (KARDAMI et al., 2004; LIAO et al., 2009). O Fgf-2 de alto peso molecular induz hipertrofia cardíaca in vivo (JIANG et al., 2007) e os fibroblastos cardíacos produzem apenas essa proteína de alto peso molecular (SANTIAGO et al., 2011), através da estimulação da angiotensina II e a secretam pela caspase-1 (NICKEL; RABOUILLE, 2009).

Não há processo inflamatório caracterizado pelas citocinas pró-inflamatórias IL 1 e TNF, possivelmente devido ao processo adaptativo do uso crônico do etanol na variedade. No entanto, outros mecanismos de injúria podem estar presentes como desequilíbrio no metabolismo celular.

4- CONCLUSÃO

O etanol altera a estrutura e o metabolismo do miocárdio do ventrículo esquerdo de ratos bebedores voluntários de etanol, prejudicando a função cardíaca. Nossos achados despertam o interesse no aprofundamento dos mecanismos envolvidos.

5- REFERÊNCIAS

BANERJEE, I. et al. Determination of cell types and numbers during cardiac development in the neonatal and adult rat and mouse. **American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology**, v. 293, n. 3, p. H1883-1891, set. 2007.

BIESEMANN, N. et al. Myostatin regulates energy homeostasis in the heart and prevents heart failure. **Circulation Research**, v. 115, n. 2, p. 296–310, 7 jul. 2014.

BOGOYEVITCH, M. A. et al. Endothelin-1 and fibroblast growth factors stimulate the mitogen-activated protein kinase signaling cascade in cardiac myocytes. The potential role of the cascade in the integration of two signaling pathways leading to myocyte hypertrophy. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 2, p. 1110–1119, 14 jan. 1994.

FERNANDEZSOLA, J. et al. Evidence of apoptosis in alcoholic cardiomyopathy☆. **Human Pathology**, v. 37, n. 8, p. 1100–1110, ago. 2006.

FERNÁNDEZ-SOLÀ, J. Cardiovascular risks and benefits of moderate and heavy alcohol consumption. **Nature Reviews Cardiology**, v. 12, n. 10, p. 576–587, out. 2015.

JI, C. **Mechanisms of Alcohol-Induced Endoplasmic Reticulum Stress and Organ Injuries**. Research article. Disponível em:

<<https://www.hindawi.com/journals/bri/2012/216450/>>. Acesso em: 4 jul. 2019.

JIANG, Z.-S. et al. High- but not low-molecular weight FGF-2 causes cardiac hypertrophy in vivo; possible involvement of cardiotrophin-1. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 42, n. 1, p. 222–233, jan. 2007.

KARDAMI, E. et al. Fibroblast growth factor 2 isoforms and cardiac hypertrophy. **Cardiovascular Research**, v. 63, n. 3, p. 458–466, 15 ago. 2004.

KEMALADEWI, D. U. et al. Cell-type specific regulation of myostatin signaling. **FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 26, n. 4, p. 1462–1472, abr. 2012.

LANG, C. H. et al. IGF-I/IGFBP-3 ameliorates alterations in protein synthesis, eIF4E availability, and myostatin in alcohol-fed rats. **American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism**, v. 286, n. 6, p. E916-926, jun. 2004.

LIAO, S. et al. Biological functions of the low and high molecular weight protein isoforms of fibroblast growth factor-2 in cardiovascular development and disease. **Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists**, v. 238, n. 2, p. 249–264, fev. 2009.

MACHACKOVA, J.; BARTA, J.; DHALLA, N. S. Myofibrillar remodeling in cardiac hypertrophy, heart failure and cardiomyopathies. **The Canadian Journal of Cardiology**, v. 22, n. 11, p. 953–968, set. 2006.

NICKEL, W.; RABOUILLE, C. Mechanisms of regulated unconventional protein secretion. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, v. 10, n. 2, p. 148–155, fev. 2009.

PELLIEUX, C. et al. Dilated cardiomyopathy and impaired cardiac hypertrophic response to angiotensin II in mice lacking FGF-2. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 108, n. 12, p. 1843–1851, dez. 2001.

REN, J.; WOLD, L. E. Mechanisms of alcoholic heart disease. **Therapeutic Advances in Cardiovascular Disease**, v. 2, n. 6, p. 497–506, dez. 2008.

SANTIAGO, J.-J. et al. Preferential accumulation and export of high molecular weight FGF-2 by rat cardiac non-myocytes. **Cardiovascular Research**, v. 89, n. 1, p. 139–147, 1 jan. 2011.

SCHNEE, J. Angiotensin II, adhesion, and cardiac fibrosis. **Cardiovascular Research**, v. 46, n. 2, p. 264–268, maio 2000.

SHIMIZU, I.; MINAMINO, T. Physiological and pathological cardiac hypertrophy. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 97, p. 245–262, 2016.

VLIEGEN, H. W. et al. Myocardial changes in pressure overload-induced left ventricular hypertrophy. A study on tissue composition, polyploidization and multinucleation. **European Heart Journal**, v. 12, n. 4, p. 488–494, abr. 1991.

WANG, Y. et al. High-dose alcohol induces reactive oxygen species-mediated apoptosis via PKC- β /p66Shc in mouse primary cardiomyocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 456, n. 2, p. 656–661, 9 jan. 2015.

WEBER, K. T.; BRILLA, C. G. Pathological hypertrophy and cardiac interstitium. Fibrosis and renin-angiotensin-aldosterone system. **Circulation**, v. 83, n. 6, p. 1849–1865, jun. 1991.