

O consumo crônico de etanol impacta o desempenho e a produção de energia do ventrículo esquerdo de ratos machos e fêmeas

Victória Mokarzel de Barros Camargo

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração: Biologia Celular Estrutural e Funcional.

Prof. Francisco Eduardo Martinez

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

**O CONSUMO CRÔNICO DE ETANOL IMPACTA O
DESEMPENHO E A PRODUÇÃO DE ENERGIA DO
VENTRÍCULO ESQUERDO DE RATOS MACHOS E
FÊMEAS**

Victória Mocarzel de Barros Camargo

Prof. Francisco Eduardo Martinez

Profa. Aline Mara dos Santos

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração: Biologia Celular Estrutural e Funcional.

Francisco Eduardo Martinez

**BOTUCATU – SP
2022**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Camargo, Victoria Mokarzel de Barros.

O consumo crônico de etanol impacta o desempenho e a produção de energia do ventrículo esquerdo de ratos machos e fêmeas / Victoria Mokarzel de Barros Camargo. - Botucatu, 2022

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Francisco Eduardo Martinez

Coorientador: Aline Mara dos Santos

Capes: 40101100

1. Cardiomiopatia alcoólica. 2. Coração. 3. Etanol. 4. Mitocôndrias.

Palavras-chave: Cardiomiopatia alcoólica; Coração; Etanol; Mitocôndria.

Agradecimentos

Essa foi uma jornada de muito aprendizado, mas o maior deles foi lidar com a adversidade e completar as tarefas apesar de muitas dificuldades. Por isso, deixo aqui meu agradecimento a todos que contribuíram para essa realização.

Agradeço a minha irmã Laila, pai Paulo e mãe Rita por me apoiarem durante toda a minha jornada, nada disso seria possível sem vocês, obrigada por acreditarem em mim e por mim.

Ao meu parceiro de vida, Rômulo, que esteve comigo em todos os momentos, sendo meu suporte e meu alicerce. Sem você eu não teria chegado até aqui.

A minha sogra Janete, meu cunhado Rodrigo e minha concunhada Giane por sempre estarem presentes, me dando apoio.

À minha irmã científica e amiga Vanessa, por sempre estar ao meu lado dizendo que tudo daria certo. E meus colegas do Setor de Anatomia, Henrique, Felipe, Letícia, Maira e Alana, constantemente prontos a me ajudar.

Ao meu colega Felipe César por todo seu empenho na realização dos meus experimentos, estando em prontidão para me atender.

A minha amiga Ana, que se manteve comigo desde a graduação, e foi minha confidente em todos os momentos.

Aos meus amigos do Cursinho pré-vestibular Atena e do Centro de Voluntariado Universitário que em muitos momentos, durante a pandemia, me fizeram companhia remotamente e me mantiveram ativa, sempre seguindo em frente e tentando fazer do mundo um lugar melhor.

Especialmente ao meu orientador que mais uma vez pegou na minha mão e permitiu que eu colocasse mais um tijolo na construção do meu saber científico.

Ao rato de laboratório que doa sua vida em prol da ciência.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 3300406-4.

Muito obrigada!

“O maior inimigo do conhecimento não é a
ignorância, é a ilusão do conhecimento.”

Stephen Hawking

SUMÁRIO

Resumo	6
Abstract	7
I Introdução	8
II Material e métodos	13
2.1 Animais.....	13
2.2 Delineamento experimental.....	13
2.3 Eletrocardiograma	14
2.4 Ecocardiograma	15
2.5 Teste de esforço	16
2.6 Coleta.....	16
2.7 Análise histológica	17
2.8 Avaliação do dano mitocondrial.....	17
2.9 Avaliação da taxa de reposição tecidual.....	18
2.10 Análise estatística	18
III Resultados.....	18
3.1 Consumo alimentar.....	18
3.2 Ganho de peso	20
3.3 Peso relativo do coração	21
3.5 Ecocardiograma	23
3.6 Teste de esforço	24
3.8 Dano mitocondrial	26
3.9 Taxa de reposição tecidual	28
IV Discussão	29
V Conclusão	34
VI Referências bibliográficas compiladas	34

Resumo

Introdução: Nosso grupo de pesquisa encontrou feixe de fibras espaçadas, estriações celulares menos evidentes, deposição de feixes de fibras colágenas e maior presença de fibroblastos no tecido cardíaco de ratos que ingeriram etanol, de forma voluntária e crônica. Além disso, observamos aumento na divisão e morte celular de cardiomiócitos. Para descobrir se essas alterações levam a diminuição do desempenho do coração e geram danos mitocondriais, alguns testes clínicos e moleculares foram realizados. **Objetivo:** investigar se a ingestão crônica de etanol altera o desempenho e a produção de energia do ventrículo esquerdo de ratos machos e fêmeas da variedade UChB. **Material e métodos:** dez machos e dez fêmeas adultas de ratos 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 e dez ratas UChB fêmeas adultas, não expostos ao etanol, ratos UChBC (controles) foram utilizados. O desempenho cardíaco foi avaliado pelo teste de esforço, eletrocardiograma e ecocardiograma. A determinação da taxa de reposição tecidual foi feita com o Ki 67 (mitose) e CYCS (apoptose). A avaliação do dano mitocondrial foi realizada através da quantificação da COX-IV, SDH-A e ADH. **Resultados:** O etanol crônico gera menor ganho de peso e aumento do peso relativo do coração em machos e fêmeas expostas, aumento do intervalo QT, diminuição do intervalo RR e aumento da FC em fêmeas expostas. Aumento da espessura diastólica da parede posterior do VE (EDPP), da espessura diastólica do septo interventricular (EDSIV) e espessura relativa do VE (ERVE) foram verificados em machos expostos. Entre os sexos, a exposição levou ao aumento do diâmetro diastólico (DDVE), diâmetro sistólico (DSVE), espessura diastólica do septo interventricular (EDSIV) e índice de desempenho miocárdico (Tei) nos machos. Nas investigações acerca da biogênese mitocondrial e sobrevivência celular, verificamos menor quantidade das proteínas SDHA e COXIV em machos e fêmeas expostos e aumento na concentração de CYCS em fêmeas expostas. **Conclusões:** há remodelação cardíaca concêntrica e lesão mitocondrial, diminuindo o desempenho e a produção de energia do ventrículo esquerdo de ratos machos e fêmeas da variedade UChB, sendo as fêmeas mais sensíveis. **Palavras-chave:** coração; etanol; cardiomiopatia alcoólica; eletrocardiograma; ecocardiograma; teste de esforço; mitocôndria.

Abstract

Introduction: Our research group found spaced fiber bundles, less evident cellular striations, deposition of collagen fiber bundles, and a greater presence of fibroblasts in the cardiac tissue of rats that voluntarily and chronically ingested ethanol. In addition, we observed increased proliferation and cell death of cardiomyocytes. To find out if these changes lead to decreased heart performance and cause mitochondrial damage, some clinical and molecular tests were performed. **Aim:** to investigate whether chronic ethanol intake alters the performance and energy production of the left ventricle of male and female rats of the UChB variety. **Material and methods:** ten adult male and ten adult female Wistar strain rats, named UChB (University of Chile), spontaneous high ethanol drinkers (consumption greater than 2 g ethanol / Kg body weight / day), and ten male UChB rats and ten adult female UChB rats, not exposed to ethanol, UChBC rats (controls) were used. Cardiac performance was evaluated by stress testing, electrocardiogram, and echocardiogram. Tissue replacement rate was determined using Ki 67 (mitosis) and CYCS (apoptosis). The evaluation of mitochondrial damage was performed through the quantification of COX-IV, SDH-A, and ADH. **Results:** Chronic ethanol causes lower weight gain and increased relative heart weight in exposed males and females, increased QT interval, decreased RR interval, and increased HR in exposed females. Increases in LV posterior wall diastolic thickness (PPED), interventricular septum diastolic thickness (IVSD), and LV relative thickness (LVER) were observed in exposed males. Between sexes, the exposure led to increased diastolic diameter (LVDD), systolic diameter (LVSD), diastolic interventricular septum thickness (EDSIV), and myocardial performance index (Tei) in males. In investigations about mitochondrial biogenesis and cell survival, we found a lower amount of SDHA and COXIV proteins in exposed males and females and an increase in the concentration of CYCS in exposed females. **Conclusions:** there is concentric cardiac remodeling and mitochondrial damage, decreasing the performance and energy production of the left ventricle of male and female rats of the UChB variety, with females being more sensitive.

Keywords: heart; ethanol; alcoholic cardiomyopathy; electrocardiogram; echocardiogram; stress test; mitochondria.

I Introdução

A primeira menção ao etanol como componente da dieta e de eventos comunitários data do sétimo milênio a.C. (Período Neolítico). Famosos sábios antigos, como Hipócrates, usavam etanol como solvente para extratos de ervas, anti sépticos e para combater a letargia e diarreia, enquanto nos tempos medievais o etanol era usado como anestésico, sedativo, desinfetante e diurético (KIECHL; WILLEIT, 2014). Dessa forma, o consumo de etanol era uma atividade ocasional e comunitária, associada a festivais específicos (GUMEDE, 1995; PARRY & BENNETS, 1998; ROOM et al., 2003) ou a práticas médicas e sanitárias. À medida que os destilados se tornavam disponíveis e o transporte melhorado, as bebidas alcoólicas passaram a ser mercadoria acessível em todas as estações do ano e usuais em qualquer momento da semana. Esse aumento da oferta e disponibilidade provou ser prejudicial (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014).

Ao longo dos séculos, o etanol tornou-se a droga viciante mais socialmente aceita em todo o mundo (CARNEVALE; NOCELLA, 2012), sendo que no século XIX, os líderes da indústria passaram a associar o etanol como grande inimigo da produtividade industrial, uma vez que o consumo alcoólico interferia na atenção dos trabalhadores. As sociedades industrializadas na Europa e outros lugares caracterizam o uso do etanol como problema social e de saúde (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014). O uso nocivo de etanol é o principal fator de risco para morte de homens entre 15 e 59 anos, com evidências de que as mulheres podem ser mais vulneráveis (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014). Essa vulnerabilidade feminina associa-se ao desenvolvimento de concentrações mais altas e prolongadas de etanol no sangue. Isso reflete na interação das diferenças sexuais em vários aspectos do metabolismo do etanol (BARAONA et al., 2001).

A quantidade média de etanol puro anual consumida pela população brasileira maior de 15 anos foi de 2,5 à 4,9 l em 2010, aumentando de 7,5 à 9,9 l em 2018 (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014; 2018). Esse crescimento expressivo é preocupante, pois o uso excessivo tem consequências socioeconômicas e na saúde do consumidor (LANNG et al., 2020). O etanol é uma molécula biologicamente pequena, altamente reativa, se difundindo pelas membranas biológicas e nos compartimentos intracelulares, e capaz de atingir todas as organelas da célula (FERNÁNDEZ-SOLÀ; PLANAVILA PORTA, 2016).

Investigações das vias de ação do etanol são necessárias frente aos impactos ocasionados pelo consumo alcoólico em diferentes órgãos e sistemas. Como estudos em humanos são limitados devido às questões éticas, a solução parcial encontra-se na utilização de modelos experimentais como ratos, camundongos, primatas não humanos, entre outros, que permitam a inferência e a extrapolação dos resultados às condições da sociedade humana.

O modelo experimental de ratos Wistar, da variedade UCh (*Universidad de Chile*), é reproduzido no Chile desde a década de 40. Esses animais são bebedores voluntários de etanol e expõem o conceito da herdabilidade e da predisposição genética ao consumo alcoólico (MARDONES, SEQUOIA-RIQUELME, 1953). Os ratos UChB são bebedores de alta quantidade de etanol (MARDONES, SEQUOIA-RIQUELME, 1983), sendo considerados modelo experimental adequado em estudos que buscam avaliar os efeitos do consumo alcoólico voluntário, pois apresentam perfil semelhante ao do homem na sociedade e não enfrentam o estresse da alimentação forçada (GAPP et al., 2014).

O coração é um dos principais órgãos do corpo humano, constituído de cardiomiócitos (30%), fibroblastos e fibrócitos (64%) (BANERJEE et al., 2007; VLIEGEN et al., 1991), cuja finalidade é bombear sangue para todo o corpo, garantindo a oxigenação e nutrição dos tecidos. Impactos diretos e indiretos no sistema cardiovascular podem ser fatais à saúde. O etanol é considerado uma cardiotoxina há mais de um século (LAONIGRO et al., 2009) e o alto consumo está associado com alterações metabólicas do cardiomiócito, como diminuição da atividade da enzima lactato desidrogenase, diminuição da beta oxidação de ácidos graxos, aumento da atividade da enzima etanol desidrogenase que pode levar ao acúmulo de acetaldeído e síntese proteica prejudicada, eventualmente, levando a lesão (OBAD et al., 2018). Essas lesões estão associadas a um tipo de cardiomiopatia dilatada, não isquêmica, denominada cardiomiopatia alcoólica (CMA) (LAONIGRO et al., 2009).

Doses moderadas, consumidas regularmente, são suficientes para induzir mudanças metabólicas e fisiológicas em todo corpo, incluindo alterações estruturais e funcionais no miocárdio (BRANDT; WENZEL, 2018). A CMA possui uma fase assintomática, que se expressa clinicamente como um comprometimento da função

64 ventricular esquerda e um estágio sintomático, naqueles que continuam a beber e
65 desenvolvem sinais e sintomas de insuficiência cardíaca (URBANO-MÁRQUEZ, 1998).

66 CMA é uma cardiomiopatia secundária, ou seja, que mostra envolvimento
67 miocárdico patológico como parte de um grande número e variedade de distúrbios
68 sistêmicos generalizados (multiorgânicos). No entanto, não há critérios
69 imunohistoquímicos, imunológicos ou de outra natureza para o diagnóstico. Achados
70 macroscópicos e histológicos da CMA são indistinguíveis dos encontrados na
71 cardiomiopatia dilatada (LAONIGRO et al., 2009), sendo a principal distinção entre as
72 patologias o histórico do paciente que ingere etanol.

73 Modelos animais demonstraram que o consumo prolongado de etanol produz
74 alterações histológicas e celulares como perda de miócitos e disfunção intracelular, das
75 proteínas contráteis e da homeostase do cálcio (LAONIGRO et al., 2009). Martinez et al.
76 (2020) verificaram a presença de espaçamentos entre os cardiomiócitos, estriações
77 celulares menos evidentes, deposição de feixes de fibras colágenas e maior presença de
78 fibroblastos no tecido cardíaco de ratos bebedores voluntários de etanol. Além disso,
79 aumento na divisão e morte celular de cardiomiócitos também foi relatado.

80 Manifestações clínicas são o resultado de mudanças em componentes celulares e
81 moleculares do coração, assim como em mediadores que conduzem o controle
82 homeostático (COHN; FERRARI; SHARPE, 2000). Para investigar a integridade
83 fisiológica e funcionalidade do coração, exames clínicos como eletrocardiograma,
84 ecocardiograma e testes de esforço são utilizados.

85 O eletrocardiograma (ECG) é a ferramenta de diagnóstico mais amplamente
86 utilizada, sendo de extrema importância na avaliação inicial do paciente com suspeita de
87 patologia cardiovascular (ANGELAKI et al., 2021). É indispensável para o diagnóstico e
88 início da terapia em pacientes com síndromes coronarianas agudas, além de ser o meio
89 mais preciso na identificação de distúrbios da condução intraventricular e arritmias. Sua
90 interpretação pode levar ao reconhecimento de anormalidades nos eletrólitos,
91 particularmente de potássio e cálcio séricos, e permitir a detecção de algumas formas de
92 anormalidades cardíacas elétricas ou estruturais (KLIGFIELD et al., 2007).

93 Durante o batimento cardíaco, uma pequena fração da atividade elétrica gerada
94 pelo coração se propaga até a superfície do corpo e o ECG capta essa corrente elétrica e
95 determina o ritmo cardíaco. Essa determinação é feita através da interpretação das ondas

de despolarização e repolarização das câmaras cardíacas, sendo conceituado como intervalo a mensuração de tempo de uma onda até a outra. O intervalo QT abrange desde o início do complexo QRS (despolarização ventricular) até o fim da onda T (repolarização ventricular). Dessa forma, mensura a atividade elétrica ventricular e sua alteração indica patologias ventriculares. Já o intervalo RR representa o tempo de uma onda R até a outra, sendo utilizado na mensuração dos batimentos cardíacos e cálculo da frequência cardíaca (GUYTON & HALL, 2011).

A ecocardiografia é sensível para a detecção de alterações morfológicas cardíacas, evidenciando o risco de doenças cardiovasculares (ANGELAKI et al., 2021). Os métodos tradicionais de avaliação do sistema cardiovascular são, na maioria das vezes, invasivos e não conseguem descrever de forma completa o curso do processo patológico. O uso da ecocardiografia em pequenos animais de laboratório é uma abordagem promissora, sendo ferramenta utilizada no diagnóstico de lesões do miocárdio causadas pelo etanol (KRYZHANOVSKII et al., 2016).

Dados da aptidão cardiorrespiratória e da resposta cardiovascular, coletados como parte de protocolo de teste de exercício graduado máximo, têm consistentemente mostrado ser preditores de doenças cardiovasculares não fatais e fatais (PETTEE GABRIEL et al., 2018). O padrão-ouro para avaliação da capacidade funcional cardiovascular ou aptidão cardiorrespiratória, em humanos, é a medição do consumo de oxigênio (VO_2) durante o teste de esforço máximo (PIEPOLI; SPOLETINI; ROSANO, 2019). No entanto, em modelos experimentais animais, o estresse gerado por essa técnica pode interferir nos resultados obtidos, sendo assim, protocolos menos desgastantes são preferenciais. Dessa forma, através da adaptação do protocolo de SOUZA et al., (2021), criamos o teste de esforço máximo pontual para avaliação da aptidão cardiorrespiratória dos animais.

Os cardiomiócitos são altamente sensíveis aos efeitos tóxicos do etanol com baixa taxa de regeneração após a morte celular (KRENZ; KORTHUIS, 2012). No entanto, mecanismos de reparo envolvendo hipertrofia e baixa regeneração podem, até certo ponto, neutralizar a geração de lesões (VAIDEESWAR et al., 2014). Eventualmente, ocorre dano estrutural irreversível (URBANO-MÁRQUEZ, 1998; VAIDEESWAR, 2014) por apoptose (FERNANDEZSOLA et al., 2006). O equilíbrio entre os mecanismos que geram ou reparam lesões define o grau e reversibilidade do dano cardíaco causado (FERNÁNDEZ-SOLÀ, 2015). Após estimulação apoptótica o citocromo C, proteína transportadora de elétrons localizada na membrana mitocondrial interna, é liberado da

mitocôndria para o citoplasma devido a perda total do potencial da membrana mitocondrial, resultando na ativação da caspase-3 e apoptose (OJO; EMOGHWA, 2020).

As mitocôndrias geram a maior parte da energia nas células animais através da fosforilação oxidativa. Os elétrons são passados ao longo da cadeia transportadora, composta de quatro complexos polipeptídicos. Esses elétrons são gerados a partir da nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida (NADH), produzida pela oxidação de nutrientes, como a glicose, e transferidos para o oxigênio molecular. A cadeia transportadora de elétrons tem orientação específica na membrana mitocondrial interna. A passagem de elétrons entre esses complexos libera energia que é armazenada na forma de um gradiente de prótons através da membrana e é então usado pela ATP sintase para gerar adenosina trifosfato (ATP) a partir da fosforilação de adenosina 5'- difosfato (ADP) (SARASTE, 1999).

O complexo II da cadeia respiratória é composto por quatro proteínas codificadas pelo DNA nuclear (BOURGERON et al., 1995). O núcleo catalítico é formado pela grande flavoproteína SDHA e pelo aglomerado de enxofre e ferro contendo SDHB, enquanto as subunidades hidrofóbicas SDHC e SDHD contêm um único grupo heme, sítios de ligação de ubiquinona e ancoram o complexo dentro da membrana mitocondrial interna. O complexo II acopla a oxidação do succinato a fumarato com a redução do transportador de elétrons ubiquinona a ubiquinol, conectando diretamente o sistema de transferência de elétrons mitocondrial com o ciclo de Krebs (SARASTE, 1999).

O dano da estrutura e função mitocondrial é importante contribuinte para a patogênese cardíaca (WANG et al., 2010). Dessa forma, para avaliar se as mitocôndrias cardíacas expostas ao etanol sofrem danos, é necessário quantificar as proteínas que constituem a cadeia transportadora de elétrons (subunidades COX-IV do Complexo IV e SDH-A do Complexo II). O etanol é degradado pela álcool desidrogenase (ADH), produzindo acetaldeído, altamente reativo e tóxico, no miocárdio. O acetaldeído é degradado em acetato pela aldeído desidrogenase mitocondrial (ALDH-2) (BRANDT; WENZEL, 2018).

As investigações da ação do etanol no cardiomiócito do ventrículo esquerdo, motor do sistema circulatório sistêmico, contribuem na elucidação dos mecanismos envolvidos na integralidade, fisiologia, diagnóstico de patologias e terapias do coração.

Além disso, destacam-se as alterações entre os sexos, já que a exposição e o metabolismo do etanol são distintos, com consequências irreversíveis à saúde e à sociedade.

Nosso objetivo foi investigar se a ingestão crônica de etanol altera o desempenho e a produção de energia do ventrículo esquerdo de ratos machos e fêmeas da variedade UChB.

II Material e métodos

2.1 Animais

Dez machos e dez fêmeas com 250 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 e dez ratas UChB fêmeas adultas com 180 dias de idade, pesando entre 300 - 400 g, não expostos ao etanol, ratos UChBC (controles) obtidos do Departamento de Biologia Estrutural e Funcional, Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP - Univ Estadual Paulista.

Os ratos foram alojados individualmente em gaiolas de polipropileno (43X30X15 cm) com maravalha para mensuração da ingestão de água, etanol e ração. Mantidos em temperatura ambiente constante (23 ± 1 °C) e iluminação (ciclo claro / escuro de 12 h, com as luzes acesas 6 h). Sendo tratados com uma dieta sólida constituída por ração padrão para roedores e água filtrada à vontade. Todos os experimentos realizados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA Nº 6199280820).

2.2 Delineamento experimental

Ratos UChB passaram por período de seleção, no qual aos 65 dias de idade, foram dadas duas garrafas, uma contendo solução de etanol a 10 % e outra água, para livre escolha, durante 15 dias. Os ratos de consumo > 2 g de etanol / kg de peso corpóreo / dia foram considerados aptos para integrarem o grupo exposto ao etanol (UChB). Esse grupo totalizou 20 ratos, sendo 10 machos (Me) e 10 fêmeas (Fe) com livre acesso a solução de etanol a 10% (v / v) e água à vontade até a coleta. O grupo controle (UChBC), também com 20 ratos, sendo 10 machos (Mc) e 10 fêmeas (Fc) teve acesso somente à água, desde seu desmame até a coleta.

2.3 Eletrocardiograma

Para a obtenção de registro de eletrocardiograma (ECG), os animais, após exposição crônica (mínimo 100 dias) ao etanol, foram anestesiados com Isoforine® (isoflurano) (4,0 % de indução e 1,5 % de manutenção) e mantidos em decúbito dorsal. Os eletrodos foram colocados em posição de derivação D2 (eletrodo positivo no membro inferior esquerdo, eletrodo negativo no membro superior direito e eletrodo de referência no membro inferior direito). O sinal foi registrado por quinze minutos, adquirido pelo sistema Biopac A / D (MP100 System; BIOPAC, CA, EUA) e conectado ao programa Aklology. Os dados foram analisados e processados, utilizando o programa MatLab (Mathworks, Natick, MA, EUA). A figura 1 representa o procedimento da medida realizada (adaptada de PRÓSPERO et al., 2017).

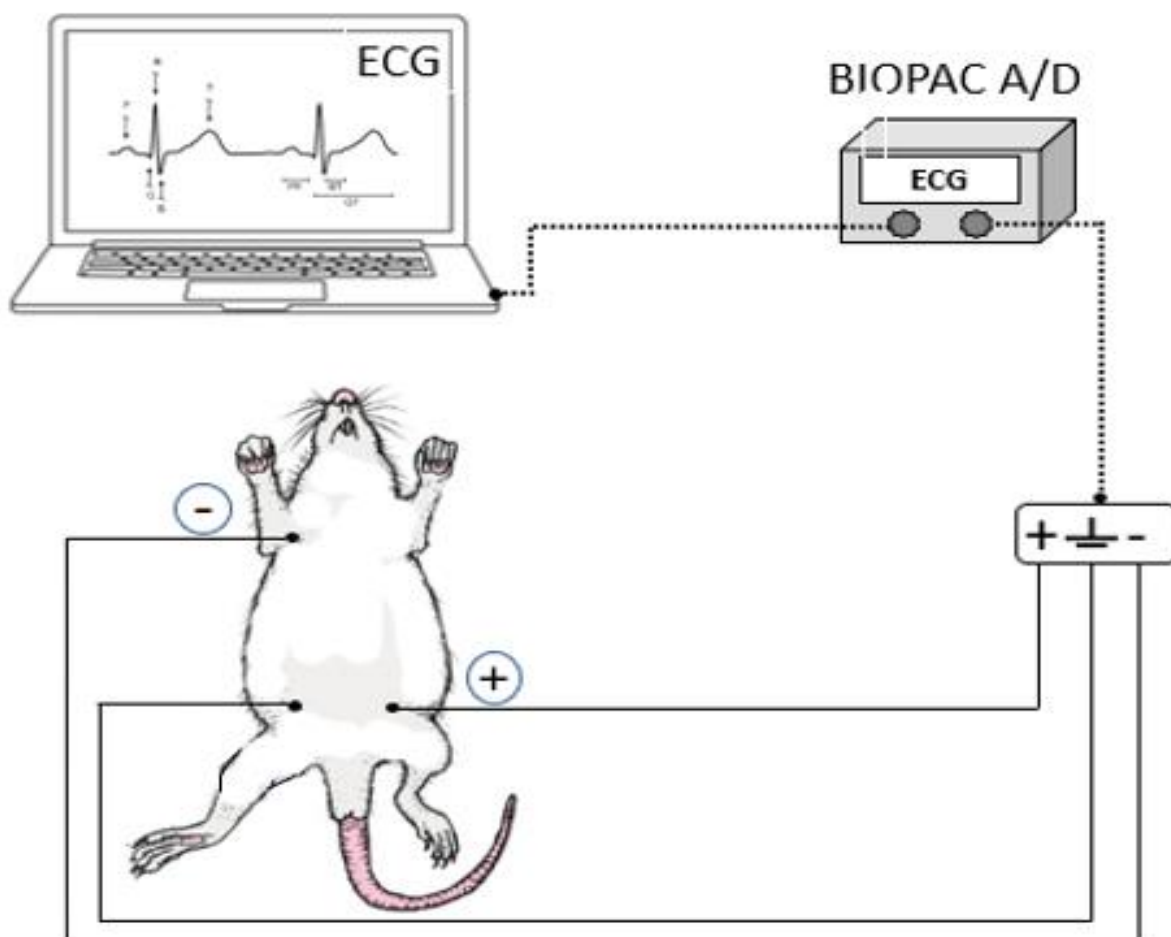


Fig. 1. Representação esquemática da obtenção do registro de eletrocardiograma (ECG).

Após o processamento do sinal adquirido, foi analisado o intervalo RR, que determina a regularidade de repetições de ondas R do ECG, assim como o intervalo QT, relacionado com a atividade ventricular e frequência cardíaca em batimentos por minuto

(BPM), evidenciando a presença de arritmias. A figura 2 ilustra o ECG (derivação D2) e a análise do intervalo RR para a identificação de arritmias.

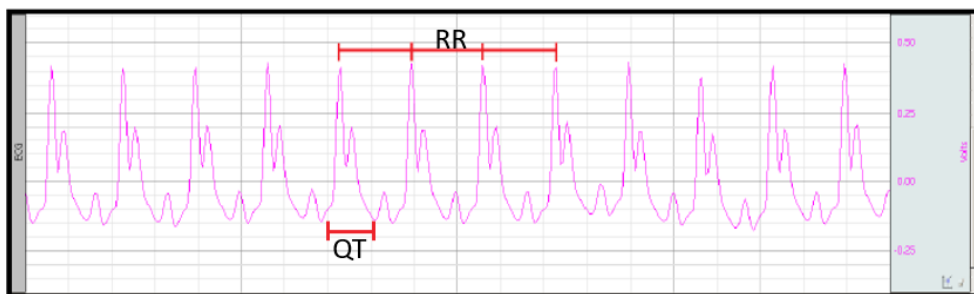


Fig. 2. ECG obtido na derivação D2 para quantificação de arritmias. Intervalo RR e QT marcados em vermelho (fonte: PRÓSPERO, 2015)

2.4 Ecocardiograma

A estrutura e a função cardíaca foram avaliadas por ecocardiograma transtorácico, utilizando equipamento da marca *General Electric Medical Systems*, modelo Vivid S6 (Tirat Carmel, Israel), dotado de transdutor multifrequencial de 5 a 11,5 MHz. Os ratos, após exposição crônica (mínimo 100 dias) ao etanol, foram sedados com cloridrato de cetamina (50 mg / kg, i.p.) e cloridrato de xilazina (1 mg / kg, i.p.). Após a tricotomia da região anterior do tórax, os animais foram posicionados em decúbito lateral esquerdo.

Imagens foram obtidas em modo monodimensional (modo-M) orientado pelas imagens em modo bidimensional, com o transdutor em posição paraesternal, eixo menor. Para avaliação do ventrículo esquerdo (VE), o cursor do modo-M foi posicionado inferiormente ao plano da valva atrioventricular esquerda junto aos músculos papilares. As imagens obtidas foram registradas em impressora, modelo UP-895 (Sony, Japão), e as estruturas cardíacas medidas, manualmente, com paquímetro (Mitutoyo, Japão). Essas medidas foram: diâmetros diastólico (DDVE) e sistólico (DSVE) do VE, espessura diastólica da parede posterior do VE (EDPP) e do septo interventricular (EDSIV). A partir dessas medidas, outros parâmetros foram calculados:

$$\text{- Espessura relativa do VE (ERVE)} = \frac{2 \times \text{EDPP}}{\text{DDVE}}$$

$$\text{- Massa do VE (MVE)} = [(\text{DDVE} + \text{EDPP} + \text{EDSIV})^3 - (\text{DDVE})^3] \times 1,04$$

onde 1,04 representa a densidade específica do miocárdio

$$\text{- Índice de massa do VE (IMVE)} = \frac{\text{MVE}}{\text{Peso corpóreo}}$$

Para avaliação da função sistólica do VE foram utilizados os índices:

234 - Fração de ejeção (FRE) =
$$\frac{(DDVE)^3 - (DDSVE)^3}{(DDVE)^3}$$

235 - Velocidade de encurtamento da parede posterior (VEPP) = tangente máxima do
236 movimento sistólico da parede posterior

237 Já a função diastólica foi avaliada através dos índices:

238 - Onda E = pico de velocidade do enchimento diastólico inicial

239 - Onda A = velocidade do enchimento diastólico tardio

240 - Razão entre ondas E e A =
$$\frac{E}{A}$$

241 - Tempo de desaceleração da onda E (TDE)

242 Para a análise conjunta da função diastólica e sistólica do VE utilizou-se o índice
243 de desempenho miocárdico (índice de Tei)

244 - Índice de performance miocárdica (Tei)

245 =
$$\frac{\text{Tempo de contração isovolumétrica (tciv)} + \text{tempo de relaxamento isovolumétrico (triv)}}{\text{Tempo de ejeção}}$$

246

247 2.5 Teste de esforço

248 Para avaliação da capacidade funcional os ratos, após exposição crônica (mínimo
249 100 dias) ao etanol, passaram por um período de adaptação ao ambiente de teste no qual
250 foram submetidos a 10 minutos / dia de exercícios, com velocidade de 5m / min, em dias
251 alternados, por 1 semana. No dia das avaliações, o teste consistiu em aquecimento inicial
252 de 5 min em esteira com velocidade de 5m / min. Após o aquecimento, os animais foram
253 submetidos ao exercício com velocidade de 8 m / min, seguido de incrementos de 3 m /
254 min a cada 3 min até a exaustão, determinada quando o animal se recusar a correr mesmo
255 após estimulação elétrica ou for incapaz de coordenar as etapas. A velocidade máxima e
256 o tempo de operação foram registrados e a distância total calculada (SOUZA et al., 2021).
257 Cada animal foi testado e adaptado individualmente.

258

259 2.6 Coleta

260 Para o procedimento de eutanásia, primeiramente os animais foram colocados em
261 câmaras de saturação de gás carbônico para serem anestesiados. Posteriormente, os ratos
262 foram decapitados para coleta do sangue e foi realizada a abertura da cavidade torácica
263 para coleta do coração. O coração de 5 animais de cada grupo foi seccionado no plano
264 sagital mediano com o auxílio de lâmina de aço inoxidável (marca *Feather*) e fixado em
265 paraformaldeído a 4 % durante 24 h. Posteriormente, lavado em água corrente por 72 h e

armazenado em etanol 70 %. Já o coração dos outros 5 animais de cada grupo foi congelado em nitrogênio líquido e armazenado em biofreezer.

2.7 Análise histológica

A avaliação da integridade estrutural do tecido cardíaco foi realizada com o material 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 4 µm de espessura e corados com HE e TM. Os cortes foram examinados em microscópio de luz.

2.8 Avaliação do dano mitocondrial

Para avaliar a regulação da biogênese mitocondrial e o estresse celular, em resposta a estímulos ambientais, foi feita a análise e quantificação por *Western Blot* das proteínas COX-4I1 e SDH-A. Uma porção do ventrículo esquerdo foi macerados com a utilização do tampão de lise RIPA contendo inibidores de protease (Sigma CO, Saint Louis, MO, USA). Os tubos foram mantidos em gelo para coleta individual do sobrenadante e uma alíquota retirada para quantificação proteica total pelo método de Bradford.

Amostras com 50 µg de proteína foram solubilizados e aplicados em gel de poliacrilamida 4-20 % (SDS-PAGE). Após a realização da eletroforese, as proteínas foram eletrotransferidas (300 mA) para membrana de nitrocelulose (*BioRad, Califórnia, USA*). Em seguida, a membrana foi bloqueada com BSA 3 % (m/v) ou leite mólico® 3 % (m/v) e incubada com os anticorpos primários monoclonais: anti-SDHA (1:1000), anti-COX4I1 (1:1000) (Elabscience® E-AB-40089 e E-AB-70109), diluídos em leite 3 % durante a noite. A membrana foi lavada 3X em solução basal (TBS - *Tween* 1 % v/v) e incubada com anticorpo secundário anti-*Rabbit* em BSA 1 % (m/v), conjugado à peroxidase - HRP (Sigma, St. Louis, MO, USA) durante 1:30 h. Após a lavagem com solução basal 3X, a reação foi revelada pelo sistema de detecção *ECL®Selected Western Blot Detection Reagent* (GE Healthcare, Uppsala, Suécia). Após a captura da imagem em transiluminador G-Box foi feita a quantificação densitométrica das bandas utilizando o software *Image J*. A intensidade da banda foi quantificada através do índice de

densitometria óptica (IOD) relativo à intensidade de GAPDH (marcador celular endógeno).

Para a determinação da atividade da enzima aldeído desidrogenase mitocondrial (Aldh2) foi realizada a quantificação no tecido pelo método de ELISA (Kit ER065 *Fine Test*) de acordo com as instruções do fabricante.

2.9 Avaliação da taxa de reposição tecidual

Utilizamos o anticorpo CYCS (E-AB-70033) para detectar a translocação do citocromo c para o citosol durante a apoptose. A translocação foi determinada pelo método de *Western Blot*, seguindo as recomendações do fabricante. Também foram realizados ensaios relacionados à mitose (Ki67). Os cortes do coração de cada grupo foram corados com anticorpos contra Ki-67 (Millipore, Merck KGaA, Burlington, MA, 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-Rabbit* - DAKO & CYT) por 1 h. Em seguida, as lâminas foram coradas com diaminobenzidina (DAB, Sigma, St. Louis, MO, EUA) e contrastadas com Hematoxilina.

2.10 Análise estatística

Os dados tiveram sua normalidade (curva de Gauss) analisada pelo teste Shapiro-Wilk. O teste t não pareado foi usado para dados normais (paramétricos) e para dados não normais (não paramétricos) o teste de Mann-Whitney foi aplicado. O valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo, utilizando-se o *GraphPad Prism 8.0* (GraphPad Software, La Jolla, CA, Estados Unidos).

III Resultados

3.1 Consumo alimentar

A avaliação da ingestão de água não apresentou diferença entre os grupos na maioria das semanas, no entanto, em algumas semanas pontuais, por conta das variações climáticas, houve picos de consumo (Fig. 3). Quanto ao consumo de ração, houve maior diferença entre machos e fêmeas nos grupos expostos (Fig. 3D) do que nos controles (Fig. 3C).

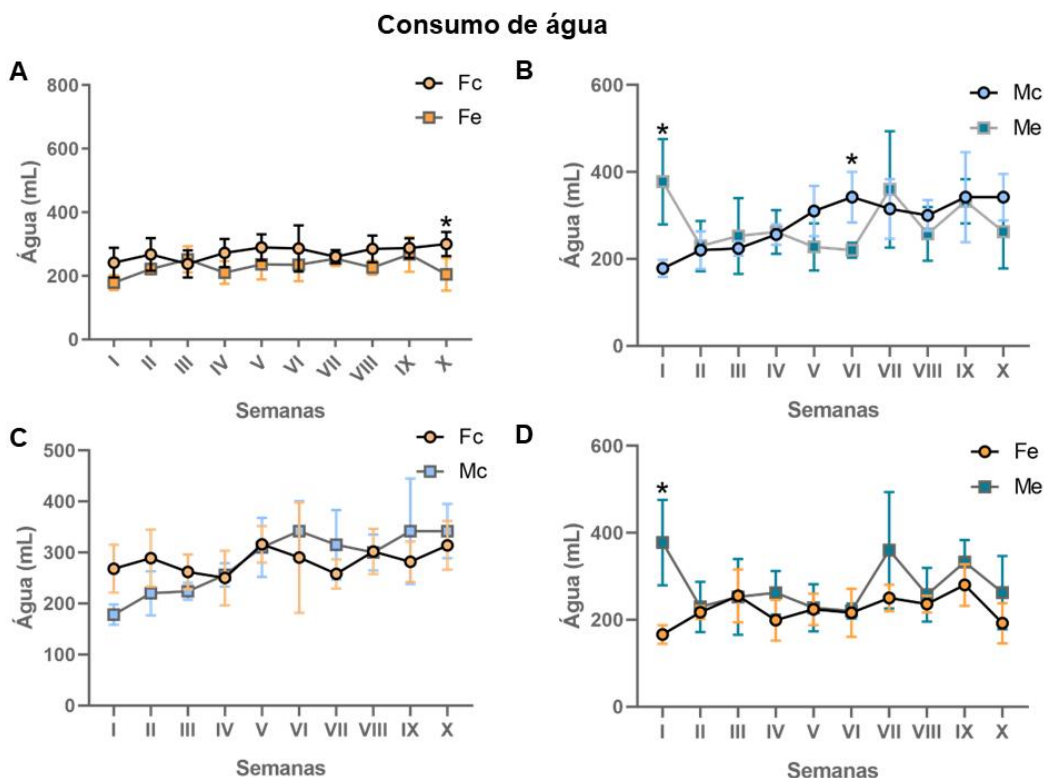


Fig. 3. Consumo de água. A: comparação entre fêmeas; B: comparação entre machos; C: comparação entre controles; D: comparação entre expostos (* $p < 0,05$).

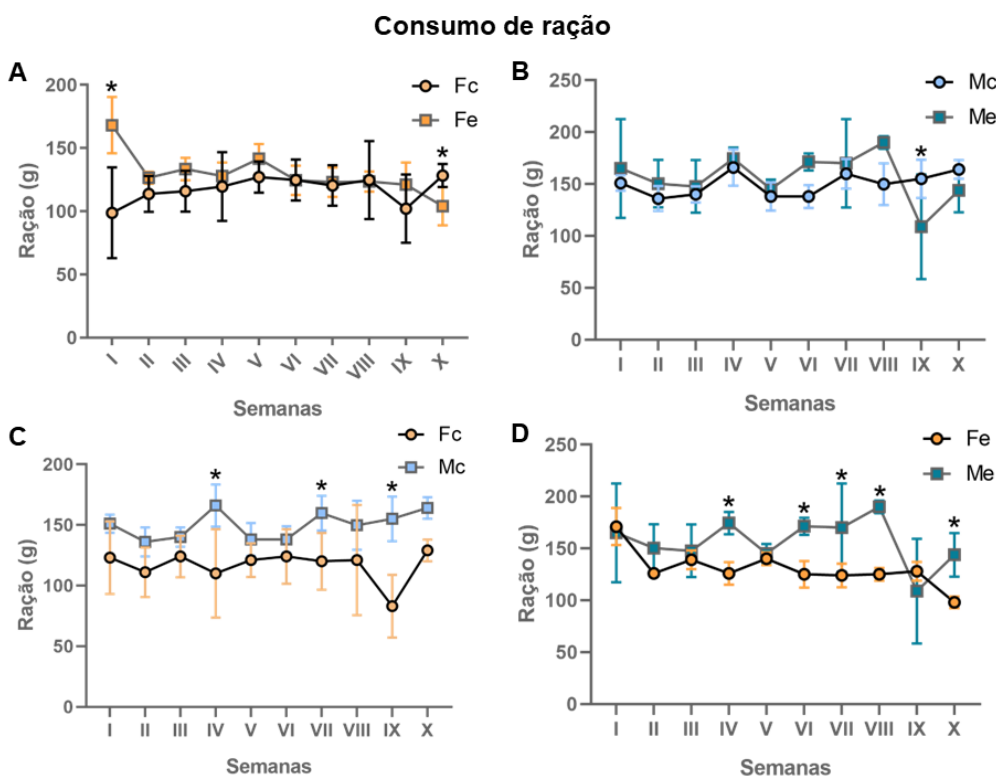


Fig. 4. Consumo de ração. A: comparação entre fêmeas; B: comparação entre machos; C: comparação entre controles; D: comparação entre expostos (* $p < 0,05$).

3.2 Ganho de peso

Houve diferenças no ganho de peso em todas as comparações (Fig. 5).

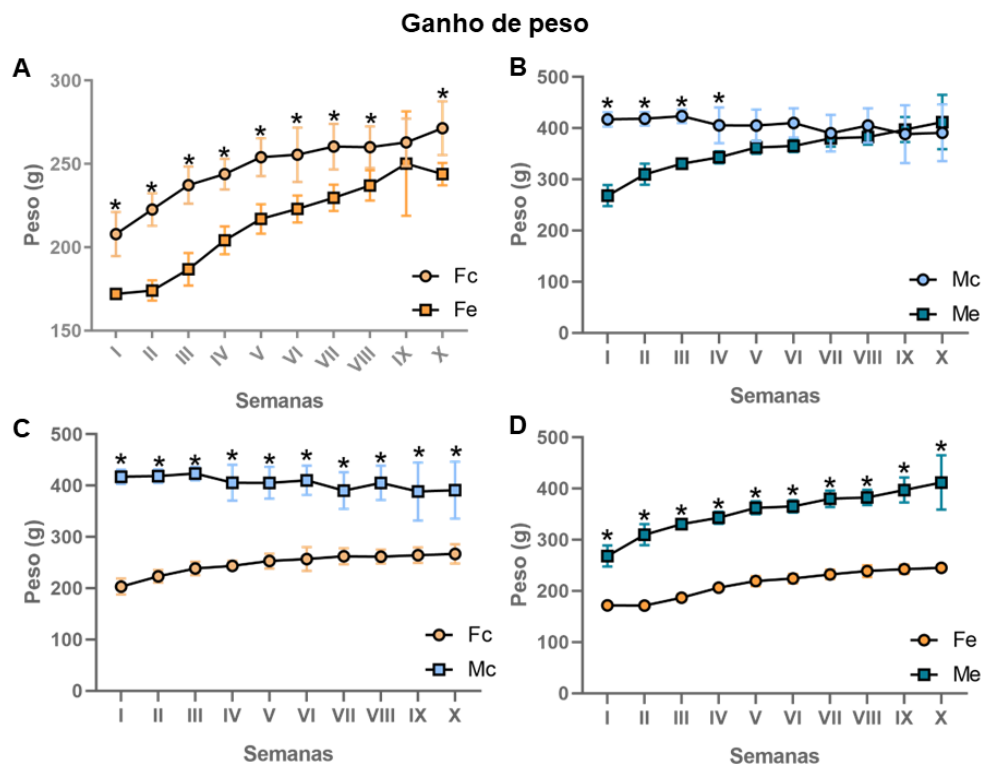


Fig. 5. Ganho de peso. A: comparação entre fêmeas; B: comparação entre machos; C: comparação entre controles; D: comparação entre expostos (*p < 0,05).

3.3 Peso relativo do coração

O peso relativo do coração (índice cardíaco), divisão do peso do coração (mg) pelo peso corpóreo (mg) (Fig.7), mostra diferença entre fêmeas (Fig. 6A), machos (Fig. 6B) e expostos (Fig. 6D).

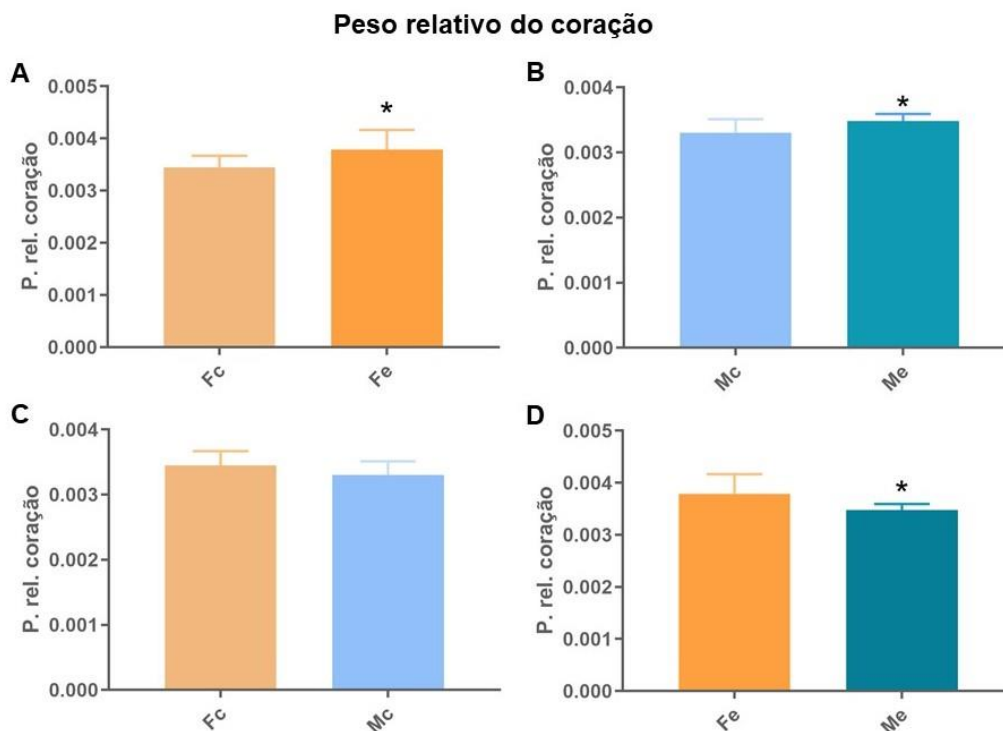


Fig. 6. Peso relativo do coração. A: comparação entre fêmeas; B: comparação entre machos; C: comparação entre controles; D: comparação entre expostos (* $p < 0,05$).

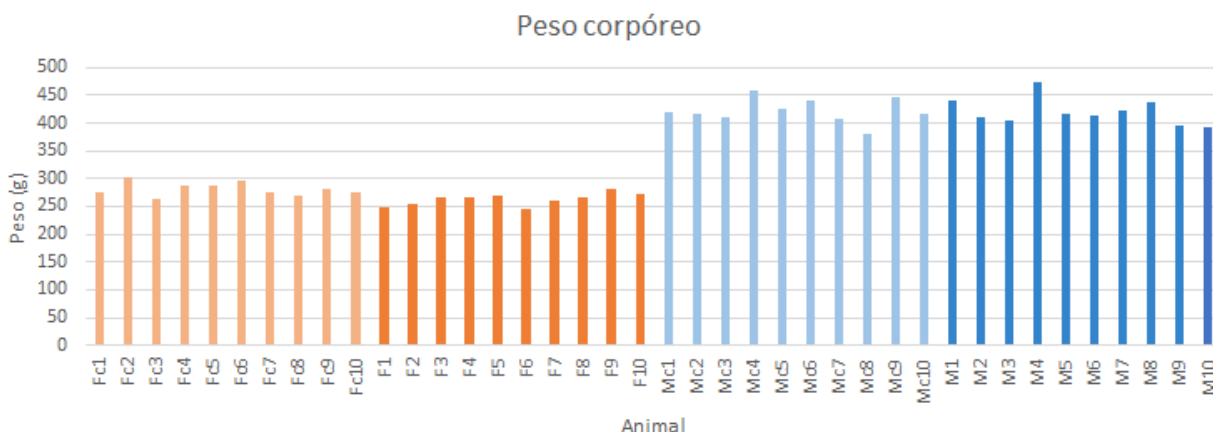


Fig. 7. Peso corpóreo dos animais no momento da coleta.

3.4 Eletrocardiograma

Verificamos diferença entre os grupos Fc e Fe em todas as análises (Fig. 8A, 9A e 10A). Também identificamos diferenças no intervalo QT entre os grupos controles (Fig. 8C). Não houve diferença nas comparações restantes.

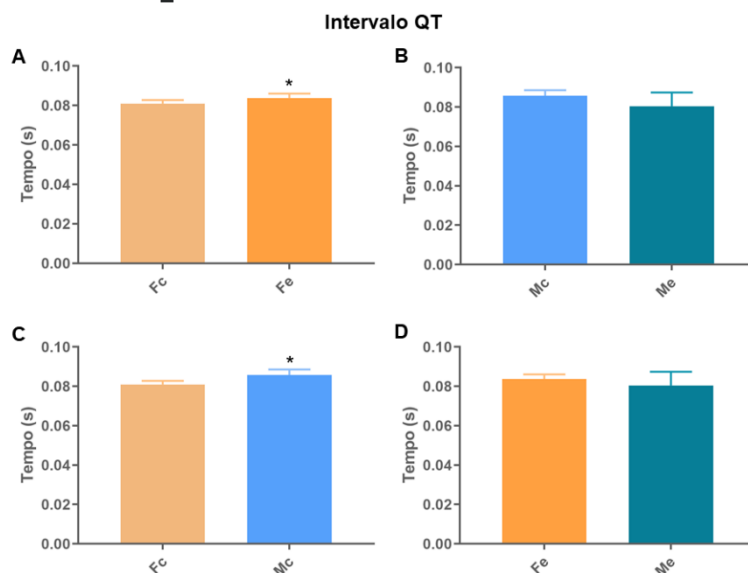


Fig. 8. Intervalo QT. A: comparação entre fêmeas; B: comparação entre machos; C: comparação entre controles; D: comparação entre expostos (* $p < 0,05$).

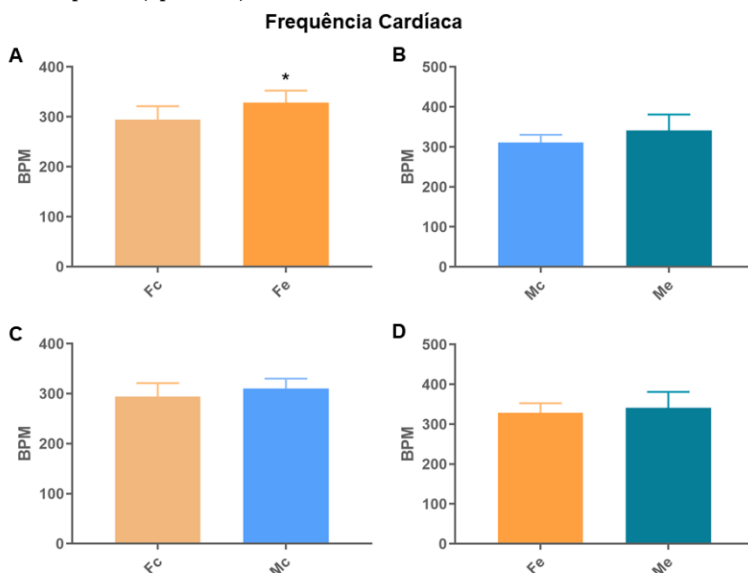


Fig. 9. Frequência cardíaca. A: comparação entre fêmeas; B: comparação entre machos; C: comparação entre controles; D: comparação entre expostos (* $p < 0,05$).

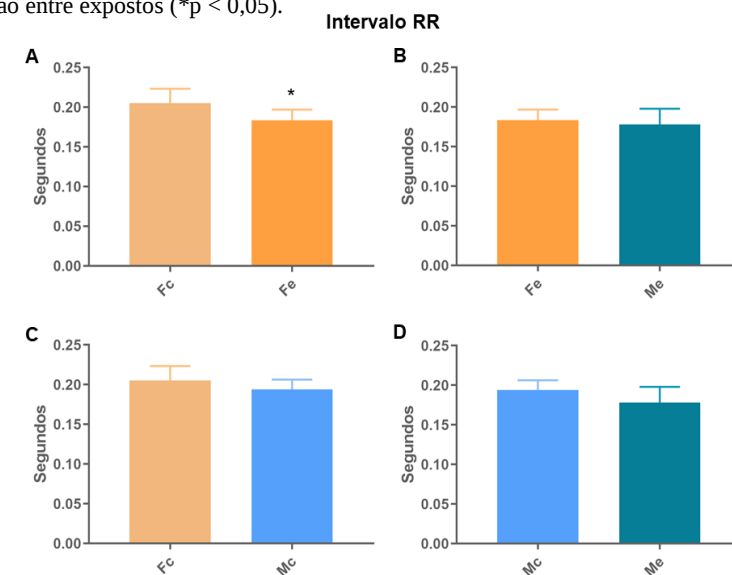


Fig. 10. Intervalo RR. A: comparação entre fêmeas; B: comparação entre machos; C: comparação entre controles; D: comparação entre expostos (* $p < 0,05$).

3.5 Ecocardiograma

Os ecocardiogramas das fêmeas não apresentaram diferença em nenhum dos parâmetros analisados. Já os dos machos apresentaram diferenças no EDPP, EDSIV e ERVE (Figura 11). Os ecocardiogramas dos controles apresentaram diferenças no DDEVE, DSVE, EDPP, EDSIV e VEPP (Figura 12). Os ecocardiogramas dos expostos apresentaram diferenças no DDVE, DSVE, EDPP, EDSIV, IMVE e Tei (Figura 13).

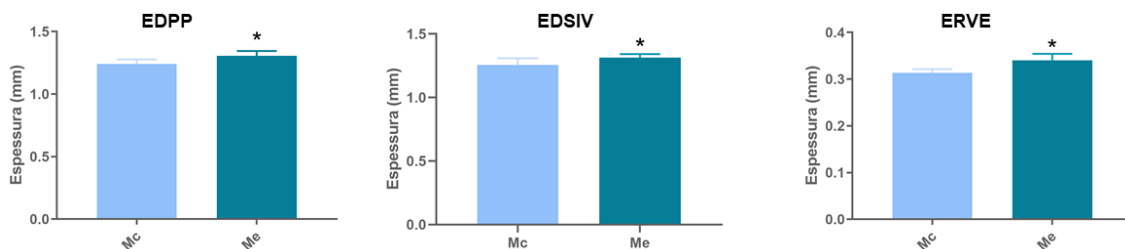


Fig. 11. Ecocardiograma machos. EDPP: espessura diastólica da parede posterior do VE. EDSIV: espessura diastólica do septo interventricular. ERVE: espessura relativa do VE (*p < 0,05).

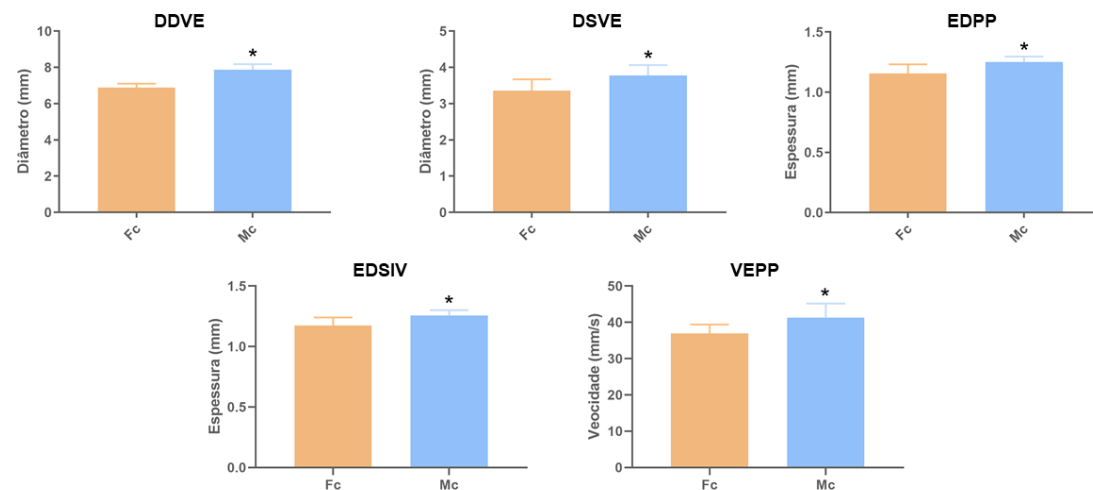


Fig. 12. Ecocardiograma controles. DDVE: diâmetro diastólico. DSVE: diâmetro sistólico do VE. EDP: espessura diastólica da parede posterior do VE. EDSIV: espessura diastólica do septo interventricular. VEPP: velocidade de encurtamento da parede posterior (*p < 0,05).

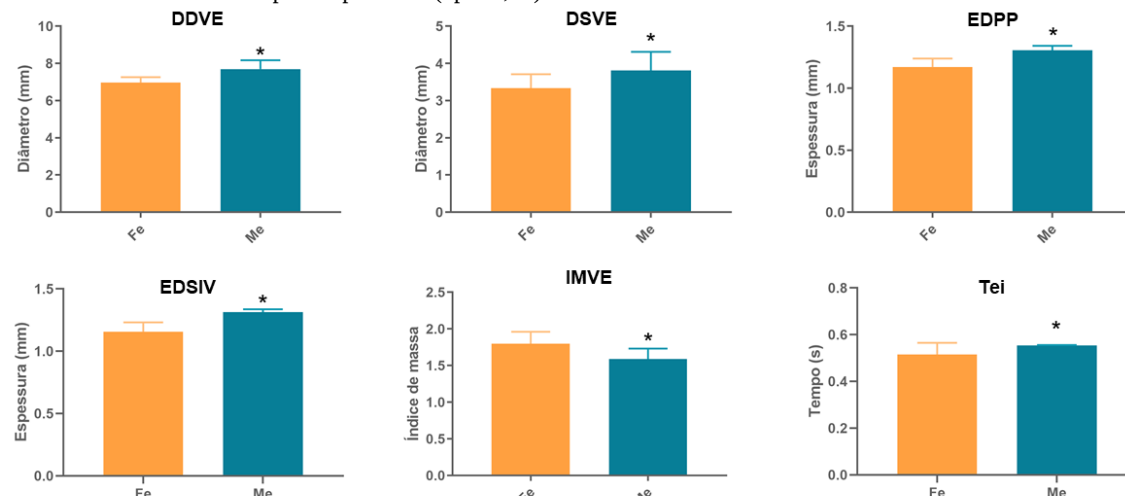


Fig. 13. Ecocardiograma expostos. DDVE: diâmetro diastólico. DSVE: diâmetro sistólico do VE. EDP: espessura diastólica da parede posterior do VE. EDSIV: espessura diastólica do septo interventricular. IMVE: índice de massa do VE. Tei: índice de desempenho miocárdico (*p < 0,05).

3.6 Teste de esforço

Os testes de esforço não apresentaram diferença nas distâncias totais percorridas (Figura 14), nem nos tempos de operação (Figura 15).

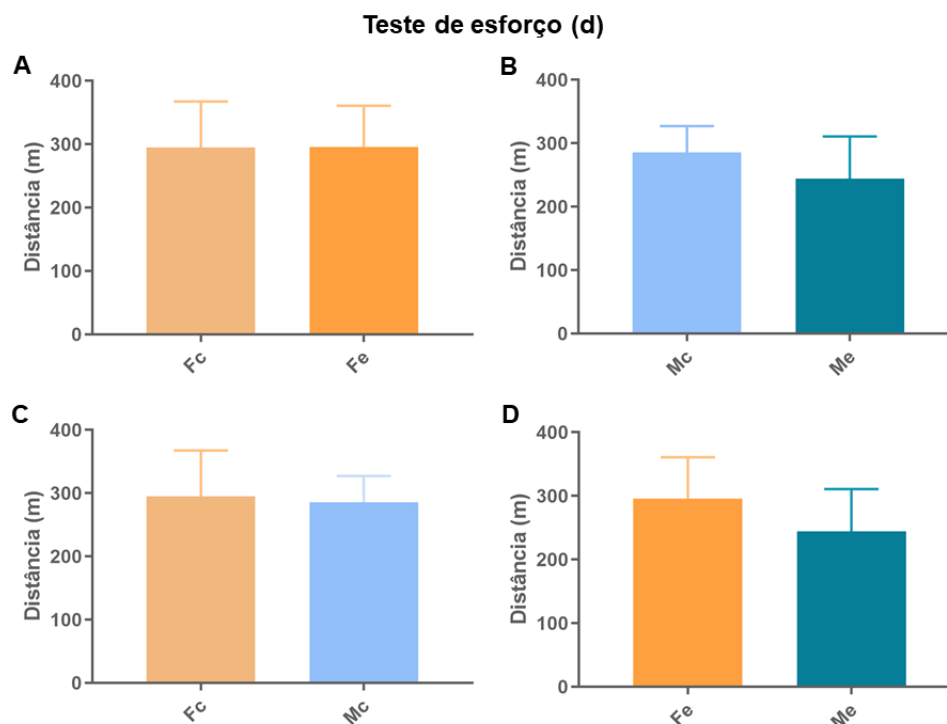


Fig. 14. Distância total percorrida durante o teste de esforço em esteira. A: comparação entre fêmeas; B: comparação entre machos; C: comparação entre controles; D: comparação entre expostos (* $p < 0,05$).

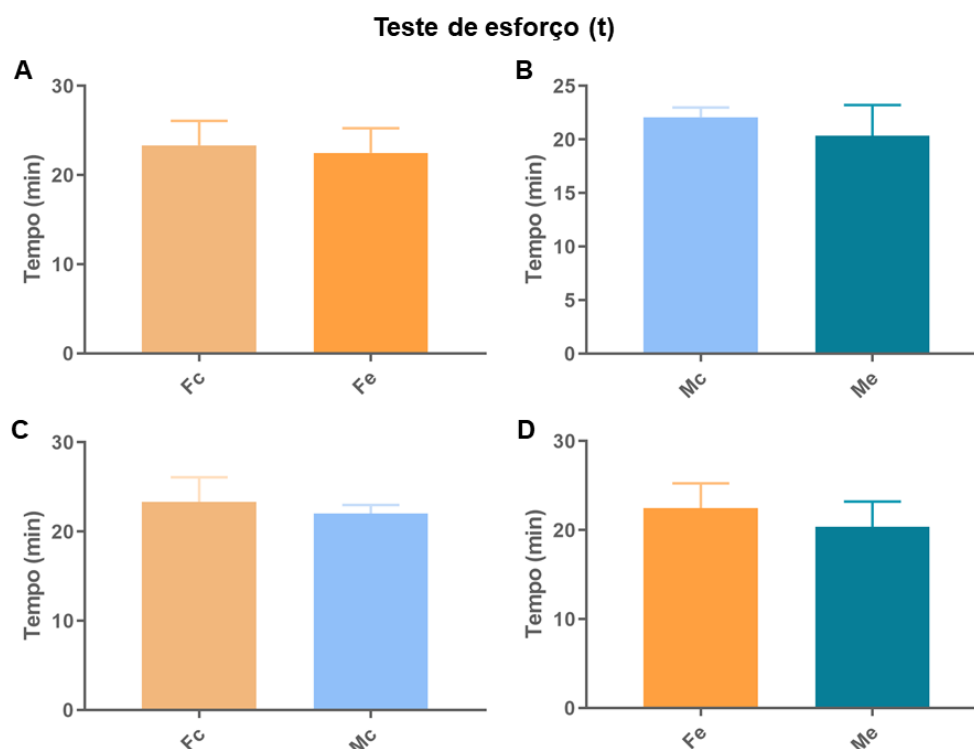
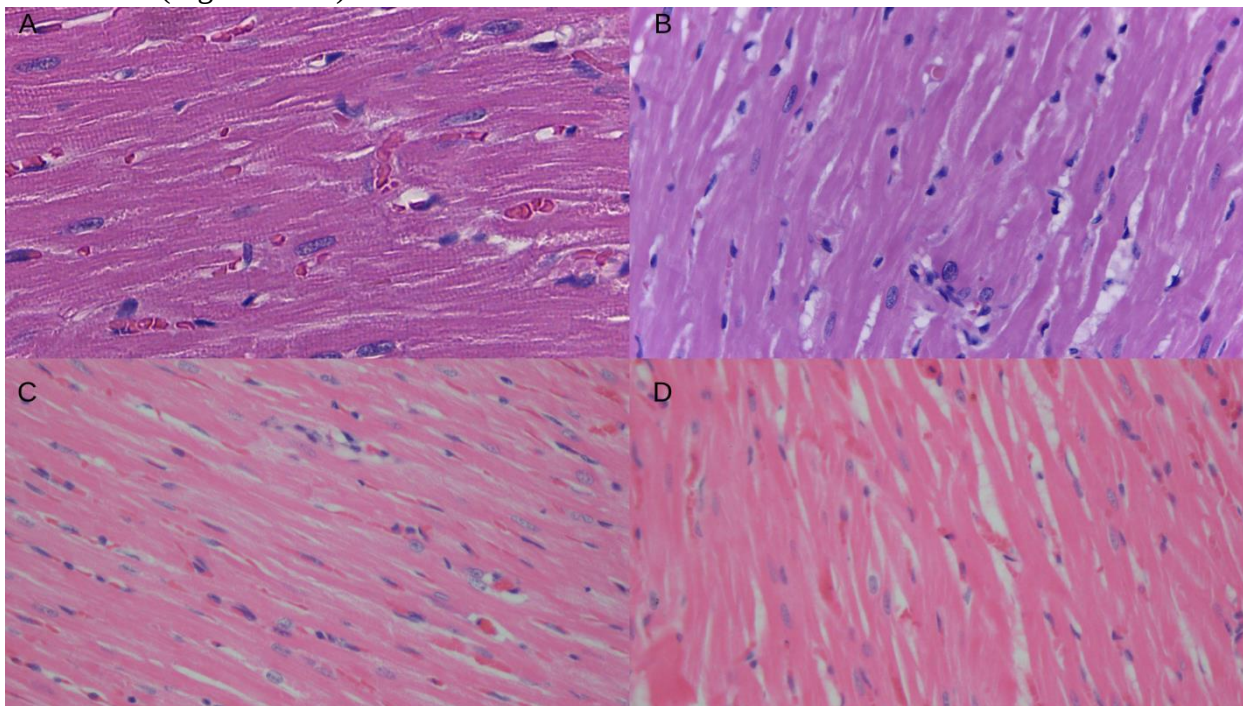


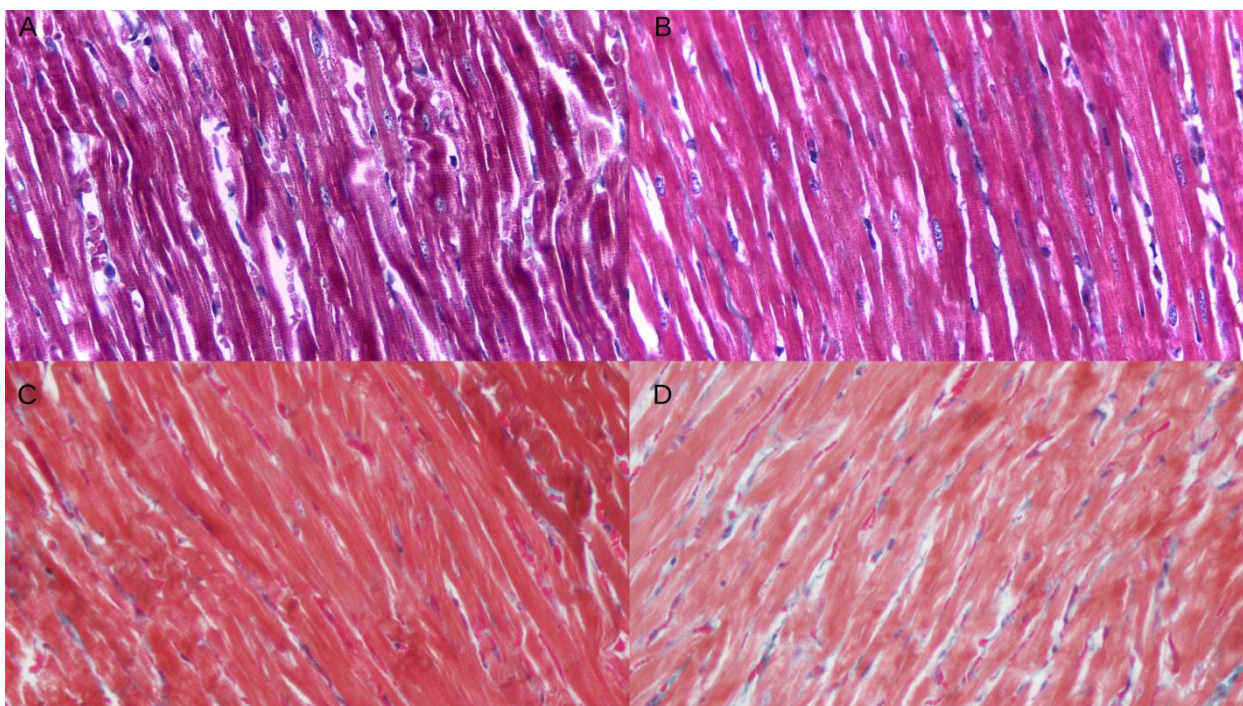
Fig. 15. Tempos de operação do teste de esforço em esteira. A: comparação entre fêmeas; B: comparação entre machos; C: comparação entre controles; D: comparação entre expostos (* $p < 0,05$).

468 3.7 Histologia

469 Verificamos que as fibras cardíacas se apresentaram mais espaçadas e com menor
470 quantidade de núcleos. Além disso, constatamos maior presença de fibroblastos e
471 deposição de feixes de fibras colágenas nos ratos expostos. Notamos aproximação maior
472 entre os núcleos dos cardiomiócitos e estriações das fibras cardíacas mais evidentes nos
473 controles (Figs. 16 e 17).



474 Fig. 16. Fotomicrografia do ventrículo esquerdo do coração. A: fêmeas controles; B: fêmeas expostas; C: machos
475 controles; D: machos expostos. HE. Aumento do microscópio: 400X.



477 Fig. 17. Fotomicrografia do ventrículo esquerdo do coração. A: fêmeas controles; B: fêmeas expostas; C: machos
478 controles; D: machos expostos. TM. Aumento do microscópio: 400X.

3.8 Dano mitocondrial

Constatamos que tanto as fêmeas quanto os machos expostos apresentaram menor concentração da proteína SDHA (Fig. 19). Já a concentração da proteína COX (Fig. 21) é menor nos machos expostos. A concentração da ALDH2 mostrou diferença entre os grupos controles (Fig. 22C).

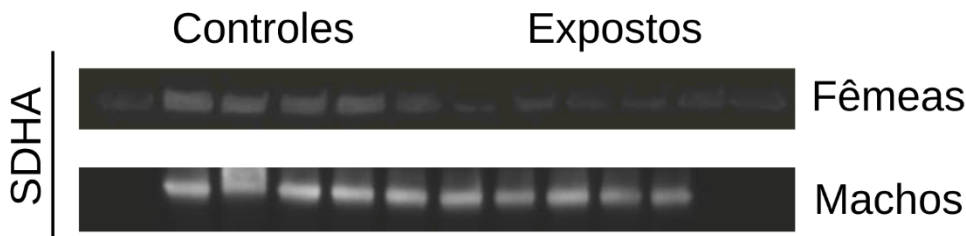


Fig. 18. Western Blot para quantificação da SDHA.

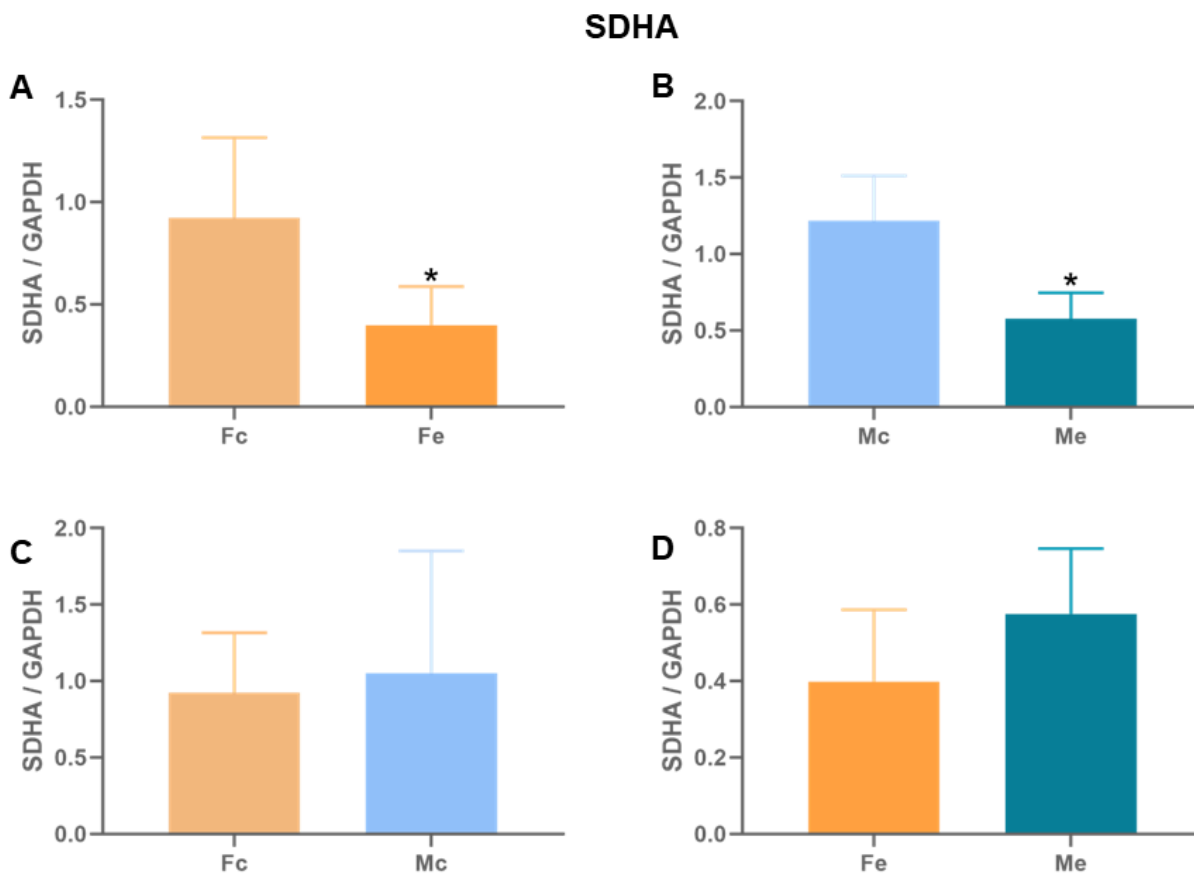


Fig. 19. Quantificação da proteína SDHA. A: comparação entre fêmeas; B: comparação entre machos; C: comparação entre controles; D: comparação entre expostos ($p < 0,05^*$).

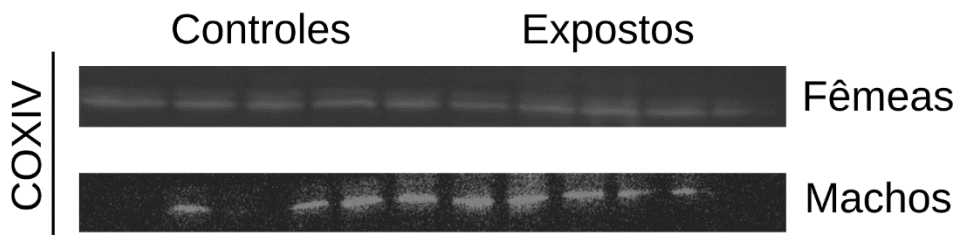


Fig. 20. Western Blot para quantificação da COXIV.

COX IV

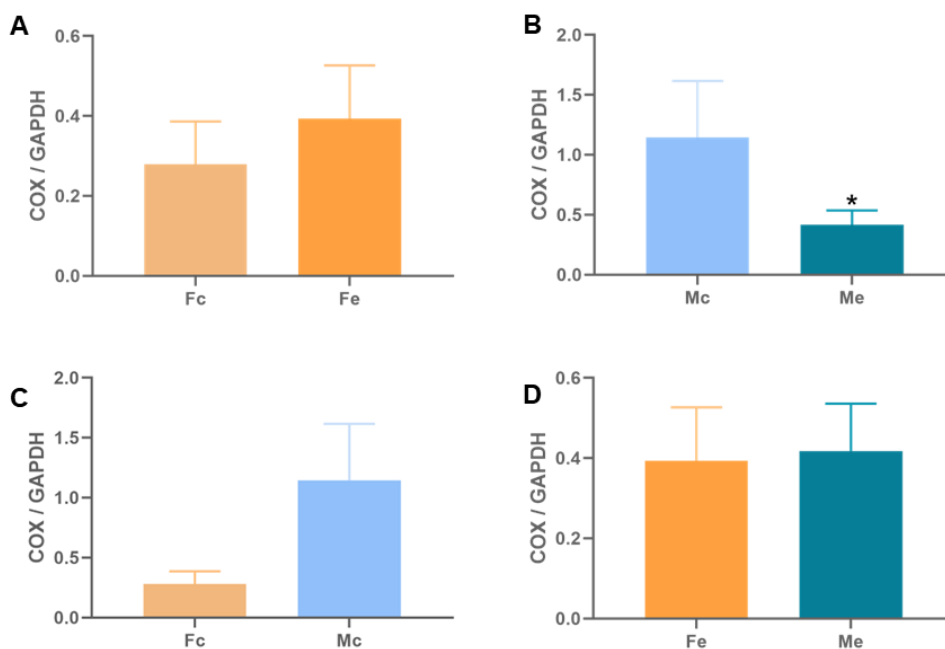


Fig. 21. Quantificação da proteína COXIV. A: comparação entre fêmeas; B: comparação entre machos; C: comparação entre controles; D: comparação entre expostos ($p < 0,05^*$).

ALDH2

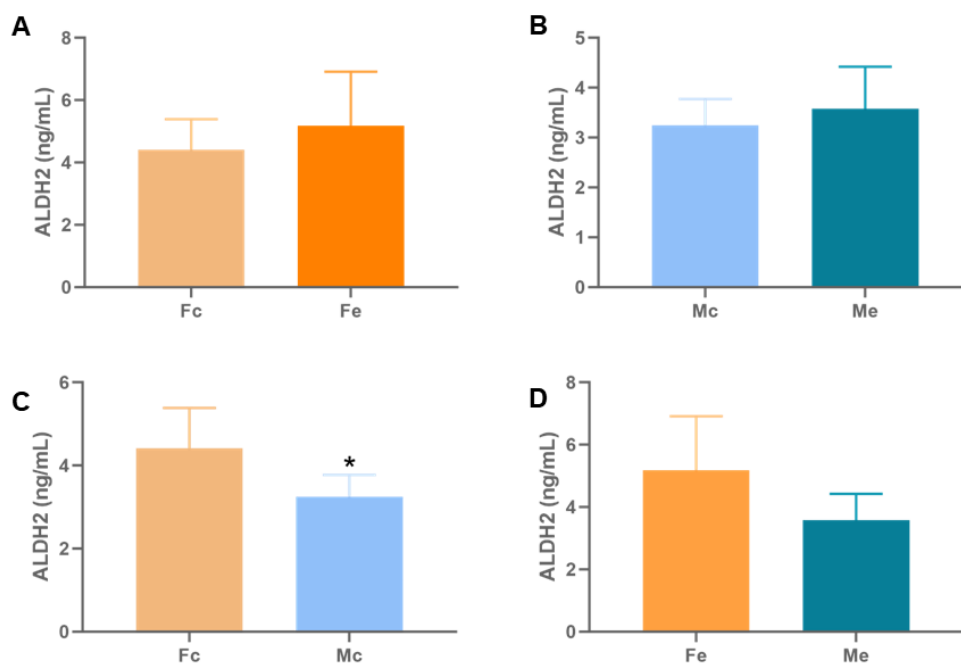


Fig. 22. Elisa para quantificação da ALDH2. A: comparação entre fêmeas; B: comparação entre machos; C: comparação entre controles; D: comparação entre expostos ($p < 0,05^*$).

3.9 Taxa de reposição tecidual

Não houve diferença na proliferação celular (Fig. 24). A concentração da proteína CYCS mostrou diferença entre fêmeas (Fig. 26A) e controles (Fig. 26C).

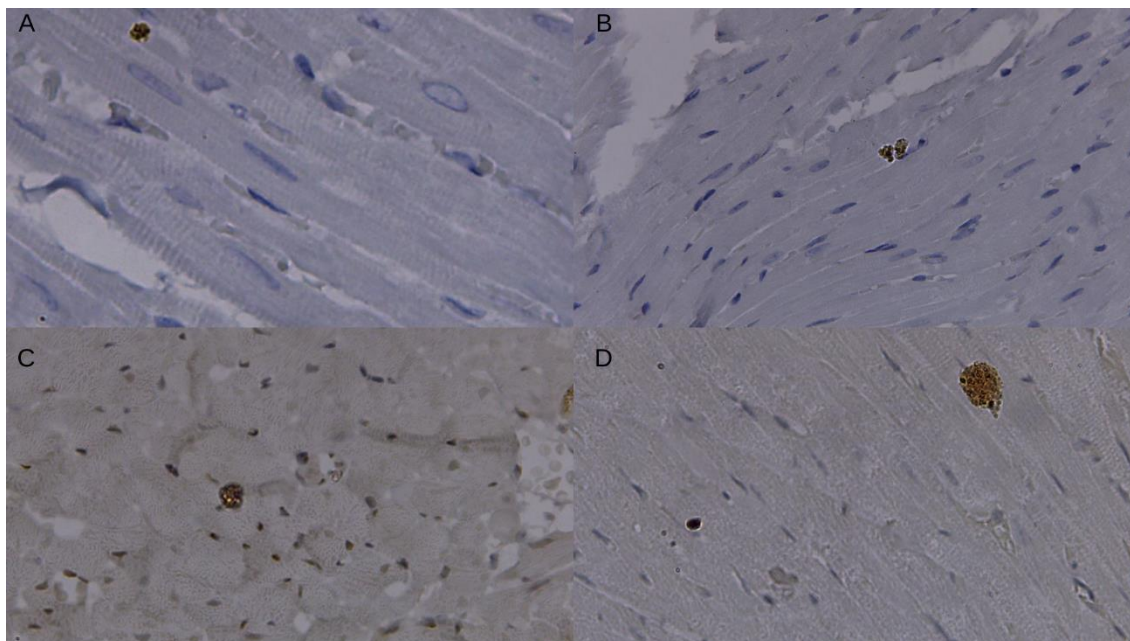


Fig. 23. Fotomicrografia do ventrículo esquerdo do coração. A: fêmeas controles; B: fêmeas expostas; C: machos controles; D: machos expostos. Imunohistoquímica com anti-Ki67. Aumento do microscópio: 400X.

Ki67

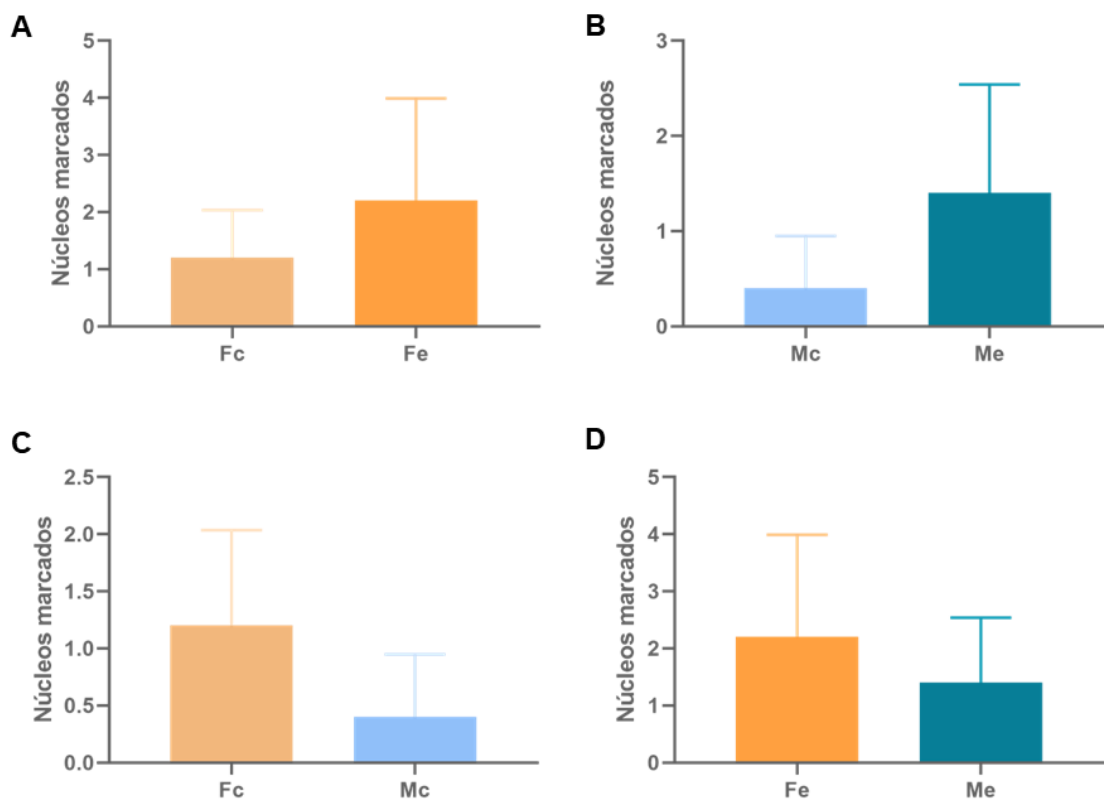


Fig. 24. Contagem dos núcleos marcados com Ki67. A: comparação entre fêmeas; B: comparação entre machos; C: comparação entre controles; D: comparação entre expostos ($p < 0,05^*$).

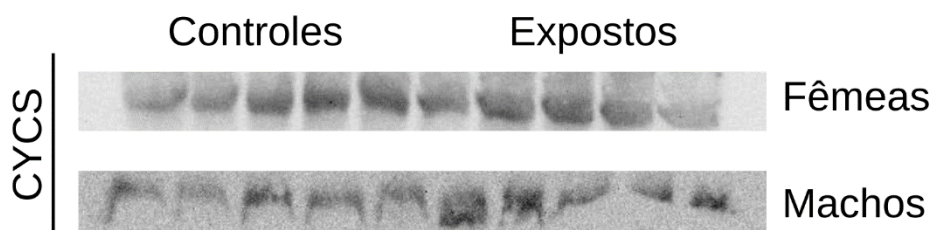


Fig. 25. Western Blot para quantificação da CYCS.

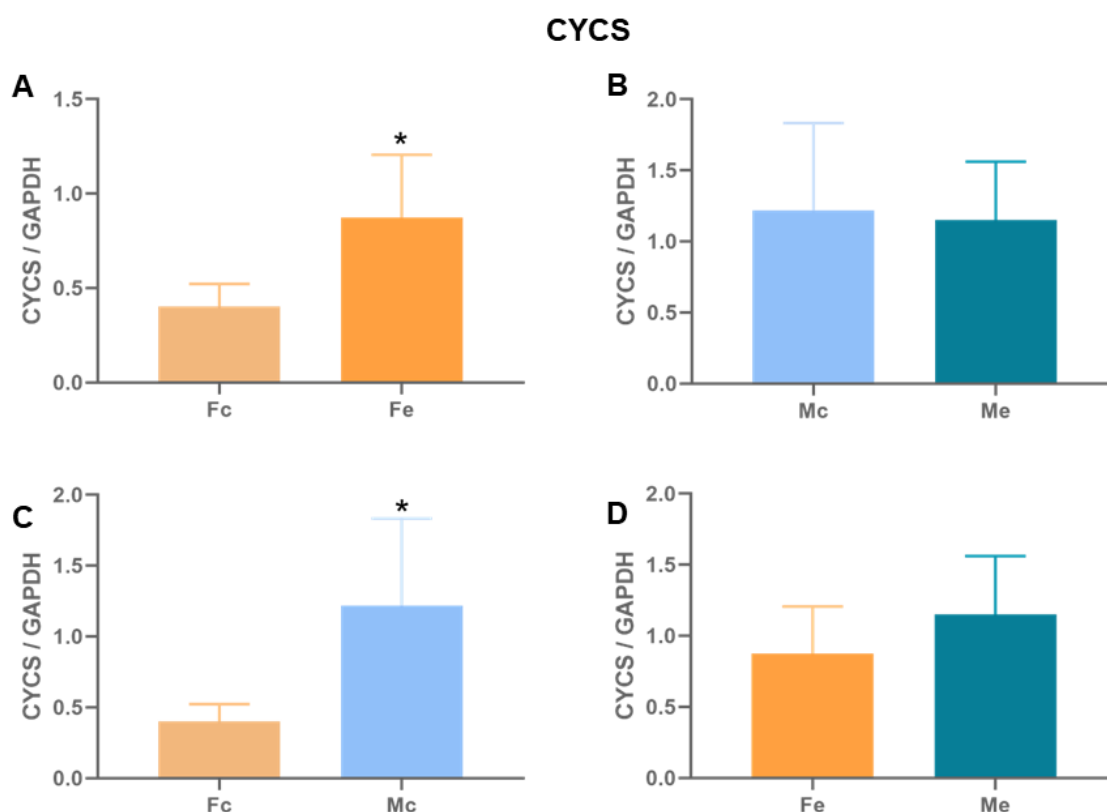


Fig. 26. Quantificação da proteína CYCS. A: comparação entre fêmeas; B: comparação entre machos; C: comparação entre controles; D: comparação entre expostos ($p < 0,05^*$).

IV Discussão

O etanol crônico gera menor ganho de peso e aumento do peso relativo do coração em machos e fêmeas expostas, aumento do intervalo QT, diminuição do intervalo RR e aumento da FC em fêmeas expostas. Aumento da espessura diastólica da parede posterior do VE (EDPP), da espessura diastólica do septo interventricular (EDSIV) e espessura relativa do VE (ERVE) foram verificados em machos expostos. Entre os sexos, a

exposição levou ao aumento do diâmetro diastólico (DDVE), diâmetro sistólico (DSVE), espessura diastólica do septo interventricular (EDSIV) e índice de desempenho miocárdico (Tei) nos machos.

Há um estágio assintomático da ACM que se caracteriza pela dilatação e aumento da massa do VE e disfunção diastólica. O estágio sintomático da ACM é caracterizado por dilatação e aumento da massa do VE, adelgaçamento da parede, disfunção sistólica e sinais e sintomas de IC (LAONIGRO et al., 2009). Com a progressão da doença para IC, o tamanho do coração aumenta para equilibrar o dano, a função cardíaca se deteriora e os sintomas tornam-se evidentes. Esse aumento é resultado do processo de remodelação cardíaca que engloba mudanças associadas à IC (COHN, FERRARI, SHARPE, 2000).

A remodelação cardíaca pode ser descrita como condição fisiológica e patológica que pode ocorrer após infarto do miocárdio (IM), sobrecarga de pressão (estenose aórtica, hipertensão), doença inflamatória do músculo cardíaco (miocardite), cardiomiopatia idiopática dilatada ou sobrecarga de volume (regurgitação valvar). Embora as etiologias dessas doenças sejam diferentes, elas compartilham várias vias bioquímicas e moleculares (COHN, FERRARI, SHARPE, 2000). A remodelação é conceituada como alterações moleculares, celulares e intersticiais que se manifestam clinicamente através de alterações no tamanho, forma e função do coração após lesão. Sendo esse processo influenciado pela carga hemodinâmica e ativação neuro-hormonal, tendo os cardiomiócitos como principais células envolvidas. A partir do estiramento das fibras cardíacas ocorre aumento na atividade de norepinefrina local, na liberação de angiotensina e endotelina, resultando na expressão de proteínas alteradas e na hipertrofia dos cardiomiócitos. A hipertrofia acarreta aumento da ativação neuronal e deterioração do desempenho cardíaca (COHN, FERRARI, SHARPE, 2000).

Os tecidos cardíacos contêm quantidades substanciais de norepinefrina, localizadas nas terminações dos nervos simpáticos, em posição próxima às fibras miocárdicas (DAHLSTRÖM et al., 1965). A ativação simpática cardíaca ocorre durante o estresse, para melhorar o débito cardíaco. Entretanto, no quadro de lesão cardíaca, a diminuição do débito cardíaco resulta reflexivamente em ativação simpática crônica, que pode levar à progressão da insuficiência cardíaca e ao desenvolvimento de arritmias ventriculares (FUKUDA et al., 2015). A norepinefrina é o neurotransmissor primário liberado pelos nervos eferentes simpáticos pós-ganglionares (CHAN et al., 2020).

O sistema nervoso autônomo regula intrinsecamente a excitabilidade e função contrátil do coração. A cada batimento cardíaco, os aferentes fornecem informações da

atividade do músculo cardíaco para o neuro eixo. Informações adicionais são transmitidas via receptores circulatórios extra cardíacos. Nas cardiopatias estruturais, onde as heterogeneidades no substrato elétrico cardíaco são amplificadas pela norepinefrina, levando a alto risco de arritmias, incluindo taquicardia e fibrilação. A desregulação autonômica cardíaca é central para o desenvolvimento e progressão da maioria das doenças cardiovasculares (hipertensão, insuficiência cardíaca, arritmias e infarte) (FUKUDA et al., 2015).

A doença cardíaca perturba não só músculo, mas também o sistema nervoso cardíaco (CHAN et al., 2020), que está fortemente ligado a regulação elétrica do coração. Dentre muitos dos efeitos do etanol no coração, está a implicação sobre o ritmo cardíaco e arritmias (GEORGE, FIGUEREDO, 2010). Verificamos diferença entre os grupos Fc e Fe em todas as análises eletrocardiográficas, identificando maior intervalo QT, maior FC e menor intervalo RR nas expostas. Também identificamos diferenças no intervalo QT entre os grupos controles, comprovando a teoria da diferença sexual (FEI, STATTERS, CAMM, 1994; RAUTAHARJU, SURAWICZ, GETTES, 2009; URBANO-MÁRQUEZ et al., 1995).

O intervalo QT é definido como o intervalo desde o início do complexo QRS, ou seja, a indicação mais precoce de despolarização ventricular até o final da onda T que indica o fim da repolarização ventricular (RAUTAHARJU, SURAWICZ, GETTES, 2009). Dessa forma, o aumento detectado no Fe comprova alterações na despolarização e repolarização ventricular.

A frequência cardíaca é o número de batimentos do coração por minuto (GUYTON & HALL, 2011), sendo seu aumento denominado taquicardia. O etanol também está positivamente correlacionado com taquicardia ventricular e morte súbita cardíaca em bebedores pesados (GEORGE, FIGUEREDO, 2010). Quando a frequência cardíaca aumenta, a duração de cada ciclo cardíaco diminui, incluindo as fases de contração e relaxamento, isso significa que o coração, em frequência muito rápida, não permanece relaxado tempo suficiente para permitir o enchimento completo das câmaras cardíacas antes da próxima contração (GUYTON & HALL, 2011). A turbulência anormal da frequência cardíaca está associada ao aumento da mortalidade e morte súbita em pacientes com doença arterial coronariana e cardiomiopatia dilatada (FUKUDA et al., 2015).

O Intervalo RR corresponde ao tempo entre dois complexos QRS. Esse complexo é produzido pelos potenciais gerados quando os ventrículos se despolarizam antes de sua

602 contração, isto é, enquanto a onda de despolarização se propaga pelos ventrículos
603 (GUYTON & HALL, 2011). Dessa forma, a constatação de que o Fe possui um intervalo
604 RR menor que o Fc corrobora que arritmias em alcoólicos crônicos podem representar
605 manifestações clínicas da cardiomiopatia dilatada, devido a anormalidades eletrolíticas
606 (GEORGE, FIGUEREDO, 2010).

607 Os ecocardiogramas dos Me apresentaram aumento na espessura diastólica da
608 parede posterior do VE (EDPP), na espessura diastólica do septo interventricular
609 (EDSIV) e espessura relativa do VE (ERVE). Esse aumento caracteriza remodelação
610 concêntrica da geometria ventricular esquerda (ANGELAKI et al., 2021). Entre os
611 controles, os ecocardiogramas apresentaram diferenças no diâmetro diastólico (DDVE),
612 diâmetro sistólico do VE (DSVE), espessura diastólica da parede posterior do VE
613 (EDPP), espessura diastólica do septo interventricular (EDSIV), espessura relativa do VE
614 (ERVE) e velocidade de encurtamento da parede posterior (VEPP). Sendo todos esses
615 valores maiores nos Mc comparados as Fc. Esse resultado representa a diferença de peso
616 corpóreo entre machos e fêmeas. As fêmeas pesão em média 150 g a menos que os
617 machos. Dessa forma, os pontos de corte para identificar hipertrofia ventricular esquerda
618 são diferentes entre os sexos (KRUMHOLZ, LARSON, LEVY, 1995).

619 Os ecocardiogramas dos Me foram maiores nas variáveis: diâmetro diastólico
620 (DDVE), diâmetro sistólico (DSVE), espessura diastólica do septo interventricular
621 (EDSIV) e índice de desempenho miocárdico (Tei) em relação a Fe. Além disso, foi
622 constatado menor índice de massa do VE (IMVE) nos machos. Esses resultados apontam
623 as diferenças estruturais, bioquímicas e funcionais do coração de machos e fêmeas, da
624 mesma idade (CAPASSO et al., 1983), além de terem relação com a diferença do peso
625 corporal e do peso do coração, sendo que maiores nos machos (SHREINER,
626 WEISFELDT, SHOCK, 1969; WOLINSKY, 1971; DADGAR, et al., 1979). Porém, a
627 razão do peso do coração pelo peso corporal é maior nas mulheres (BERG; HARMISON,
628 1955).

629 Nas investigações acerca da biogênese mitocondrial e sobrevivência celular,
630 verificamos menor quantidade das proteínas SDHA e COXIV em machos e fêmeas
631 expostos e aumento na concentração de CYCS em fêmeas expostas. O etanol e o
632 acetaldeído conferem efeito tóxico nas mitocôndrias, atuando na inibição da respiração
633 mitocondrial, além disso, aumenta as concentrações da proteína pró-apoptótica Bax e a
634 atividade da enzima caspase-3 (LAONIGRO et al., 2009). Com a ativação do processo

de morte celular ocorre a liberação do citocromo C no citoplasma, aumentando a concentração da CYCS.

Durante a respiração celular, o O_2 atua como aceptor final de elétrons, dessa forma, ao ser reduzido pelo complexo IV ocorre a formação de H_2O , catalisada pela COXIV. Esse processo não é totalmente eficiente e a transferência de elétrons para O_2 pode ocorrer no complexo I ou III, resultando na geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) que oxidam proteínas celulares, lipídios e ácidos nucleicos, causando disfunção ou morte celular (FUKUDA et al., 2007). Portanto, a diminuição da COXIV contribui na geração de ROS. Além disso, essa proteína atua como reguladora da respiração celular, pois se liga ao ATP, levando à inibição alostérica da atividade do complexo IV, em altas razões ATP/ADP (NAPIWOTZKI; KADENBACH, 1998).

Dentre os mecanismos relacionados às lesões de órgãos expostos ao etanol, o aumento do estresse oxidativo, a indução de metilação, as modificações pós-traducionais, a desregulação do metabolismo lipídico e a transdução de sinal se destacam (OBAD et al., 2018). A desregulação no metabolismo lipídico é extremamente prejudicial no coração, pois cerca de 60 a 80 % da energia do miocárdio em adultos é derivada da oxidação de ácidos graxos livres, sendo que em pacientes com doenças cardíacas foram detectadas falta de energia ou acúmulo excessivo de gordura (AJITH; JAYAKUMAR, 2016).

As mitocôndrias são a força motriz da célula e alvos vulneráveis ao dano oxidativo. A manutenção da homeostase redox é crítica para a função celular normal e é particularmente importante para o coração que exige alta quantidade de energia. Normalmente, a homeostase redox é mantida pelo equilíbrio entre a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), originadas pela utilização de oxigênio para geração de energia, e a defesa antioxidante endógena (WANG et al., 2010). O prejuízo da estrutura e função mitocondrial, resultante do aumento do estresse oxidativo, é importante contribuinte para a patogênese cardíaca (WANG et al., 2010).

Comprometimento da atividade da SDH foi descrita em alguns pacientes nos últimos 20 anos, associada a cardiomiopatia hipertrófica isolada (RUSTIN et al., 1993) e cardiomiopatia hipertrófica com miopatia do músculo esquelético (LESTIENNE, 1999). Como essas proteínas representam alvo privilegiado para os superóxidos, pode-se prever que danos semelhantes, envolvendo o SDH, serão progressivamente relatados em diversas situações de estresse oxidativo. Dessa forma, alterações no funcionamento das proteínas do complexo II, tanto na produção de ATP na cadeia respiratória e no manuseio

669 do O₂, quanto no ciclo de Krebs e metabolismo mitocondrial órgão específico (RUSTIN,
670 2002) estão ligados a cardiomiopatias.

671 **V Conclusão**

672 Concluímos que há remodelação cardíaca concêntrica e lesão mitocondrial,
673 diminuindo o desempenho e a produção de energia do ventrículo esquerdo de ratos
674 machos e fêmeas da variedade UChB, sendo as fêmeas mais sensíveis.

675 **VI Referências bibliográficas compiladas**

- 676 AJITH, T. A.; JAYAKUMAR, T. G. Peroxisome proliferator-activated receptors in
677 cardiac energy metabolism and cardiovascular disease. **Clinical and Experimental**
678 **Pharmacology and Physiology**, v. 43, n. 7, p. 649–658, jul. 2016.
- 679 ANGELAKI, E. et al. Detection of abnormal left ventricular geometry in patients without
680 cardiovascular disease through machine learning: An ECG-based approach. **The Journal**
681 **of Clinical Hypertension**, p. jch.14200, 28 jan. 2021.
- 682 BARAONA, E. et al. Gender Differences in Pharmacokinetics of Alcohol. **Alcoholism:**
683 **Clinical and Experimental Research**, v. 25, n. 4, p. 502–507, abr. 2001.
- 684 BANERJEE, I. et al. Determination of cell types and numbers during cardiac
685 development in the neonatal and adult rat and mouse. **American Journal of Physiology.**
686 **Heart and Circulatory Physiology**, v. 293, n. 3, p. H1883-1891, set. 2007.
- 687 BERG, B. N.; HARMISON, C. R. Blood Pressure and Heart Size in Aging Rats. **Journal**
688 **of Gerontology**, v. 10, n. 4, p. 416–419, 1 out. 1955.
- 689 BOURGERON, T. et al. Mutation of a nuclear succinate dehydrogenase gene results in
690 mitochondrial respiratory chain deficiency. **Nature Genetics**, v. 11, n. 2, p. 144–149, out.
691 1995.
- 692 BRANDT, M.; WENZEL, P. Alcohol puts the heart under pressure: Acetaldehyde
693 activates a localized renin angiotensin aldosterone system within the myocardium in
694 alcoholic cardiomyopathy. **International Journal of Cardiology**, v. 257, p. 220–221,
695 abr. 2018.
- 696 CAPASSO, J. M. et al. Sex differences in myocardial contractility in the rat. **Basic**
697 **Research in Cardiology**, v. 78, n. 2, p. 156–171, mar. 1983.

- 698 CARNEVALE, R.; NOCELLA, C. Alcohol and cardiovascular disease: Still unresolved
699 underlying mechanisms. **Vascular Pharmacology**, v. 57, n. 2–4, p. 69–71, set. 2012.
- 700 CHAN, S.-A. et al. Fast in vivo detection of myocardial norepinephrine levels in the
701 beating porcine heart. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory**
702 **Physiology**, v. 318, n. 5, p. H1091–H1099, 1 maio 2020.
- 703 COHN, J. N.; FERRARI, R.; SHARPE, N. Cardiac remodeling—concepts and clinical
704 implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling.
705 **Journal of the American College of Cardiology**, v. 35, n. 3, p. 569–582, mar. 2000.
- 706 DADGAR, S. K. et al. Factors influencing the normal heart weight--a study of 140 hearts.
707 **Japanese circulation journal**, v. 43, n. 2, p. 77–82, 1979.
- 708 DAHLSTRÖM, A. et al. Observations on adrenergic innervation of dog heart. **American**
709 **Journal of Physiology-Legacy Content**, v. 209, n. 4, p. 689–692, 1 out. 1965.
- 710 FEI, L.; STATTERS, D. J.; CAMM, A. J. QT-interval dispersion on 12-lead
711 electrocardiogram in normal subjects: its reproducibility and relation to the T wave.
712 **American heart journal**, v. 127, n. 6, p. 1654–1655, 1994.
- 713 FEI, L.; STATTERS, J.; CAMM, A. J. QT-interval dispersion on 12-lead
714 electrocardiogram in normal subjects: Its reproducibility and relation to the T wave. p. 2,
715 [s.d.].
- 716 FERNÁNDEZ-SOLÀ, J. Cardiovascular risks and benefits of moderate and heavy
717 alcohol consumption. **Nature Reviews Cardiology**, v. 12, n. 10, p. 576–587, out. 2015.
- 718 FERNANDEZSOLA, J. et al. Evidence of apoptosis in alcoholic cardiomyopathy☆.
719 **Human Pathology**, v. 37, n. 8, p. 1100–1110, ago. 2006.
- 720 FERNÁNDEZ-SOLÀ, J. Cardiovascular risks and benefits of moderate and heavy
721 alcohol consumption. **Nature Reviews Cardiology**, v. 12, n. 10, p. 576–587, out. 2015.
- 722 FERNÁNDEZ-SOLÀ, J.; PLANAVILA PORTA, A. New Treatment Strategies for
723 Alcohol- Induced Heart Damage. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17,
724 n. 10, p. 1651, 29 set. 2016.
- 725 FUKUDA, R. et al. HIF-1 Regulates Cytochrome Oxidase Subunits to Optimize
726 Efficiency of Respiration in Hypoxic Cells. **Cell**, v. 129, n. 1, p. 111–122, abr. 2007.
- 727 FUKUDA, K. et al. Cardiac innervation and sudden cardiac death. **Circulation research**,
728 v. 116, n. 12, p. 2005–2019, 2015.

- 729 GAPP, K.; JAWAID, S.; SARKIES, P.; BOHACEK, J.; PELCZAR, P.; PRADOS, J.;
730 FARINELLI, P.; MISKA, E.; MANSUY, I. M. Implication of sperm RNAs in
731 transgenerational inheritance of the effects of early trauma in mice. **Nature**
732 **Neuroscience**, v.17, p. 667-669, 2014.
- 733 GEORGE, A.; FIGUEREDO, V. M. Alcohol and arrhythmias: a comprehensive review.
734 **Journal of Cardiovascular Medicine**, v. 11, n. 4, p. 221–228, abr. 2010.
- 735 GUMEDE MV. Alcohol use and abuse in South Africa: A socio-medical problem.
736 Pietermaritzburg, South Africa: **Reach Out Publishers**. 1995
- 737 HALL, J. E. **Guyton & Hall Physiology Review E-Book**. 2. ed. [s.l.] Saunders, 2011
- 738 KIECHL, S.; WILLEIT, J. Complex Association Between Alcohol Consumption and
739 Myocardial Infarction: Always Good for a New Paradox. **Circulation**, v. 130, n. 5, p.
740 383–386, 29 jul. 2014.
- 741 KLIGFIELD, P. et al. Recommendations for the Standardization and Interpretation of the
742 Electrocardiogram. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 49, n. 10, p.
743 1109– 1127, mar. 2007.
- 744 KRENZ, M.; KORTHUIS, R. J. Moderate ethanol ingestion and cardiovascular
745 protection: From epidemiologic associations to cellular mechanisms. **Journal of**
746 **Molecular and Cellular Cardiology**, p. 12, 2012.
- 747 KRUMHOLZ, H. M.; LARSON, M.; LEVY, D. Prognosis of left ventricular geometric
748 patterns in the Framingham heart study. **Journal of the American College of**
749 **Cardiology**, v. 25, n. 4, p. 879–884, mar. 1995.
- 750 KRYZHANOVSKII, S. A. et al. Evidence of Echocardiography Validity in Model
751 Experiments on Small Animals. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v.
752 161, n. 3, p. 434–438, jul. 2016.
- 753 LANNG, A. R. et al. The effect of acute intragastric vs. intravenous alcohol
754 administration on inflammation markers, blood lipids and gallbladder motility in healthy
755 men. **Alcohol**, p. S0741832920302111, abr. 2020.
- 756 LAONIGRO, I. et al. Alcohol abuse and heart failure. **European Journal of Heart**
757 **Failure**, v. 11, n. 5, p. 453–462, maio 2009.
- 758 LESTIENNE, P. (ED.). **Mitochondrial Diseases**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin
759 Heidelberg, 1999.

- 760 NAPIWOTZKI, J.; KADENBACH, B. Extramitochondrial ATP/ADP-Ratios Regulate
761 Cytochrome c Oxidase Activity via Binding to the Cytosolic Domain of Subunit IV.
762 **bchm**, v. 379, n. 3, p. 335–340, 1998.
- 763 MARDONES, J.; SEGOVIA-RIQUELME, N.; HEDERRA, A. Heredity of experimental
764 alcohol preference in rats. II. Coefficient of heredity. **Quartely Journal of Studies on**
765 **Alcohol**, v.4, p. 1-2, 1953.
- 766 MARDONES, J.; SEGOVIA-RIQUELMI, N. Thirty-two years of rats by ethanol
767 preference: UChA and UChB strains. **Neurobehavioral Toxicology and Teratology**,
768 v. 5, p. 171-178, 1983.
- 769 OBAD, A. et al. Alcohol-Mediated Organ Damages: Heart and Brain. **Frontiers in**
770 **Pharmacology**, v. 9, p. 81, 13 fev. 2018.
- 771 OJO, O. O.; EMOGHWA, A. R. Methanol extracts of *Strophanthus hispidus* exhibit anti-
772 apoptotic effects via alteration of cytochrome c and caspase 3 levels in rats with
773 myocardial infarction. **Chemical Papers**, v. 74, n. 2, p. 521–528, fev. 2020.
- 774 PARRY CDH; BENNETTS AL. **Alcohol policy and public health in South Africa**.
775 Cape Town: Oxford University Press, 1998.
- 776 PETTEE GABRIEL, K. et al. Clinical importance of non-participation in a maximal
777 graded exercise test on risk of non-fatal and fatal cardiovascular events and all-cause
778 mortality: CARDIA study. **Preventive Medicine**, v. 106, p. 137–144, jan. 2018.
- 779 PIEPOLI, M. F.; SPOLETINI, I.; ROSANO, G. Monitoring functional capacity in heart
780 failure. **European Heart Journal Supplements**, v. 21, n. Supplement_M, p. M9–M12,
781 1 dez. 2019.
- 782 PRÓSPERO, A. G. et al. Real-time in vivo monitoring of magnetic nanoparticles in the
783 bloodstream by AC biosusceptometry. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 15, n. 1, p. 22,
784 dez. 2017.
- 785 PRÓSPERO, A. G. et al. Real-time in vivo monitoring of magnetic nanoparticles in the
786 bloodstream by AC biosusceptometry. **Journal of nanobiotechnology**, v. 15, n. 1, p. 22,
787 2017.
- 788 RAUTAHARJU, P. M.; SURAWICZ, B.; GETTES, L. S. AHA/ACCF/HRS
789 Recommendations for the Standardization and Interpretation of the Electrocardiogram.
790 **Journal of the American College of Cardiology**, v. 53, n. 11, p. 982–991, mar. 2009.
- 791 ROOM, R. *et al.* Alcohol in Developing Societies: a Public Health Approach. **Society for**
792 **the Study of Addiction to Alcohol and Other Drugs**, Helsinki, p. 1008-1009, 2003.

- 793 RUSTIN, P. et al. The investigation of respiratory chain disorders in heart using
794 endomyocardial biopsies. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, v. 16, n. 3, p. 541–
795 544, 1993.
- 796 RUSTIN, P; RÖTIG, A. Inborn errors of complex II - Unusual human mitochondrial
797 diseases. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1553, n. 2, p. 117-122, jan. 2002.
- 798 SARASTE, M. Oxidative Phosphorylation at the fin de siecle. **SCIENCE**, v. 283, n.
799 5407, p. 1488-1493, mar. 1999.
- 800 SHREINER, D.; WEISFELDT, M.; SHOCK, N. Effects of age, sex, and breeding status
801 on the rat heart. **American Journal of Physiology-Legacy Content**, v. 217, n. 1, p. 176–
802 180, 1 jul. 1969.
- 803 SOUZA, L. M. et al. Efeitos do Exercício Aeróbico Tardio na Remodelação Cardíaca de
804 Ratos com Infarto do Miocárdio Pequeno. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 116,
805 n. 4, p. 784– 792, 8 abr. 2021.
- 806 URBANO-MÁRQUEZ, A. et al. The greater risk of alcoholic cardiomyopathy and
807 myopathy in women compared with men. **JAMA: the journal of the American Medical**
808 **Association**, v. 274, n. 2, p. 149–154, 1995.
- 809 URBANO-MÁRQUEZ, A. et al. The effects of alcoholism on skeletal and cardiac
810 muscle. **N. Engl. J. Med.** 320, 409–415 1989.
- 811 VAIDEESWAR, P. et al. Cardiac pathology in chronic alcoholics: A preliminary study.
812 **Journal of Postgraduate Medicine**, v. 60, n. 4, p. 372, 2014.
- 813 WANG, P. et al. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor δ Is an Essential
814 Transcriptional Regulator for Mitochondrial Protection and Biogenesis in Adult Heart.
815 **Circulation Research**, v. 106, n. 5, p. 911–919, 19 mar. 2010.
- 816 WOLINSKY, H. Effects of Hypertension and Its Reversal on the Thoracic Aorta of Male
817 and Female Rats: Morphological and Chemical Studies. **Circulation Research**, v. 28, n.
818 6, p. 622– 637, jun. 1971.
- 819 WORLD Health Organization. **Global status report on alcohol and health 2014** ed.
820 World Health Organization. Geneva, Switzerland 2014.
- 821 WORLD Health Organization. **Global status report on alcohol and health 2018** ed.
822 World Health Organization. Geneva, Switzerland 2018.