

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
FISIOLOGIA

Dissertação de Mestrado

**Alterações hepáticas e renais em ratos expostos ao álcool, fumaça de
cigarro ou a sua associação**

Aluno

Solange Bandiera

Orientadora

Prof. Dra. Rosane Gomez

Co-Orientadora

Prof. Dra. Adriana Simon Coitinho

Colaboradoras

Prof. Dra. Eliane Dallegrave

Prof. Dra. Marilda C. Fernandes

Porto Alegre, 2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: FISILOGIA

Mestrado e Doutorado

Page: www.ufrgs.br/ppgfsio

Rua Sarmiento Leite, número 500, 2º andar

90050-170 – Porto Alegre – RS - Brasil

**Alterações hepáticas e renais em ratos expostos ao álcool, fumaça de
cigarro ou a sua associação**

SOLANGE BANDIERA

Orientadora: Dra. Rosane Gomez

Dissertação apresentada ao curso de
Pós-graduação em Ciências Biológicas:
Fisiologia, da Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, como requisito
Parcial para obtenção do grau de Mestre

Porto Alegre, Fevereiro de 2015

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Alex Sander da Rosa Araújo
Departamento de Fisiologia
ICBS - UFRGS

Profa. Dra. Mirna Bainy Leal
Departamento de Farmacologia
ICBS - UFRGS

Prof. Dr. Maurício Schüler Nin
Laboratório de Psicofarmacologia - UFCSPA
Centro Universitário Metodista - IPA

Dedico esse trabalho aos meus pais Benjamim Bandiera e Inês Zorzi Bandiera, ao meu irmão Ivan Bandiera e ao meu noivo Otaviano Luis Talgatti, que sempre me apoiaram para a realização dos meus sonhos.

Agradecimentos

A Deus.

A minha família que apesar de estar longe, sempre me apoiou para a realização dos meus sonhos.

A minha orientadora, Profa. Dra. Rosane Gomez, que prontamente me abriu as portas desta instituição e com confiança e apoio incondicional, exerceu grande influência na minha carreira científica e profissional. Com sua competência, uma verdadeira mestre, sempre disposta a esclarecer dúvidas e indicar caminhos. Obrigada pelo carinho, pela paciência e principalmente pelo incansável incentivo. Sem você nada do que realizamos seria possível. Agradeço a dedicação e expresso neste momento minha profunda admiração e respeito.

A minha co-orientadora, Prof. Dra. Adriana Simon Coitinho, pela atenção e colaboração a mim dispensadas durante a realização dos experimentos.

A Prof. Dra. Eliane Dallegrave, pelo seu incrível conhecimento e paciência nas inúmeras vezes que fui consultá-la. Sua colaboração sábia e criteriosa foi indispensável para o meu treinamento na análise das lâminas histológicas.

A Prof. Dra. Marilda C. Fernandes, por sua ajuda ao ceder o Laboratório de Patologia da UFCSPA e disponibilizar pessoas aptas para o meu treinamento na técnica histológica.

A Prof. Dra. Grazielle Halmenschlager, por ter cedido o microscópio ótico e a câmera digital para a análise das lâminas histológicas.

Aos demais professores do Programa de Pós Graduação de Ciências Biológicas: Fisiologia - UFRGS.

A todos os colaboradores e alunos bolsistas do Laboratório de Álcool e Tabaco

(LAT), que foram indispensáveis e incansáveis no auxílio à exposição dos animais à fumaça dos cigarros bem como nas demais etapas do experimento.

Ao CNPQ, pelo apoio financeiro.

Enfim, a todos os meus amigos e amigas, que sempre estiveram presentes, me aconselhando e incentivando e a todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a execução dessa dissertação.

Um agradecimento mais que especial, ao meu noivo Otaviano Luis Talgatti, pelo seu amor e constante apoio em todos os momentos, que tornaram esta conquista possível. Obrigada por todas as vezes que, com seus conhecimentos de engenharia, me ajudou com os problemas técnicos do experimento. Obrigada ainda pela compreensão e paciência.

Sumário

RESUMO.....	11
ABSTRACT	13
1. INTRODUÇÃO.....	15
2. HIPÓTESE	21
3. OBJETIVOS	22
3.1 Gerais.....	22
3.2 Específicos.....	22
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
4.1 Animais.....	23
4.2 Soluções e exposição à fumaça do cigarro	23
4.3 Procedimento experimental	24
4.4 Análises morfológicas	26
4.5 Determinação de medidas ponderais	27
4.6 Avaliação de parâmetros bioquímicos.....	27
4.7 Análise estatística	28
5. RESULTADOS	29
5.1 Variação de peso corporal	29
5.2 Variação de peso de diferentes tecidos corporais	30
5.3 Alterações bioquímicas.....	31
5.4 Alterações morfológicas	34
6. DISCUSSÃO	40
6.1 Efeitos do álcool, cigarro e sua associação sobre variações de peso.....	40
6.2 Efeito do álcool, cigarro ou a sua associação sobre dosagens bioquímicas	41
6.3 Efeito do álcool, cigarro e sua associação sobre alterações na morfologia hepática.....	44
6.4 Efeito do álcool, cigarro e sua associação sobre alterações morfológicas renais	50
7. CONCLUSÕES	53
8. PERSPECTIVAS.....	54
9. REFERÊNCIAS	55
10. ANEXOS	62

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Câmaras herméticas para exposição à fumaça do cigarro ou ar ambiental 25
- Figura 2:** Ganho de peso semanal (g) dos ratos expostos ao álcool (ALC), fumaça de cigarro (TAB) ou sua associação (ALTB). n = 10/grupo; ANOVA-duas vias de medidas repetidas; resultados expressos como média ± erro padrão; * diferente do grupo CTR. 29
- Figura 3:** Efeito da administração crônica de álcool (ALC), exposição à fumaça do cigarro (TAB) ou sua associação (ALTB) sobre a concentração da enzima aspartato aminotransferase (AST) no soro de ratos. ANOVA-2 via + Tukey. Média ± erro padrão (n= 7-9/grupo)..... 32
- Figura 4:** Efeito da administração crônica de álcool (ALC), exposição à fumaça do cigarro (TAB) ou sua associação (ALTB) sobre a concentração de enzima alanina aminotransferase (ALT) no soro de ratos. ANOVA-2 via + Tukey. Média ± erro padrão (n = 7-8/grupo). * diferença significativa em relação ao CTR ($P = 0,020$). 32
- Figura 5:** Efeito da administração crônica de álcool (ALC), exposição à fumaça do cigarro (TAB) ou a sua associação (ALTB) sobre os níveis séricos de Ureia, em ratos. ANOVA-2 vias + Tukey. Média ± erro padrão (n=8/grupo). 33
- Figura 6:** Efeito da administração crônica de álcool (ALC), exposição à fumaça do cigarro (TAB) ou a sua associação (ALTB) sobre a concentração sérica de creatinina, em ratos. ANOVA-2 vias + Tukey. Média ± erro padrão (n=8/grupo). * diferença significativa em relação ao ALC ($P=0,021$). 33
- Figura 7:** Efeito da administração crônica de álcool (ALC), exposição à fumaça do cigarro (TAB) ou a sua associação (ALTB) sobre o tecido hepático. Coloração: hematoxilina – eosina. Aumento 400X. A: grupo CTR, mostrando ausência de alteração histológica. B: grupo ALC, mostrando áreas de necrose (setas pretas) e tumefação celular (cabeça da seta). C: grupo TAB, mostrando áreas de necrose (setas pretas) D: grupo ALTb, mostrando áreas de necrose (setas pretas), células em estado de tumefação (cabeça da seta) e infiltrado inflamatório perivascular (setas amarelas). 34
- Figura 8:** Fotomicrografia hepática de animal do grupo ALC. Alteração hepática sugestiva de esteatose. Vacúolos lipídicos ocupam a maior parte do citoplasma dos hepatócitos, que empurram o núcleo e as demais organelas para a periferia da célula (setas pretas). Aumento 400x. 37
- Figura 9:** Efeito da administração crônica de álcool (ALC), exposição à fumaça do cigarro (TAB) ou a sua associação (ALTB) sobre parâmetros morfológicos do tecido renal. Coloração: hematoxilina – eosina. Aumento 400x. A: grupo CTR, mostrando ausência de alteração histológica. B: grupo ALC, mostrando áreas de necrose (setas pretas). C: grupo TAB, mostrando áreas de necrose (setas pretas). D: grupo ALTb, mostrando áreas de necrose (seta preta) e vacuolização (seta amarela). 38

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Determinação de peso corporal inicial e final, variação de peso total e ponderal, e índice de Lee dos ratos expostos ao álcool (ALC), fumaça de cigarro (TAB) ou sua associação (ALTB)..... 30
- Tabela 2:** Peso absoluto (g) e relativo (g/100g) do fígado, rim e gordura retroabdominal dos ratos expostos ao álcool (ALC), fumaça de cigarro (TAB) ou sua associação (ALTB). 31
- Tabela 3:** Avaliação histológica do tecido hepático de ratos expostos cronicamente ao álcool (ALC), fumaça de cigarro (TAB) ou sua associação (ALTB). n = 8/grupo. Kruskal-Wallis + Dunn. $P < 0,05$ apresentado em negrito..... 35
- Tabela 4:** Avaliação histológica do tecido renal dos ratos expostos cronicamente ao álcool (ALC), fumaça de cigarro (TAB) ou sua associação (ALTB). n = 8/grupo. Kruskal Wallis + Dunn. $P < 0,05$ apresentado em negrito..... 39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADH – Enzima álcool desidrogenase

ALT – Enzima alanina aminotransferase

ALC – Grupo álcool

ALTB – Grupo álcool e tabaco

AST - Enzima aspartato aminotransferase

CAT – Catalase

CCl₄ – tetracloreto de carbono

CTR – Grupo controle

GSH – Glutathiona peroxidase

IG – Intragástrica (via)

Il-1 – Interleucina 1

Il-6 – Interleucina 6

SOD – Superóxido dismutase

TAB – Grupo tabaco

TNF- α – Fator de necrose tumoral α

RESUMO

Álcool e cigarro são as drogas lícitas mais consumidas no mundo. O uso abusivo tanto do álcool quanto do cigarro está associado à morbidade e mortalidade em função do risco de dependência e danos à saúde humana. Estas drogas de abuso estão associadas a diversas patologias, dentre elas as doenças hepáticas e renais. Apesar de diversos estudos mostrarem os efeitos deletérios do álcool e do cigarro em diferentes tecidos, a literatura é escassa no que se refere aos efeitos da associação dessas duas drogas de abuso. Portanto, nosso objetivo foi avaliar alterações hepáticas e renais em ratos expostos ao álcool, fumaça de cigarro ou sua associação. Ratos Wistar, machos, adultos (~280 g) foram subdivididos em 4 grupos (n = 10/grupo): controle (CTR), administrados com álcool (ALC), expostos à fumaça do cigarro (TAB) ou sua associação (ALTB). Os animais do grupo CTR e do grupo TAB recebiam solução glicosada 8% por via intragástrica (IG); os animais do grupo ALC e ALTb, eram administrados com 2 g/kg (20% p/v) de álcool, diluído em solução glicosada a 3%, também via IG. Todos os grupos foram tratados duas vezes ao dia, por 28 dias. No 29º dia os ratos foram eutanasiados e o sangue troncular coletado para determinação das enzimas alanina e aspartato aminotransferases (AST e ALT), creatinina e ureia. Fígado e rins foram dissecados, pesados e armazenados em solução fixadora para processamento histológico, para posterior avaliação das alterações morfológicas. Peso corporal também foi monitorado ao longo do experimento. Nossos resultados mostraram menor ganho de peso corporal nos animais TAB e ALTb (CTR: $49,0 \pm 3,1$; ALC: $38,0 \pm 4,7$; TAB*: $15,9 \pm 3,2$ e ALTb*: $23,4 \pm 2,6$ g, * $P < 0,001$). O grupo TAB também apresentou menor peso relativo da gordura retroabdominal (-36%) quando comparado ao grupo ALC. Ainda para o grupo TAB observamos redução significativa da enzima ALT ($P = 0,020$). Creatinina estava aumentada no grupo ALTb ($P = 0,021$).

Considerando o efeito dos tratamentos sobre as alterações morfológicas no tecido hepático, observamos aumento de marcadores de necrose para os animais dos grupos ALC, TAB ou ALTB, quando comparados ao CTR. Verificamos também aumento da tumefação para os grupos TAB e ALTB e presença de infiltrado perivascular no grupo ALTB. Em relação as alterações sobre o tecido renal, constatamos a presença de necrose para os grupos ALC, TAB e ALTB quando comparados com o CTR. Relatamos ainda presença de vacuolização citoplasmática no grupo ALTB quando comparado com o grupo ALC. Podemos concluir que a exposição à fumaça de cigarro interfere sobre o ganho de peso corporal e deposição de gordura retroabdominal. Além disso, o uso crônico de doses moderadas de álcool, exposição à fumaça do cigarro ou sua associação provoca necrose hepática e renal. O risco de dano hepático foi maior pelo álcool, enquanto o risco de dano renal foi maior para o cigarro. A associação dessas duas drogas de abuso parece contribuir para aumento de risco de dano renal.

Palavras-chave: etanol, tabaco, fígado, rim, drogas de abuso

ABSTRACT

Alcohol and cigarette are the most consumed illicit drugs in the world. The abusive use of both alcohol and cigarette is associated with morbidity and mortality due to the risk of dependence and harm to human health. These drugs of abuse are associated with various diseases, among them, the liver and kidney diseases. Although several studies have shown the harmful effects of alcohol and cigarette in different tissues, the literature is scarce regarding the effects of the combined use of these two drugs of abuse. Therefore, our objective here was to evaluate the hepatic and renal damage in rats exposed to alcohol, cigarette smoke or their association. Male, adult, Wistar rats (~ 280 g) were divided into 4 groups (n = 10 / group): control (CTR), administered with alcohol (ALC), exposed to the cigarette smoke (TAB), or their association (ALTB). Animals in the CTR group and in the TAB group were administered with a 8% glucose solution, via intragastric (IG); ALC and ALTB groups received 2 g/kg (20% w/v) alcohol, diluted in 3% glucose solution, via IG. All groups were treated twice a day for 28 days. On the 29th day the rats were euthanized and trunk blood was collected for enzymes alanine aminotransferase and aspartate (AST and ALT), creatinine and urea determination. Liver, kidneys and retroabdominal fat were dissected, weighed, and stored in fixative solution for histological processing for further evaluation of the hepatic and renal morphological changes. Body weight was also monitored throughout the experiment. Our results showed lower body weight gain in animals TAB and ALTB than CTR and ALC (CTR: 49.0 ± 3.1 ; ALC: 38.0 ± 4.7 ; TAB *: 15.9 ± 3.2 and ALTB * 23.4 ± 2.6 g, * $P < 0.001$). The TAB group also showed lower relative weight of retroabdominal fat (-36%) compared to the ALC group. Still, for the TAB group we observed a significant decreases from ALT enzyme ($P = 0.020$).

Creatinine was increased in ALTB group ($P = 0.021$). Regarding hepatic morphological changes, we found an increase in necrosis markers from ALC, TAB and ALTB than CTR rats. We also showed increased swelling in the TAB and ALTB groups and perivascular infiltrate in ALTB group. Regarding the changes on renal tissue, we also observed necrosis for all groups. Vacuolization were significant higher in ALTB than ALC group. Thus, we may conclude that cigarette smoke interferes with the body weight gain and retroabdominal fat deposition. Additionally, the chronic use of moderate doses of alcohol, exposure to cigarette smoke or their combined use is damaging to the hepatic and renal tissues. The risk of liver damage was higher by alcohol, while the risk of kidney damage was higher for cigarette smoke. The combination of these two drugs of abuse appears to contribute to increased risk of kidney damage.

Keywords: ethanol, tobacco, liver, kidney, drug abuse

1. INTRODUÇÃO

Álcool e cigarro são as drogas lícitas mais consumidas no mundo, embora existam políticas nacionais e internacionais para a redução do seu consumo. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2014), o uso abusivo de álcool é responsável por mais de 3,3 milhões de mortes anualmente, estando ele associado ao aumento de risco de mais de 60 diferentes tipos de doenças. Ainda mais alarmantes são os resultados para o cigarro. Cerca de 6 milhões de pessoas morrem em consequência do uso crônico dessa droga por ano, projetando-se uma morte a cada 6 segundos (OMS, 2014). Globalmente, 12% de todas as mortes de indivíduos maiores de 30 anos podem ser atribuídas ao cigarro (OMS, 2014). Apesar dessas estatísticas alarmantes, há muito poucos estudos avaliando as consequências do uso associado do álcool e do cigarro.

No Brasil, 53% da população adulta admite beber e desse, 24% bebem de modo frequente e pesado, isto é, consomem mais de 60 g de álcool puro, pelo menos uma vez na semana, os outros 29% bebem com menor frequência e em doses leves a moderadas (beber seguro) (LARANJEIRA *et al.*, 2007).

Levantamento em 27 cidades brasileiras mostrou que a frequência de adultos fumantes em 2013 era de 11,3%, sendo maior no sexo masculino (14,4%) do que no feminino (8,6%). A frequência de fumantes, independentemente do sexo, foi menor entre jovens adultos até 25 anos ou após os 65 anos. Porto Alegre, dentre as capitais estudadas, apresentou a maior prevalência, com 16,5% de fumantes (BRASIL, 2014). Estima-se que, no Brasil, o tabagismo seja responsável por mais de 200.000 mortes/ano (BRASIL, 2014).

Estudos mostram que mais de 90% dos indivíduos dependentes de álcool são fumantes e que alcoolistas “pesados” fumam mais que indivíduos não alcoolistas

(MEYERHOFF *et al.*, 2006). Portanto, a associação dessas duas drogas pode ser ainda mais deletéria à saúde humana e se esta fosse considerada nas estatísticas poderia aumentar ainda mais as projeções de risco de doença e morte.

O alcoolismo é considerado uma doença crônica e, de acordo com a frequência de uso e dose, está associado a doenças hepáticas, cardiovasculares, renais, gastrintestinais e psiquiátricas (SISSON, 2007). Embora doses moderadas de álcool apresentem efeito antioxidante e cardioprotetor (LI E FORSTERMANN, 2012), o uso crônico e excessivo de álcool está associado a efeito tóxico sobre diferentes órgãos e é uma das principais causas de doença hepática (LONGO *et al.*, 2012). Esteatose alcoólica, hepatite alcoólica e cirrose são doenças prevalentes entre alcoolistas “pesados”. Esteatose hepática também é comum entre bebedores compulsivos tipo “binge” além de bebedores crônicos, acometendo mais de 90% dos indivíduos (LONGO *et al.*, 2012). Menor percentagem de bebedores pesados progride para hepatite alcoólica, um estágio anterior ao da cirrose. Estudos mostram que cirrose associada ao consumo excessivo de álcool tem aumentado na última década no Reino Unido e Rússia, mas diminuiu em muitos países desenvolvidos, incluindo os Estados Unidos (LONGO *et al.*, 2012). Embora o álcool apresente efeito hepatotóxico direto, apenas 10 a 20% dos alcoolistas irão desenvolver hepatite alcoólica. A explicação para este aparente paradoxo são as interações complexas de fatores facilitadores e/ou protetores, relacionadas à dose, frequência de consumo, dieta, gênero, predisposição genética, entre outros (LONGO *et al.*, 2012).

Após rápida absorção pelo trato digestório, o álcool é metabolizado pela enzima álcool desidrogenase (ADH) no fígado, transformando-se no acetaldeído, um metabólito inativo, porém tóxico. O acetaldeído, por sua vez, sofre oxidação, produzindo acetato e superóxido. O aumento da atividade metabólica hepática por enzimas do sistema P450

aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, potencializando os efeitos tóxicos do álcool em decorrência do desequilíbrio entre mediadores pró e antioxidantes (SCOTT *et al.*, 2000).

O uso crônico de álcool também está associado a disfunção tubular e insuficiência renal (ADEWALE E IFUDU, 2014). Embora não completamente esclarecidos estudos apontam que o álcool e seu metabólito tóxico, o acetaldeído, promovem dano à membrana celular do néfron, reduzindo a síntese de ácidos graxos poli-insaturados, fosfolipídios e colesterol, por mecanismos inflamatórios e pró-oxidantes (ADEWALE E IFUDU, 2014). Isso resulta em desequilíbrio eletrolítico, com aumento da reabsorção do sódio pelo túbulo proximal e alça de Henle e redução da secreção de potássio (VAMVAKAS *et al.*, 1998; ADEWALE E IFUDU, 2014).

Uma outra droga de abuso que tem impacto negativo sobre a sociedade é o tabaco. O tabagismo, como mencionado, também está associado ao aumento da taxa de morbidade e mortalidade e é uma das principais causas de doença cardiovascular, incluindo infarto do miocárdio e morte súbita, doença cerebrovascular, doença vascular periférica, doença pulmonar obstrutiva crônica e câncer em muitos tecidos, incluindo pulmão, laringe, cavidade oral, esôfago, bexiga, rim, pâncreas e colo do útero (FELDMAN, CHRISTENSEN E SATTERFIELD, 2014). Fumar está associado a risco aumentado de cirrose hepática, independente da ingestão de álcool (DAM *et al.*, 2013). E ainda, fumante ativo e passivo também tem maior chance em desenvolver esteatose hepática não alcoólica (LIU *et al.*, 2013).

Estudos mostram que o cigarro pode impactar a incidência, gravidade e curso clínico de muitos tipos de doenças hepáticas crônicas, incluindo carcinoma hepatocelular, mesmo que a fumaça não entre em contato direto com o fígado (EL-ZAYADI, 2006; ALTAMIRANO E BATALLER, 2010). Como doenças hepáticas

crônicas são comumente associadas a inflamação crônica e estresse oxidativo no parênquima hepático, é possível que os constituintes presentes na fumaça do cigarro sejam responsáveis por estimulação desses fatores de modo indireto.

Fumar também tem um impacto negativo sobre a função renal, sendo um dos mais importantes fatores de risco para câncer e outras patologias (BLACK *et al.*, 1983; Jaimes *et al.*, 2009). Estudos em roedores mostram que a exposição crônica à fumaça do cigarro aumenta fibrose renal após 6 meses de exposição, 2 horas/dia (BOOR *et al.*, 2009). Em seres humanos, fumar aumenta a excreção renal de albumina e promove insuficiência renal, especialmente entre indivíduos hipertensos, idosos ou com doença renal preexistente (ORTH, 2004). O tabagismo é particularmente prejudicial para pacientes transplantados, acelerando também a progressão da doença cardiovascular aterosclerótica (TOZAWA *et al.*, 2002; ORTH, 2004).

Já foram identificadas mais de 4.700 substâncias na fumaça produzida pela queima da folha de tabaco (GEISS E KOTZIAS, 2007). Essas substâncias formam uma mistura complexa, dinâmica e reativa distribuída numa fase gasosa e numa fase particulada. Podem ser encontrados na fase gasosa: monóxido de carbono, amônio, cetonas, formaldeído, acetaldeído e acroleína e na fase particulada: nicotina e alcatrão (GEISS E KOTZIAS, 2007; TALHOUT *et al.*, 2011). O alcatrão concentra pelo menos 43 substâncias carcinogênicas incluindo arsênico, níquel, benzopireno, cádmio e chumbo (TALHOUT *et al.*, 2011). Todos esses constituintes, absorvidos pela via pulmonar, são metabolizados pelo fígado e excretados pelos rins.

Embora se considere os efeitos deletérios do álcool e do tabaco, isoladamente, sobre a saúde humana, pouco se sabe sobre os efeitos de sua associação. Alguns poucos estudos mostram que o risco de câncer de pescoço é 3 vezes maior quando do consumo associado de álcool e tabaco (HASHIBE *et al.*, 2009; LEE E HASHIBE, 2014).

Também a exposição crônica à fumaça de cigarro, concomitante à administração de álcool, em camundongos aumenta em 10 vezes o risco de dano hepático, representado por esteatose hepática, necrose e vacuolização (BAILEY *et al.*, 2009). No entanto, efeito da associação de álcool e tabaco sobre o rim são desconhecidos.

Os danos globais produzidos por essas duas substâncias são explicados pelo seu efeito direto sobre a célula, no caso do álcool, ou indiretamente, pela presença de substâncias tóxicas, provenientes do metabolismo do álcool no organismo, ou da inalação dos constituintes gasosos e particulados presentes na fumaça do cigarro (NEIMAN, 1998; DAS E VASUDEVAN, 2007; STORR *et al.*, 2010). Um estudo mostra que a função renal está diminuída, evidenciada pela redução do volume urinário, em ratos administrados cronicamente ao álcool e à nicotina (COOPER, 2007), porém não há estudos avaliando o efeito da associação entre álcool e fumaça do cigarro.

Marcadores bioquímicos plasmáticos são úteis para avaliar dano tecidual. Variações na concentração de enzimas como a aspartato e a alanina aminotransferases (AST e ALT) são rotineiramente utilizadas para avaliação de processos infecciosos, bem como lesão hepática e cardíaca, embora estejam amplamente distribuídas em outros tecidos como rins, pâncreas, músculo esquelético, entre outros. Enquanto a ALT é encontrada principalmente no citoplasma, a AST também está expressa nas mitocôndrias. Quando ocorre uma ruptura da membrana plasmática do hepatócito, as concentrações séricas destas duas enzimas se elevam, indicando dano nesse tecido (DEVARAJ *et al.*, 2011).

Enquanto AST e ALT são indicadores de dano hepático, ureia e creatinina são indicadores de função renal. Uso crônico de álcool ou tabaco, respeitados parâmetros como tempo e frequência de uso, doenças cardiovasculares associadas, idade, genética, entre outros, aumenta a concentração desses marcadores bioquímicos, revelando

potencial dano hepático e renal (CHAN-YEUNG *et al.*, 1981). Em alcoolistas, o aumento da AST e da ALT precedem aumento de creatinina e ureia, indicando que alterações da creatinina e ureia apresentam relação direta com a frequência diária e tempo de uso ao longo da vida, estando ainda mais elevada em usuários “pesados” (MAJUMDAR *et al.*, 1982; JANG *et al.*, 2012). Em tabagistas, dano renal com proteinúria e microalbuminúria, são acompanhadas pelo aumento de ureia e creatina plasmática (PINTO-SIETSMA *et al.*, 2000; TOZAWA *et al.*, 2002; ORTH, 2004). Dano renal em fumantes está associado não apenas a afeito nefrotóxico, mas também ao aumento da pressão arterial e intraglomerular aguda e crônica, associadas a disfunção das células endoteliais renais (ORTH, 2004). Disfunção renal está intimamente relacionada com tempo de uso e número de cigarros fumados por dia (TYLICKI *et al.*, 2006).

Além desses marcadores bioquímicos de dano celular, é possível observar lesão através de alterações na estrutura celular hepática e renal. Essa observação é realizada através da histologia, onde se visualiza diversos marcadores como, por exemplo, vacuolização citoplasmática, presença de infiltrado inflamatório e até mesmo áreas de necrose ou tecido em fase de esteatose hepática. Segundo a Organização Mundial da Saúde, só no Brasil, a esteatose hepática gera cerca de 34 óbitos/100000 habitantes (OMS, 2014).

2. HIPÓTESE

Uma vez que álcool e tabaco, isoladamente, promovem dano tecidual, nós propomos que a exposição concomitante a essas duas drogas de abuso potencializa esse dano, determinado por alterações estruturais no tecido hepático e renal e confirmados por marcadores plasmáticos de dano tecidual.

3. OBJETIVOS

3.1 Gerais

Avaliar alterações hepáticas e renais em ratos expostos ao álcool, fumaça de cigarro ou sua associação.

3.2 Específicos

- Avaliar alterações morfológicas no fígado e rins de ratos expostos cronicamente ao álcool, fumaça do cigarro ou à sua associação;
- Avaliar alterações de marcadores bioquímicos de dano hepático (AST e ALT) e renal (ureia e creatinina) em ratos expostos cronicamente ao álcool, fumaça do cigarro ou à sua associação;
- Determinar variações de parâmetros morfométricos como peso corporal, índice de Lee, peso de tecidos como fígado, rins e gordura retroabdominal, em ratos expostos cronicamente ao álcool, fumaça de cigarro ou à sua associação.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados 40 ratos Wistar, machos, adultos, com peso corporal entre 290 e 310g, provenientes do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL), da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e alojados no Biotério Setorial do Departamento de Farmacologia. Os animais foram agrupados (n = 5) em caixas de polipropileno (33 x 17 x 40 cm), sob condições ideais de iluminação (ciclo claro-escuro de 12 horas: 7:00-19:00h), temperatura ($22 \pm 2^\circ \text{C}$) e umidade (55%). Durante todo o experimento, os animais tinham livre acesso à água e alimento e eram pesados a cada 2 ou 3 dias para ajuste das doses. O projeto foi aprovado pelo CEU/UFRGS sob o número 25022.

4.2 Soluções e exposição à fumaça do cigarro

A solução alcoólica foi preparada com etanol (99%, Merck, São Paulo, Br) na concentração de 20% (m/v) diluído em solução glicosada a 3% ou 8% e administrado via intragástrica na concentração de 2 g/kg. Os animais controle recebiam apenas solução glicosada no mesmo volume de 10 mL/kg administrado aos ratos tratados com solução alcoólica. As soluções eram preparadas 2 vezes por semana e armazenadas sob refrigeração, em frasco âmbar, bem fechado. A adição de glicose à solução alcoólica se faz necessário para ajuste calórico e aumento da palatabilidade da solução alcoólica. Em trabalho prévio em nosso laboratório observamos que essa concentração de glicose não é suficiente para alterar comportamento exploratório ou alimentar em ratos (dados em preparação para publicação). A dose de 2g/kg foi definida com base em outros estudos (GENTRY-NIELSEN *et al.*, 2004; WISNIEWSKA *et al.*, 2013) e resultados anteriores

de nosso laboratório (WIECZOREK E GOMEZ, 2013). A opção pela administração do álcool por via intragástrica ao invés de administração na água de beber ou na dieta se justifica porque na água ou na dieta não há controle sobre o consumo individual de cada animal (WIECZOREK E GOMEZ, 2013). O número de animais foi calculado com base em estudos anteriores utilizando-se o número mínimo de animais necessários para obtenção de resultado estatístico (WIECZOREK E GOMEZ, 2013).

A exposição à fumaça do cigarro ocorreu em câmaras de vidro, hermeticamente fechadas (50×30×30 cm) (Figura 1), com fluxo de ar de 10 L/min, mantido constante por bomba de vácuo (PEREIRA *et al.*, 2007). Nessas câmaras, os animais eram agrupados em número de 5 e expostos à fumaça de cigarro comercial ou ao ar ambiente, de acordo com o grupo ao qual pertenciam. Segundo o fabricante, cada cigarro contém 0,8 mg de nicotina.

4.3 Procedimento experimental

Inicialmente os animais foram subdivididos em 4 grupos (n = 10/grupo): controle (CTR), administrados com álcool (ALC), expostos à fumaça do cigarro (TAB) ou sua associação (ALTB). Os animais do grupo CTR e do grupo TAB recebiam solução glicosada 8% por via intragástrica (IG) no volume de 10 mL/kg; os animais do grupo ALC e ALTb, eram administrados com 2 g/kg (20% p/v) de álcool, diluído em solução glicosada a 3%, também via IG. Logo após essa administração, os animais eram colocados em câmaras de vidro herméticas contendo um orifício de entrada e um de saída, com ventilação controlada por uma bomba de vácuo (Figura 1). Para as câmaras dos animais dos grupos CTR e ALC, se fazia circular ar ambiente, enquanto que para os grupos TAB e ALTb se fazia circular fumaça de cigarro.



Figura 1: Câmaras herméticas para exposição à fumaça do cigarro ou ar ambiental

Pela manhã, as 9:00 h, após administração de solução glicosada ou álcool, os animais dos grupos TAB e ALTB eram expostos à fumaça produzida pela queima de 6 cigarros, com intervalo de 10 minutos entre eles (Esquema 1). Esse procedimento perdurava por 2 h e se repetia à tarde, iniciando as 14:00 h, com intervalo mínimo de 2 h entre as exposições.

Esquema 1: Distribuição da exposição temporal à fumaça do cigarro em cada turno.

Glicosada, IG ou
Álcool 2g/kg, IG

2 h

fumaça	intervalo	fumaça	intervalo	fumaça	intervalo	fumaça	intervalo	fumaça	intervalo	fumaça	intervalo
10 min	10 min										

No 29º dia os ratos foram eutanasiados em guilhotina e o sangue troncular foi coletado. Após a coleta de sangue, fígado e rins foram dissecados, pesados e armazenados em solução fixadora (paraformaldeído 4%) para posterior processamento

histológico. O sangue coletado foi centrifugado (3500xg, 10 min) centrífuga Centribio® e o soro foi fracionado e armazenado à -80° C, para posterior determinação dos parâmetros bioquímicos (transaminases, ureia e creatinina).

4.4 Análises morfológicas

Prévio ao armazenamento em solução de paraformaldeído 4%, fígado e rim foram cortados em pequenas peças para permitir melhor distribuição do fixador. Após 48 horas, as peças foram colocadas em potes com álcool a 70% onde permaneceram por 4 dias. Foram então processadas de acordo com a técnica histológica convencional, isto é, os tecidos foram inicialmente desidratados com diferentes concentrações de soluções alcoólicas, passaram por clareamento com xilol e foram então impregnados com parafina, procedimento realizado com equipamento histotécnico automatizado. Posteriormente, os órgãos foram incluídos em parafina contendo polímeros plásticos (Paraplast®, Sigma Aldrich, São Paulo, SP). Os tecidos foram então seccionados com micrótomo em fatias de 4 µm de espessura, com intervalo de 50 µm entre os cortes, sendo dispostos 4 cortes por lâmina. Cada lâmina foi corada com hematoxilina e eosina para avaliação das alterações morfológicas produzidas pela exposição crônica ao álcool, fumaça do cigarro ou sua associação. As alterações foram identificadas em microscópio ótico, com aumento de 100X e 400X, por avaliador treinado e cegado para os grupos. Foram observados e quantificados 10 campos de cada corte (60 campos por animal) pela atribuição de escores que foi padronizado de 0 até 3, sendo 0: ausência de alteração, 1: leve alteração, 2: alteração moderada e 3: alteração severa. Ao final da análise, determinou-se a moda do escore de cada animal para os diferentes parâmetros morfológicos. Para o tecido hepático foram consideradas alterações como: presença de células inflamatórias, degeneração hidrópica, tumefação celular, alargamento sinusóide,

congestão vascular, infiltrado perivascular e necrose (KUEHNEL, 2003; PIRES, TRAVASSOS E GARTNER, 2004). Para o rim, foram considerados os seguintes parâmetros: espaço de filtração aumentado ou reduzido, tumefação cortical e medular, congestão vascular cortical, vacuolização citoplasmática, presença de células inflamatórias, dilatação do túbulo contorcido distal, presença de material hialino e necrose (KUEHNEL, 2003; PIRES, TRAVASSOS E GARTNER, 2004).

4.5 Determinação de medidas ponderais

Durante a realização do experimento, os animais foram pesados duas a três vezes por semana não apenas para ajuste de dose, mas também para a avaliação dos tratamentos sobre a variação temporal de peso corporal. Ao final do experimento, além do peso corporal, foi mensurada a estatura do animal (comprimento naso-anal) para a determinação do índice de massa corporal para roedores (Índice de Lee = raiz cúbica do peso corporal (g)/ comprimento naso-anal (cm) x 10 (BERNARDIS E PATTERSON, 1968). Como mencionado anteriormente os tecidos hepático (total) e renal (apenas o rim direito) foram pesados após a eutanásia para determinação de alterações do peso absoluto e do peso relativo dos órgãos, sendo o peso relativo considerado pela relação peso do órgão, dividido pelo peso corporal, multiplicado por 100.

4.6 Avaliação de parâmetros bioquímicos

As concentrações séricas da aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), bem como creatinina e ureia foram determinadas por método colorimétrico ou enzimático em aparelho automatizado (CT 600 I, Labimbráz, Buenos Aires, Argentina), utilizando-se kits comerciais (Wiener, Buenos Aires, Argentina).

4.7 Análise estatística

Parâmetros bioquímicos, peso absoluto e relativo dos órgãos, bem como peso inicial e final e ganho ponderal de peso foram avaliados por análise de variância (ANOVA) de duas vias, considerando-se como fatores, o tratamento com álcool e a exposição à fumaça do cigarro. Para avaliação das variações semanais de peso foi utilizada ANOVA de medidas repetidas. Ambos os testes foram seguidos do teste de Tukey para determinação da diferença entre os grupos. Para análise das alterações morfológicas, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, considerando-se a moda do escore de cada animal para os diferentes parâmetros morfológicos. Sucedeu-se a esse teste o teste de Dunn para identificação da diferença entre os grupos. Os resultados foram representados como média \pm erro padrão, sendo considerados significativos quando o valor de *P* era menor do que 0,05. O software utilizado para as análises foi o Sigma Stat (Jandel Cientific Co., San Jose, CA – 11.0).

5. RESULTADOS

5.1 Variação de peso corporal

Para avaliar a interferência da exposição crônica ao álcool, fumaça do cigarro ou sua associação sobre o peso corporal dos animais ao longo do experimento, foram feitas pesagens periódicas. Aumento de peso semanal foi avaliado por ANOVA de medidas repetidas ao longo das quatro semanas de exposição. Observamos que a exposição à fumaça do cigarro reduziu de modo significativo o incremento de peso dos animais ($F_{(3,88)} = 4,46$, $P = 0,011$; Figura 1). Embora também se observou um menor incremento de peso para os animais tratados com a associação ALTB, não observamos diferença significativa desse grupo quando comparados aos grupos ALC e CTR.

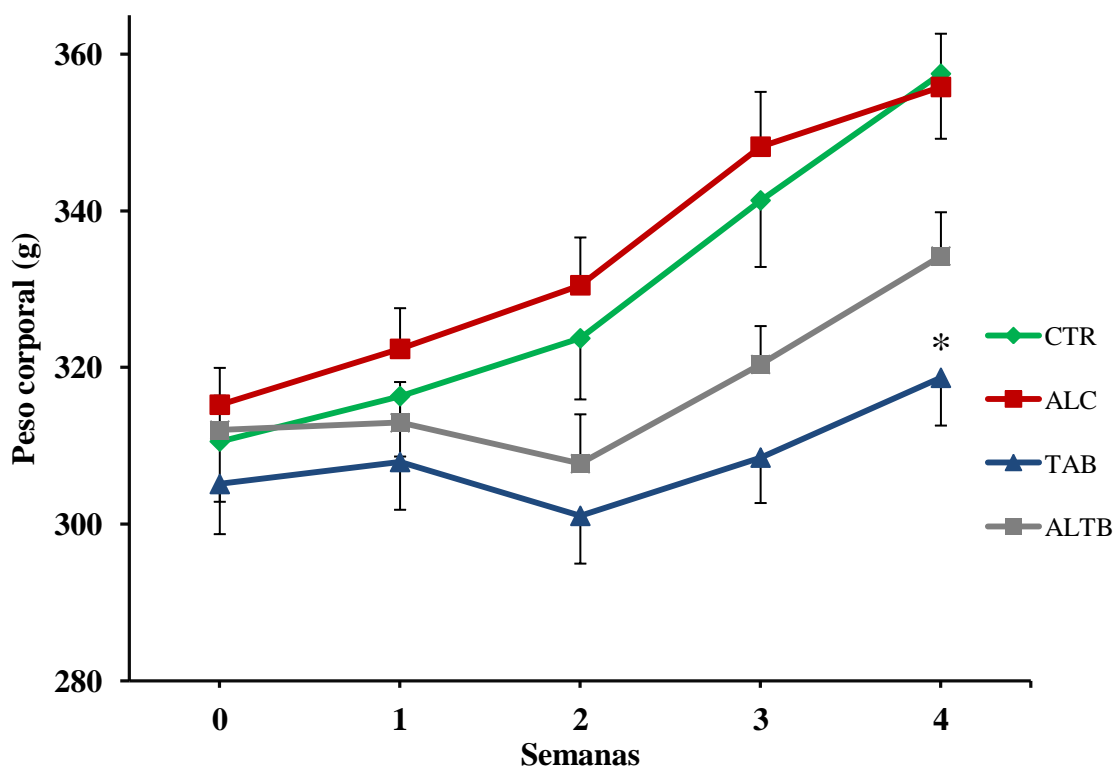


Figura 2: Ganho de peso semanal (g) dos ratos expostos ao álcool (ALC), fumaça de cigarro (TAB) ou sua associação (ALTB). $n = 10$ /grupo; ANOVA-duas vias de medidas repetidas; resultados expressos como média \pm erro padrão; * diferente do grupo CTR.

Considerando-se apenas os pesos inicial e final, observamos que o aumento de peso para os grupos CTR e ALC foi de aproximadamente 15% ($P < 0,001$, Tabela 1). Os grupos TAB e ALTB aumentaram apenas 7% e 8% do peso inicial, respectivamente ($P < 0,001$). Portanto, os ratos do grupo TAB tiveram um ganho de peso cerca de 3 vezes menor quando comparado com o grupo CTR.

No entanto, considerando o índice de Lee, que avalia o peso corporal em relação à estatura, similar ao índice de massa corporal (IMC) em humanos, não observamos diferença significativa entre os grupos (Tabela 1).

Tabela 1: Determinação de peso corporal inicial e final, variação de peso total e ponderal, e índice de Lee dos ratos expostos ao álcool (ALC), fumaça de cigarro (TAB) ou sua associação (ALTB).

	Peso corpóreo inicial (g)	Peso corpóreo final (g)	Ganho de peso (g)	Ganho peso ponderal (%)	Índice de Lee
CTR	310,55±7,73	371,37±4,88	49,00±3,06	16,94±1,13	3,07±0,02
ALC	315,25±4,75	340,44±12,08	38,00±4,66	15,33±0,60	3,06±0,03
TAB	305,12±6,46	321,00±7,93*	15,87±3,20#	6,65±1,16#	3,03±0,03
ALTB	312,00±4,41	337,66±5,99*	23,44±2,65#	8,20±0,90#	3,10±0,02

Valores representados em média ± erro padrão (n=9-10/grupo). ANOVA de duas vias + Tukey. *diferente do CTR; # diferente do CTR e ALC.

5.2 Variação de peso de diferentes tecidos corporais

Ao final do experimento, também avaliamos o efeito da exposição crônica ao álcool e à fumaça do cigarro sobre o peso do fígado, rins e gordura retroabdominal. Encontramos redução significativa no peso absoluto do peso do fígado ($F_{(1,38)} = 3,17$; $P = 0,038$) e da gordura retroabdominal ($F_{(3,38)} = 4,08$; $P = 0,015$), porém sem diferença para o grupo ALTB (Tabela 2). A redução do peso absoluto do rim foi observado para qualquer grupo (ALC, TAB e ALTB, $F_{(3,38)} = 5,35$; $P = 0,004$, Tabela 2).

No entanto, quando o peso do órgão foi considerado em relação ao peso corporal, não observamos diferenças entre os grupos, exceto para o peso relativo da gordura retroabdominal, para a qual observamos uma redução significativa do grupo TAB comparado ao grupo ALC ($F_{(3, 38)} = 3,836$ $P = 0,019$; Tabela 2).

Tabela 2: Peso absoluto (g) e relativo (g/100g) do fígado, rim e gordura retroabdominal dos ratos expostos ao álcool (ALC), fumaça de cigarro (TAB) ou sua associação (ALTB).

Grupo	Peso do Fígado		Peso do Rim		Peso da gordura retroabdominal	
	Absoluto (g)	Relativo (g/100g)	Absoluto (g)	Relativo (g/100g)	Absoluto (g)	Relativo (g/100g)
CTR	11,88±0,31	3,20±0,09	1,33±0,04	0,35±0,008	4,48±0,38	1,23±0,10
ALC	10,96±0,64	3,20±0,10	1,20±0,03*	0,35±0,008	4,81±0,50	1,37±0,10
TAB	10,05±0,35*	3,12±0,05	1,19±0,01*	0,37±0,007	2,90±0,45#	0,88±0,13#
ALTB	11,24±0,22	3,33±0,06	1,17±0,02*	0,35±0,010	3,61±0,33	1,06±0,08

Valores representados em média ± erro padrão (n=9-10/grupo). ANOVA de duas vias + Tukey. * diferente do CTR; # diferente do ALC.

5.3 Alterações bioquímicas

Com o objetivo de avaliar dano hepático pelo uso de álcool, fumaça de cigarro ou sua associação investigamos alterações nas enzimas AST e ALT, dois marcadores de disfunção hepática. Sob nossas condições experimentais, não observamos alteração da concentração sérica da enzima AST ($F_{(3,31)} = 2,62$; $P = 0,071$; Figura 4).

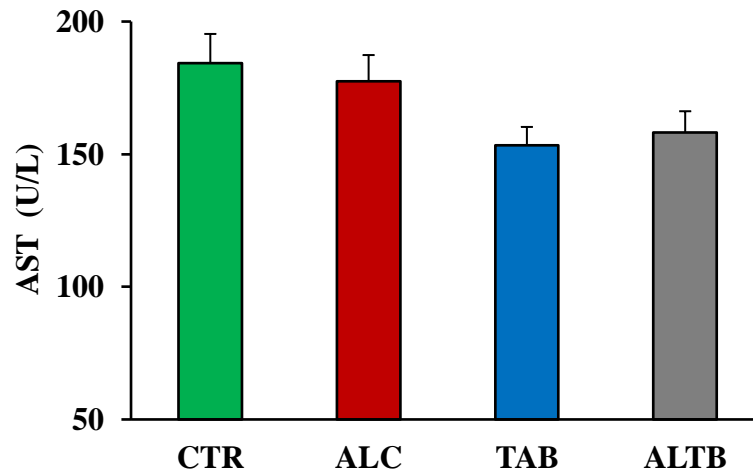


Figura 3: Efeito da administração crônica de álcool (ALC), exposição à fumaça do cigarro (TAB) ou sua associação (ALTB) sobre a concentração da enzima aspartato aminotransferase (AST) no soro de ratos. ANOVA-2 via + Tukey. Média \pm erro padrão (n= 7-9/grupo).

No entanto, para a enzima ALT, observamos uma redução significativa no grupo TAB em relação ao grupo CTR ($F_{(3,32)} = 3,85$; $P = 0,020$) (Figura 5).

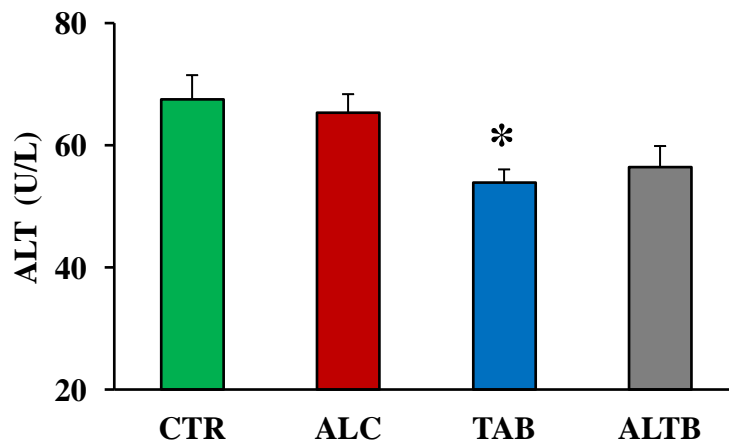


Figura 4: Efeito da administração crônica de álcool (ALC), exposição à fumaça do cigarro (TAB) ou sua associação (ALTB) sobre a concentração de enzima alanina aminotransferase (ALT) no soro de ratos. ANOVA-2 via + Tukey. Média \pm erro padrão (n = 7-8/grupo). * diferença significativa em relação ao CTR ($P = 0,020$).

Com o objetivo de avaliar dano renal foram determinadas as concentrações de creatinina e ureia, dois biomarcadores da função renal. Nossos resultados não mostraram alteração na concentração de ureia (Figura 6). Porém, observamos aumento significativo da concentração de creatinina do grupo ALTB comparado com o grupo ALC (Figura 7).

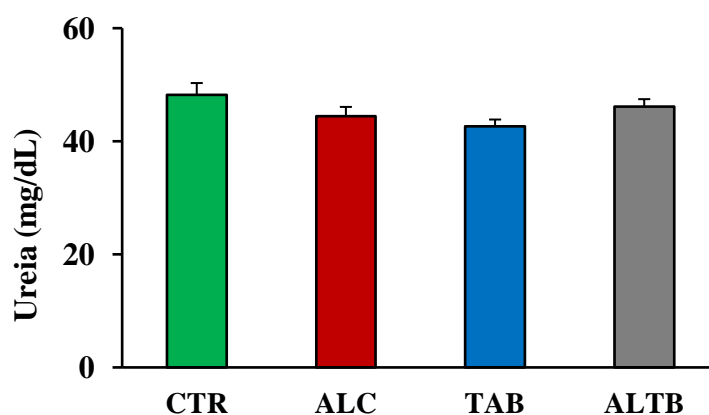


Figura 5: Efeito da administração crônica de álcool (ALC), exposição à fumaça do cigarro (TAB) ou a sua associação (ALTB) sobre os níveis séricos de Ureia, em ratos. ANOVA-2 vias + Tukey. Média \pm erro padrão (n=8/grupo).

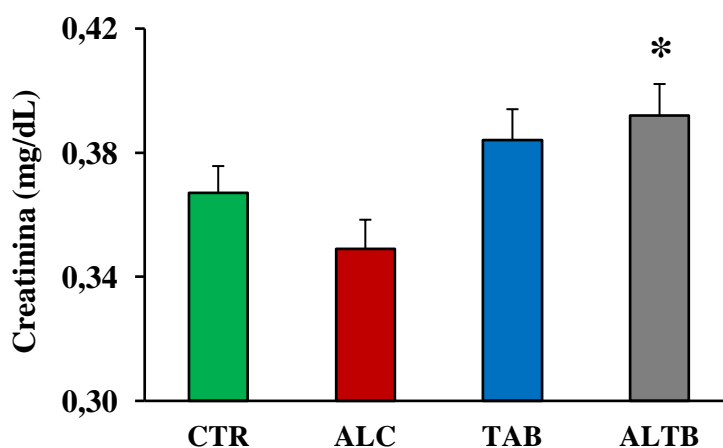


Figura 6: Efeito da administração crônica de álcool (ALC), exposição à fumaça do cigarro (TAB) ou a sua associação (ALTB) sobre a concentração sérica de creatinina, em ratos. ANOVA-2 vias + Tukey. Média \pm erro padrão (n=8/grupo). * diferença significativa em relação ao ALC ($P=0,021$).

5.4 Alterações morfológicas

Considerando os efeitos do álcool, fumaça de cigarro e sua associação sobre diferentes parâmetros morfológicos nos tecidos hepático e renal, observamos aumento de marcadores de necrose para os animais dos grupos ALC, TAB ou ALTB no tecido hepático, quando comparados ao CTR (Figura 7A-D).

Teste de Kruskal-Wallis identificou aumento de tumefação nos grupos TAB e associação ALTB quando comparado ao CTR ($P = 0,031$). Grau de severidade moderado (escore 2) a severo (escore 3) foi observado apenas no grupo ALC.

Associação ALTB ($P = 0,005$) também foi determinante para o aparecimento de infiltrado inflamatório no tecido hepático dos animais (Figura 7A-D). Para os demais parâmetros não observamos diferença significativa.

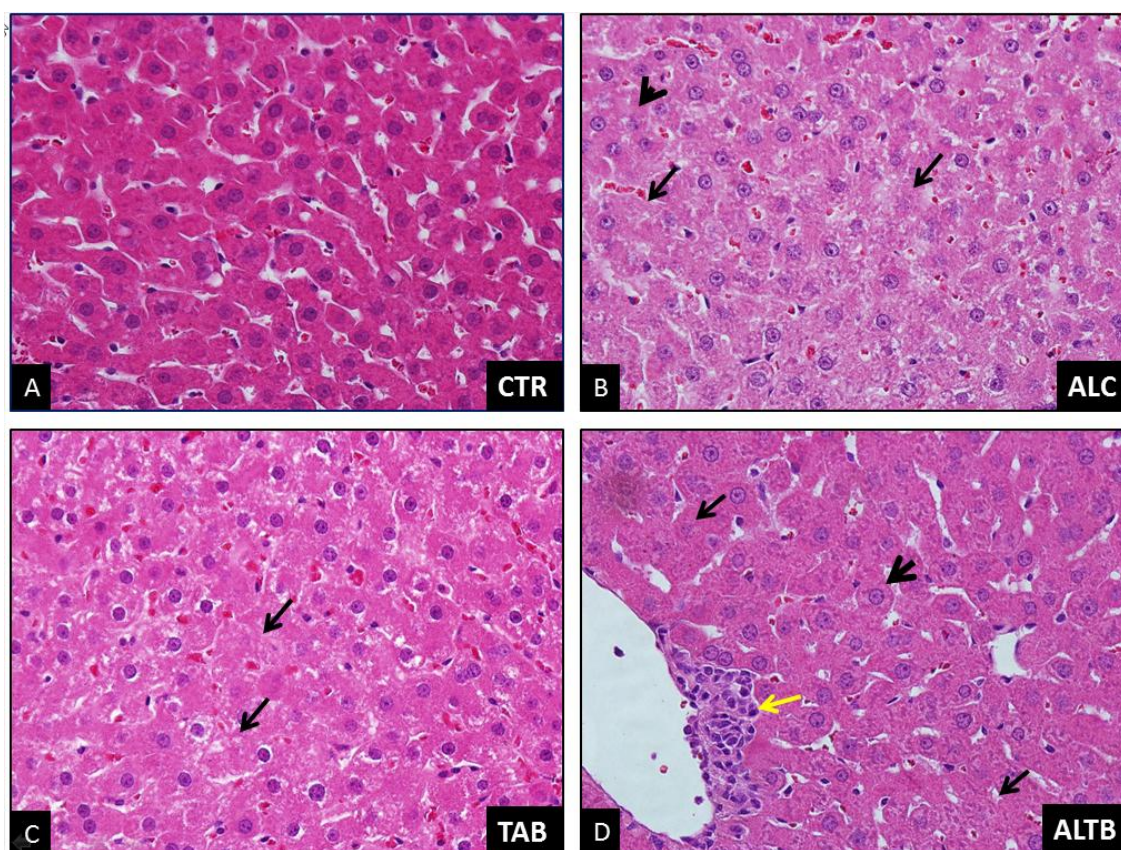


Figura 7: Efeito da administração crônica de álcool (ALC), exposição à fumaça do cigarro (TAB) ou a sua associação (ALTB) sobre o tecido hepático. Coloração: hematoxilina – eosina. Aumento 400X. **A:** grupo CTR, mostrando ausência de

alteração histológica. **B:** grupo ALC, mostrando áreas de necrose (setas pretas) e tumefação celular (cabeça da seta). **C:** grupo TAB, mostrando áreas de necrose (setas pretas) **D:** grupo ALTB, mostrando áreas de necrose (setas pretas), células em estado de tumefação (cabeça da seta) e infiltrado inflamatório perivascular (setas amarelas).

Conforme descrito na metodologia, as alterações morfológicas foram quantificadas de acordo com a intensidade, considerando-se escores que variavam de ausente (0), leve (1), moderado (2) e severo (3). Com o objetivo de explorar um pouco mais nossos resultados, apresentamos na Tabela 3 o escore atribuído aos diferentes grupos de animais. Nela, observamos que mesmo os ratos do grupo CTR apresentavam algum grau de alteração morfológica no tecido hepático, decorrente de processos fisiológicos naturais.

Tabela 3: Avaliação histológica do tecido hepático de ratos expostos cronicamente ao álcool (ALC), fumaça de cigarro (TAB) ou sua associação (ALTB). n = 8/grupo. Kruskal-Wallis + Dunn. $P < 0,05$ apresentado em negrito.

Parâmetros	CTR				ALC				TAB				ALTB				P
	Intensidade																
	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	
Células inflamatórias	0	2	6	0	0	0	7	1	0	0	8	0	0	0	8	0	0,101
Degeneração hidrópica	7	1	0	0	5	1	1	1	4	4	0	0	5	1	1	1	0,489
Tumefação Celular	6	2	0	0	2	4	1	1	1	7	0	0	1	7	0	0	0,031a
Alargamento sinusoides	4	4	0	0	3	4	1	0	5	3	0	0	5	2	0	1	0,712
Congestão vascular	2	6	0	0	0	6	2	0	0	8	0	0	0	7	1	0	0,079
Infiltrado perivascular	2	5	1	0	0	4	4	0	1	4	3	0	0	1	6	1	0,014b
Necrose	2	5	1	0	0	2	4	2	0	1	6	1	0	2	5	1	0,013c

Escores: 0 = ausência; 1 = leve; 2 = moderado; 3 = severo. **a:** TAB e ALTB diferentes de CTR; **b:** ALTB diferente do CTR; **c:** todos são diferentes do CTR.

Embora nenhum animal do grupo CTR tenha apresentado escore 3 para qualquer das alterações estudadas, 6 deles apresentaram células inflamatórias, um apresentou infiltrado perivascular e outro apresentou necrose. Do total de animais do grupo CTR, esse número representa 15% de chance de apresentar alteração morfológica com escore moderado. No entanto, quando consideramos o número de indivíduos expostos cronicamente à fumaça do cigarro, observamos que esse risco duplica, isto é, 30% dos indivíduos do grupo TAB apresentam escore entre moderado e severo. Para os grupos ALC e ALTB, esse risco triplica, com 45% desses animais apresentando escores entre moderado e severo. Essas diferenças foram mais marcantes para as alterações de necrose, tumefação e infiltrado perivascular. Para esse último parâmetro, em particular, observamos que apenas um animal do grupo CTR apresentava escore 2, enquanto que para os grupos ALC e TAB, 4 e 3 animais apresentavam esse mesmo escore, respectivamente. Já no grupo ALTB, 6 animais apresentavam grau de dano moderado e 1 apresentava grau severo, indicando maior aparecimento de infiltrado perivascular no grupo associação ALTB.

Também com respeito a tabela acima, considerando o parâmetro de necrose, apenas 1 animal do grupo TAB e 1 do grupo ALTB apresentaram necrose severa, comparados a 2 animais do grupo ALC, sugerindo maior dano hepático produzido pelo álcool.

Ainda em relação ao tecido hepático, observamos a ocorrência de um quadro característico de desenvolvimento de esteatose hepática em dois animais do grupo ALC (Figura 8).

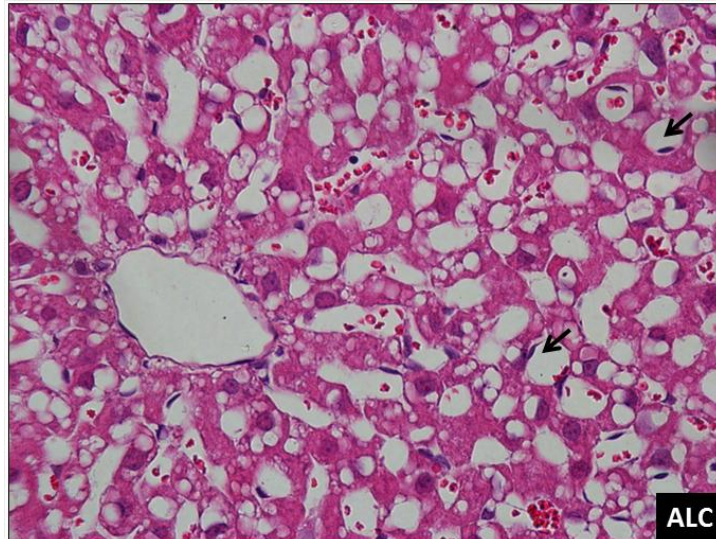


Figura 8: Fotomicrografia hepática de animal do grupo ALC. Alteração hepática sugestiva de esteatose. Vacúolos lipídicos ocupam a maior parte do citoplasma dos hepatócitos, que empurram o núcleo e as demais organelas para a periferia da célula (setas pretas). Aumento 400x.

O mesmo tipo de análise foi empregado para avaliar o efeito do álcool, fumaça do cigarro ou sua associação sobre alterações morfológicas no tecido renal, embora os parâmetros morfológicos para esse tecido sejam diferentes. Para esse órgão, observamos que a presença de vacuolização citoplasmática foi maior no grupo associação ALTB quando comparado ao grupo ALC ($P = 0,031$; Figura 9A-D). Necrose foi maior para os grupos ALC, TAB e ALTB quando comparados ao grupo CTR ($P_{ALC} = 0,028$, $P_{TBC} = 0,010$, $P_{ALTB} = 0,001$). Particularmente para esse parâmetro, o grupo ALTB ($P = 0,044$) apresentou maior escore que aquele do grupo ALC, indicando risco aumentado pela associação (Figura 9A-B).

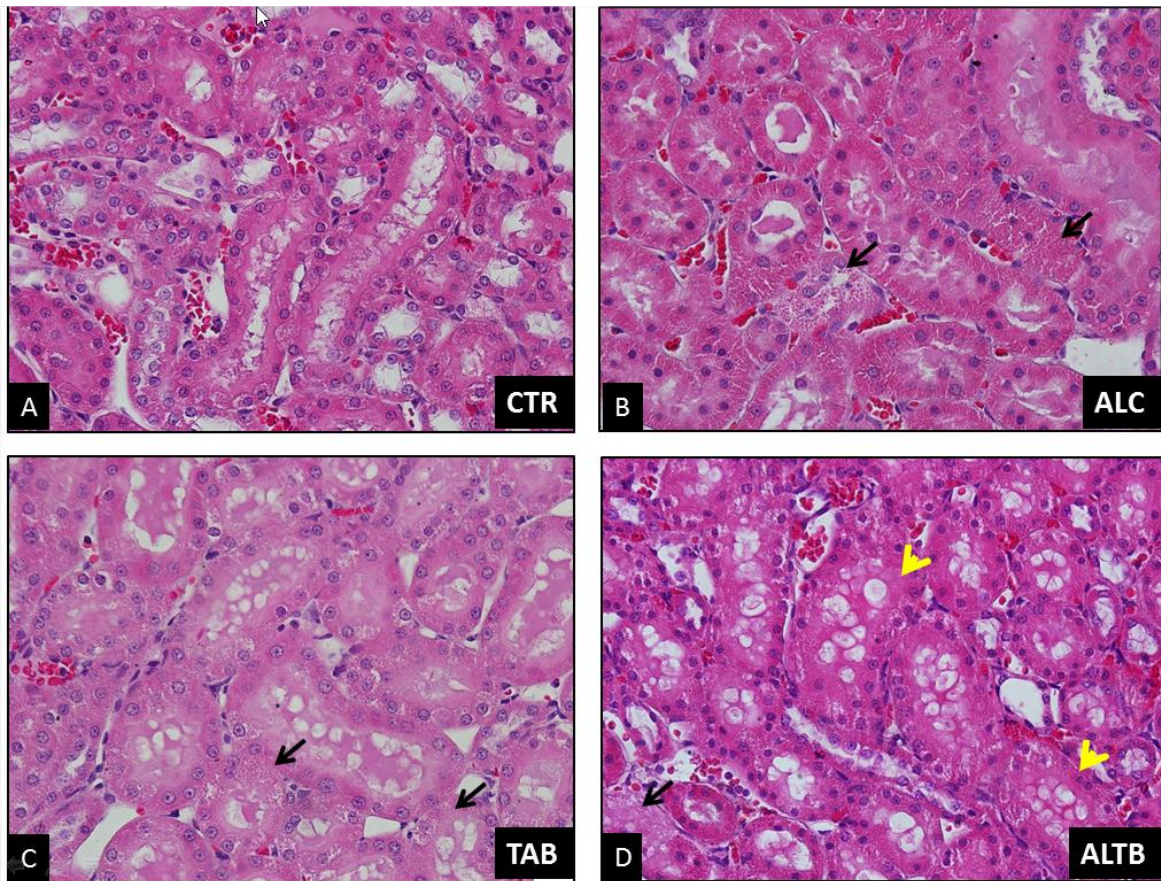


Figura 9: Efeito da administração crônica de álcool (ALC), exposição à fumaça do cigarro (TAB) ou a sua associação (ALTB) sobre parâmetros morfológicos do tecido renal. Coloração: hematoxilina – eosina. Aumento 400x. **A:** grupo CTR, mostrando ausência de alteração histológica. **B:** grupo ALC, mostrando áreas de necrose (setas pretas). **C:** grupo TAB, mostrando áreas de necrose (setas pretas). **D:** grupo ALTB, mostrando áreas de necrose (seta preta) e vacuolização (seta amarela).

Também para o tecido renal, análise global de todos os parâmetros analisados apresentados na Tabela 4, observamos que, mesmo sem intervenção, o grupo CTR apresentou 7,5% de chance de apresentar dano com grau moderado a severo. Porém, esse escore foi muito maior para os grupos ALC, TAB, ALTB. No grupo ALC o número de ratos que apresentaram esses escores subiu para 17,5%, enquanto que para os grupos TAB e associação, esse aumento foi de 21% e 30%, respectivamente. Considerando esses valores como proporção de risco, temos que a exposição ao álcool

aumenta em cerca de 2 vezes o risco de dano renal, enquanto TAB aumenta cerca de 3 vezes e a associação ALTB aumenta em 4 vezes o risco. Também aqui, considerando apenas a coluna do escore 3 (dano severo), observamos que a fumaça do cigarro duplicou o risco de dano renal.

Tabela 4: Avaliação histológica do tecido renal dos ratos expostos cronicamente ao álcool (ALC), fumaça de cigarro (TAB) ou sua associação (ALTB). n = 8/grupo. Kruskal Wallis + Dunn. $P < 0,05$ apresentado em negrito.

Parâmetros	CTR				ALC				TAB				ALTB				P
	Intensidade																
	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	
Espaço de filtração aumentado	7	1	0	0	8	0	0	0	6	3	0	0	5	2	1	1	0,075
Espaço de filtração reduzido	5	1	1	1	3	5	0	0	6	1	2	0	7	2	0	0	0,637
Tumefação celular cortical	6	2	0	0	4	4	0	0	7	2	0	0	4	4	1	0	0,277
Tumefação celular medular	8	0	0	0	7	1	0	0	9	0	0	0	8	1	0	0	0,559
Congestão vascular cortical	7	1	0	0	0	5	3	0	0	7	2	0	0	4	5	0	0,421
Vacuolização citoplasmática	5	2	1	0	6	2	0	0	5	3	1	0	2	4	3	0	0,05a
Células inflamatórias	0	8	0	0	0	6	2	0	0	8	1	0	0	6	3	0	0,471
Dilatação túbulo contorcido distal	8	0	0	0	7	1	0	0	9	0	0	0	8	0	1	0	0,558
Material hialino	1	5	2	0	0	4	3	1	0	5	4	0	5	4	0	0	0,57
Necrose	2	5	1	0	0	3	5	0	0	2	5	2	0	1	7	1	0,003b

Escores: 0 = ausência; 1 = leve; 2 = moderado; 3 = severo **a:** ALTB diferente de ALC;
b: Todos os grupos diferentes do CTR.

6. DISCUSSÃO

6.1 Efeitos do álcool, cigarro e sua associação sobre variações de peso

No decorrer do nosso experimento avaliamos o ganho de peso dos animais expostos ao álcool, fumaça de cigarro ou a sua associação. Para esse parâmetro, ao final da quarta semana, observamos menor ganho de peso nos animais do grupo TAB. Esses resultados estão de acordo com o observado por Dundar e col, 2004, após expor ratos à fumaça de cigarro por 5 dias na semana, por 12 semanas (DUNDAR, KOCAK E CULHACI, 2004). Menor ganho corporal também foi observado em ratos expostos a fumaça de 20 cigarros/dia, 5 dias por semana, durante 8 semanas (ESQUIVEL *et al.*, 2014).

É possível que o menor ganho de peso nos ratos do grupo TAB e em menor proporção nos ratos do grupo associação ALTB, esteja relacionado com o aumento da taxa metabólica basal decorrente da necessidade do organismo de detoxificar mais de 4.000 substâncias presentes na fumaça do cigarro (JENSEN ET AL., 1995; FILOZOF, FERNANDEZ PINILLA E FERNANDEZ-CRUZ, 2004; CHEN *et al.*, 2005). Também a nicotina, responsável pela dependência química do cigarro, promove redução de peso corporal em humanos e roedores (FILOZOF, FERNANDEZ PINILLA E FERNANDEZ-CRUZ, 2004; CHEN *et al.*, 2005). Evidências sugerem que a nicotina atue no sistema nervoso central, regulando o metabolismo energético por interferência direta sobre o hipotálamo. Nessa área, essa substância ativa proteínas cinase-AMP, diminuindo o apetite e aumentando a termogênese do tecido adiposo marrom, por estímulo sobre o sistema nervoso simpático, reduzindo o apetite e o peso (CHEN *et al.*, 2005; PISINGER E JORGENSEN, 2007; SEOANE-COLLAZO *et al.*, 2014). A curto prazo, a nicotina aumenta o gasto energético e reduz o apetite, o que pode explicar por

que os fumantes tendem a ter menor peso corporal do que os não fumantes (CHIOLERO *et al.*, 2008), justificando ainda porque a cessação do tabagismo é frequentemente seguida de ganho de peso.

Em nosso estudo, não mensuramos a ingestão alimentar dos animais, dessa forma não podemos inferir a redução do apetite, e conseqüentemente da alimentação. No entanto, ao avaliarmos o peso relativo da gordura retroabdominal, observamos uma redução significativa para o grupo exposto a fumaça de cigarro (TAB), podendo dessa forma inferir o efeito termogênico da nicotina em nossos achados. Os pesos relativos dos demais tecidos não apresentaram diferença significativa.

Em relação ao grupo que recebeu a associação entre álcool e cigarro, foco do nosso estudo, observamos da mesma forma, redução do peso corpóreo final, quando considerado peso inicial e final. Esse resultado pode ser atribuído justamente ao efeito termogênico da nicotina presente no cigarro, uma vez que não se deve ao efeito do álcool, pois já está bem esclarecido na literatura o seu aporte calórico e conseqüentemente ganho de peso dos indivíduos alcoolistas (LEVINE, HARRIS E MORGAN, 2000; YOKOYAMA *et al.*, 2013).

6.2 Efeito do álcool, cigarro ou a sua associação sobre dosagens bioquímicas

As enzimas aminotransferases estão amplamente distribuídas nos tecidos humanos e seus níveis plasmáticos aumentam consideravelmente nas lesões ou processos infecciosos no fígado, rins, miocárdio, músculo esquelético, pâncreas, baço, cérebro, pulmões, entre outros tecidos (MOTTA, 2000). A ALT é encontrada principalmente no citoplasma, já a AST também é encontrada no citoplasma e ainda nas mitocôndrias. Doenças hepatocelulares, geralmente aumentam as enzimas plasmáticas alanina (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) (MOTTA, 2000), uma vez que a

ruptura da membrana plasmática do hepatócito libera essas enzimas para a corrente sanguínea, indicando dano celular (DEVARAJ *et al.*, 2011).

Embora os resultados esperados para essas enzimas no nosso estudo fossem de aumento significativo em função do dano observado pelos resultados da histologia, não observamos diferença entre os grupos para a dosagem da enzima AST. Surpreendentemente, observamos uma redução significativa da ALT no grupo TAB exposto a fumaça de cigarro. De acordo com alguns autores, o decréscimo nos valores de ALT e AST não tem significado clínico, a não ser em casos de degeneração celular grave e/ou processos crônicos, quando ocorre uma perda da função celular (MOTTA, 2000; GONZÁLEZ, 2003). Resultados de histologia no nosso estudo não indicam degeneração celular grave nos animais do grupo TAB. Em função dos achados de redução dessas enzimas também em humanos, não acreditamos que seja algum artefato pela manipulação das amostras ou durante o processamento. No entanto, não temos explicação plausível para esse achado.

Ainda que alguns estudos em humanos não tenham observado alterações na concentração da AST e ALT em tabagistas (WHITEHEAD, ROBINSON E ALLAWAY, 1996) e outros tenham mostrado ainda menor concentração da enzima AST em tabagistas “pesados” (CHAN-YEUNG *et al.*, 1981), a maioria mostra aumento dessas duas enzimas tanto em tabagistas quanto alcoolistas, na dependência da frequência e concentração de uso, indicando potencial dano hepático (JANG *et al.*, 2012; ALSALHEN E ABDALSALAM, 2014). Em animais, esses resultados se repetem, com a maioria dos estudos mostrando aumento de AST e ALT por exposição crônica ao álcool, fumaça de cigarro ou sua associação (WATANABE *et al.*, 1995; PEKMEZ *et al.*, 2007), diferente do observado em nosso estudo. Diferenças na frequência e tempo de exposição podem justificar tais discrepâncias.

Marcadores de dano renal, creatinina e ureia também foram determinados nesse estudo. A creatinina é um produto da degradação da fosfocreatina no músculo e é geralmente produzida em uma taxa constante pelo organismo. A ureia, por outro lado, é sintetizada no fígado a partir da amônia proveniente do metabolismo dos aminoácidos. Fatores renais (pré-renal, renal e pós-renal) e extra-renais (ingestão de proteína) podem interferir no aumento da concentração sérica de ureia (MOTTA, 2000; GONZÁLEZ, 2003). Nossos resultados mostram que a concentração plasmática de creatinina aumentou significativamente nos animais TAB, expostos a fumaça de cigarro, com uma tendência de aumento no grupo associação ALTAB. Ureia não mostrou diferença entre os grupos. Em roedores, a mensuração sérica de ureia constitui um indicador insensível de danos renais, sendo que a medida da creatinina é mais sensível e específica para avaliar funcionamento renal (GONZÁLEZ, 2003). Portanto, nossos resultados da creatinina, associados aos dados da histologia são sugestivos de redução da taxa de filtração glomerular, indicando dano renal nos animais do grupo TAB. Esses resultados estão em acordo com o observado no resultado da histologia, com maior efeito deletério do tabaco sobre o tecido renal, evidenciado por necrose, embora não tenhamos observado alteração do peso do rim. Adicionalmente, esses resultados confirmam resultados em seres humanos que mostram que fumar induz dano renal, produzindo aumento da pressão arterial e intraglomerular, podendo, a longo prazo, produzir disfunção das células endoteliais renais (ORTH, 2004). Como a disfunção renal induzida pelo fumar está intimamente relacionada com o tempo de uso e o número de cigarros fumados por dia, confirmamos que nosso modelo mimetiza em parte o padrão humano de tabagismo (TYLICKI *et al.*, 2006).

No entanto, para o grupo ALC, não observamos alteração de creatinina e ureia. De fato, enquanto em ratos a administração de álcool, 1,6 g/kg, via gavagem, por 12

semanas aumenta as concentrações plasmáticas de ureia e creatinina (DAS *et al.*, 2008), em seres humanos, o consumo de álcool está associado à redução da concentração desses marcadores (CHAN-YEUNG *et al.*, 1981). Alterações na concentração plasmática de ureia e creatinina pelo álcool estão mais comumente associadas a dano renal induzido por complicações pelo uso crônico, como hipertensão, e não por dano direto do álcool sobre o tecido renal ou uso agudo (MAJUMDAR *et al.*, 1982).

6.3 Efeito do álcool, cigarro e sua associação sobre alterações na morfologia hepática

Avaliando o efeito da administração crônica de álcool, exposição a fumaça do cigarro ou sua associação sobre o tecido hepático, observamos alterações significativas em três parâmetros: presença de tumefação celular, infiltrado inflamatório e necrose.

Desses marcadores de dano, apenas necrose foi comum à exposição ao álcool (ALC) e à fumaça do cigarro (TAB e ALTB), uma vez que tumefação celular moderada a severa foi observada mais importantemente no grupo ALC e infiltrado perivascular, no grupo associação ALTB.

Dentre essas alterações morfológicas, a tumefação representa resposta imediata da célula a uma agressão resultante de exposição do tecido a toxinas, infecções por bactérias ou vírus, isquemia, entre outras (PIRES, TRAVASSOS E GARTNER, 2004). Ao microscópio, as células apresentam-se aumentadas de volume, resultado da perda do equilíbrio hidroeletrolítico (PIRES, TRAVASSOS E GARTNER, 2004). Maior frequência e severidade de tumefação no tecido hepático dos ratos do grupo ALC indica resposta inflamatória aguda. Embora poucos estudos avaliem os parâmetros de modo individual, não descartamos que o álcool e seu metabólito tóxico, o acetaldeído, promovam resposta inflamatória, determinada pelo aumento do número de células em

estado de tumefação, mesmo após exposição crônica. Uso crônico de álcool está associado a retenção hídrica e desequilíbrio eletrolítico, não apenas por mecanismo relacionados a desregulação do controle da diurese pelo hormônio antidiurético (ADH), mas também por interferência sobre bombas de sódio e potássio presentes em células do tecido hepático e renal (ELISAF *et al.*, 1994). De fato, retenção hídrica e eletrolítica, associadas à vasodilatação esplâncnica e vasoconstrição renal compensatória estão associadas à síndrome hepatorenal, uma comorbidade relativamente frequente em indivíduos cirróticos (ARROYO, GUEVARA E GINES, 2002; ADEWALE E IFUDU, 2014). Essa resposta inflamatória parece estar relacionada à sobrecarga de álcool sobre o tecido hepático, uma vez que após administração oral é rapidamente absorvido, sobrecarregando esse órgão detoxificador. Indução enzimática e produção de metabólito tóxico também parecem contribuir para a promoção de dano (CENI, MELLO E GALLI, 2014).

Embora infiltrado perivascular em grau moderado seja comum aos tratamentos ALC e TAB, severidade e maior frequência de grau moderado foi observado na associação ALTB. Do mesmo modo, a interpretação desses resultados é mais adequada quando considerada no conjunto das alterações. No entanto, destacamos essa resposta por ser preponderante no grupo ALTB, indicando efeito da associação dessas duas drogas de abuso. Esse marcador de dano está associado mais frequentemente à resposta inflamatória crônica. Em pacientes com artrite reumatoide, presença de infiltrado perivascular em tecido de biópsia é diagnóstico diferencial para vasculite reumatoide. Nessa condição, infiltrado inflamatório, com mais de 3 camadas de células mono ou polimofonucleares é indicativo de destruição progressiva da parede do vaso e, se não controlada, redução de vascularização, parestesia e até necessidade de amputação da área afetada (VOSKUYL *et al.*, 1998; COLLINS, ARNOLD E KISSEL, 2013).

Inflamação crônica e uso abusivo de drogas também parecem afetar o tecido hepático, produzindo quadro de vasculite que antecede cirrose hepática (COLLINS, ARNOLD E KISSEL, 2013). Chama atenção nos nossos resultados que de 8 animais do grupo ALTB, 7 apresentavam infiltrado perivascular classificado como moderado ou severo. Outros estudos também mostraram aumento de infiltrado perivascular pela associação entre álcool e fumaça de cigarro em condições experimentais semelhantes as utilizadas em nosso experimento (VANISREE E SUDHA, 2006; WISNIEWSKA *et al.*, 2013). Embora não conclusivo, esse achado parece indicar maior risco de comprometimento circulatório no fígado pela associação entre álcool e tabaco (WISNIEWSKA *et al.*, 2013).

Para os grupos ALC, TAB e ALTB, indistintamente, se observou aumento significativo de necrose. Esse parâmetro pode ser identificado por ausência de conexões celulares e consequente descontinuidade do tecido, bem como perda do contorno celular e diminuição da coloração entre núcleo e citoplasma (Figura 7) (PIRES, TRAVASSOS E GARTNER, 2004). Embora classificada aqui como necrose, não descartamos que a destruição de algumas dessas células esteja relacionada a mecanismo de apoptose, frequentemente associadas à regeneração celular normal e controle do crescimento do tecido hepático (GUICCIARDI *et al.*, 2013). Marcadores específicos como caspase, uma protease cuja atividade está aumentada durante a apoptose, permitiriam distinguir entre esses dois processos de morte celular (GUICCIARDI *et al.*, 2013). No entanto, estudos recentes propõem o termo necroptose, um mecanismo presente no tecido hepático capaz de programar e regular processos de necrose resultante da exposição crônica a algumas toxinas, tornando difícil a distinção entre apoptose e necrose nesse tecido em particular (VANDENABEELE *et al.*, 2010). Apesar desses conceitos, observamos aqui resposta de lesão após tratamento crônico tanto com álcool quanto

com fumaça de cigarro. Modelos animais clássicos de hepatotoxicidade como aqueles pela administração de paracetamol ou de tetracloreto de carbono (CCl₄) também mostram alterações de necrose e infiltrado inflamatório no tecido hepático de roedores (MORSY ET AL., 2012; SOLIMAN, NASSAN E ISMAIL, 2014).

Necrose hepática também foi observada em vários estudos com animais após administração de álcool, mesmo em doses agudas (LEFKOWITCH, 2005; JANG *et al.*, 2012; LIU *et al.*, 2012; LIU *et al.*, 2014). Por outro lado, nicotina administrada via subcutânea por 10 dias em ratos também produz necrose hepática, aumentando ainda mais o dano produzido pela administração de CCl₄ (YUEN *et al.*, 1995). A associação de nicotina, via subcutânea, administrada com álcool, presente na dieta hiperlipídica, também aumenta frequência de necrose e esteatose hepática em camundongos após 3 semanas de tratamento (LU, WARD E CEDERBAUM, 2013).

No nosso modelo observamos sinais de esteatose apenas em dois animais do grupo tratado apenas com álcool, mas não no grupo associação ALTB. Esteatose, que consiste no acúmulo de lipídios no interior da célula (PIRES, TRAVASSOS E GARTNER, 2004), é característica de estágio inicial da doença hepática alcoólica (LEFKOWITCH, 2005). Está relacionada à hipóxia na região pericentral do fígado (especialmente zona 3) devido ao aumento do consumo de oxigênio pela oxidação do etanol (ARTEEL *et al.*, 1997). Esteatose alcoólica é dano comum pelo consumo crônico e em doses elevadas de álcool (CENI, MELLO E GALLI, 2014). Modelos animais de alcoolismo identificam principalmente esteatose como indicador de dano hepático (ARTEEL *et al.*, 1997; LEFKOWITCH, 2005; BAILEY *et al.*, 2009; LIU *et al.*, 2014).

Em nosso estudo, não observamos esteatose nos animais do grupo TAB ou ALTB. Em modelo de exposição à fumaça do cigarro (2 cigarros/dia, por 4 semanas),

(AZZALINI *et al.*, 2010), também não observaram esteatose hepática em ratos controle, mas apenas em ratos alimentados com dieta hiperlipídica, indicando que a fumaça pode potencializar esteatose não alcoólica quando associado a outros fatores, como dieta hiperlipídica (AZZALINI *et al.*, 2010). Um único estudo avaliando esteatose hepática em camundongos hipercolesterolemicos (geneticamente modificados) pela exposição combinada de álcool e fumaça do cigarro, 5 horas por dia, por 4 semanas, mostrou que a associação foi determinante para o aparecimento de esteatose (BAILEY *et al.*, 2009). Para o grupo exposto à fumaça de cigarro esses autores não detectaram diferença significativa, enquanto para o grupo álcool observaram grau de esteatose moderada (BAILEY *et al.*, 2009). Novamente, outros fatores parecem ter sido determinantes para o aparecimento de esteatose nesses animais tratados com a associação, indicando que no nosso experimento, sem outros fatores interferentes, a fumaça de cigarro não promove dano hepático tão importante. Uma possível justificativa para esse menor efeito sobre o tecido hepático pode estar relacionada à via de administração da fumaça do cigarro, pois ao ser inalada, é absorvida por capilares pulmonares numa concentração dependente de fatores externos como tragada, tempo de retenção no pulmão, entre outros. Uma vez absorvidos, os constituintes presentes na fumaça do cigarro são distribuídos aos tecidos via corrente sanguínea, não sofrendo metabolismo de primeira passagem clássico, embora alguns constituintes possam sofrer ação de enzimas pulmonares.

Também não podemos desconsiderar que o processo de dano hepático está associado a mecanismos de inflamação e estresse oxidativo, promovidos inclusive pela própria célula necrosada. Durante o processo necrótico ocorre perda da homeostasia iônica pela célula, resultando em tumefação celular, aumento do cálcio citoplasmático livre, ativação de diversas proteases e fosfolipases, perda da integridade mitocondrial e, conseqüentemente, ruptura da membrana plasmática (VANDENABEELE *et al.*, 2010).

Todo esse conjunto de eventos pode desencadear resposta inflamatória e de desequilíbrio entre mecanismos pró e antioxidantes endógenos, resultado em estresse oxidativo. Aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-6 e TNF- α no tecido hepático foram observadas tanto pela exposição ao álcool quanto ao tabaco (AGARWAL, 2005; CREWS *et al.*, 2006; EL-ZAYADI, 2006). Há evidências também que fumar aumenta a produção de fatores angiogênicos como o fator de crescimento endotelial vascular A (VEGF-A) e mediadores fibrinogênicos como leptina, fator de crescimento tumoral β 1 (TGF- β ₁) e angiotensina II (AGARWAL, 2005; ALTAMIRANO E BATALLER, 2010). Todos eles contribuindo para dano hepático indireto, pela presença de toxinas presentes na fumaça do cigarro ou pelo álcool.

Estresse oxidativo, com aumento do dano lipídico e redução da atividade de enzimas antioxidantes são observados tanto pela administração de álcool, exposição à fumaça do cigarro, nicotina isoladamente ou pela associação entre álcool e tabaco (WATANABE *et al.*, 1995; EKE, VURAL E ISCAN, 1996; ARTEEL *et al.*, 1997; SCOTT *et al.*, 2000).

Álcool reduz a atividade de enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD) e glutathione peroxidase (GSH) no fígado de ratos de modo dose dependente (SCOTT *et al.*, 2000). Fumaça de cigarro (20 min/dia por 4 semanas) também está associado a aumento da peroxidação lipídica em ratos (WATANABE *et al.*, 1995). Associação entre álcool (2 g/kg, I.G) e nicotina (0.1 mg/kg, SC) também aumenta peroxidação lipídica e a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD), reduzindo a atividade da catalase (CAT) no tecido hepático (HUSAIN *et al.*, 2001). Embora não tenhamos explorado alterações inflamatórias e de estresse oxidativo no nosso experimento, é possível que esses mecanismos também estejam alterados pela exposição ao álcool, à fumaça do cigarro ou sua associação.

6.4 Efeito do álcool, cigarro e sua associação sobre alterações morfológicas renais

Avaliando o efeito da administração de álcool e exposição a fumaça do cigarro sobre o tecido renal, observamos alterações significativas em dois parâmetros: presença de vacuolização e necrose. Desses marcadores de dano, do mesmo modo que para o tecido hepático, necrose foi observada para todos os grupos: ALC, TAB e ALTB enquanto vacuolização foi observada com maior frequência nos animais do grupo associação (ALTB).

Embora vacuolização preceda processos de necrose e poderia ter sido tomada como um parâmetro indicador de dano, chamou atenção o fato de que o grupo associação ALTB tinha 3 indivíduos com vacuolização em grau moderado, enquanto para o grupo TAB havia 1 e para o grupo ALC não havia nenhum. A vacuolização se caracteriza por células com volume aumentado em decorrência da presença de água livre no citoplasma, após ruptura do equilíbrio hidroeletrolítico. Ao microscópio observa-se células com volume citoplasmático aumentado e com pouco conteúdo proteico. O núcleo apresenta-se normal ou reduzido de tamanho, em posição central ou periférica na célula (PIRES, TRAVASSOS E GARTNER, 2004).

O uso crônico de álcool, em altas doses, está associado a efeito lesivo sobre túbulos renais (CECCHIN E DE MARCHI, 1996). No entanto, alguns autores defendem a hipótese de que esse efeito seria consequência de outras comorbidades associadas ao consumo excessivo de álcool e não ao álcool *per se* (DAS *et al.*, 2008).

Porém, os resultados avaliando dano renal pelo álcool são controversos. Em humanos, estudos mostram que o álcool em baixas doses tem um efeito nefroprotetor, porém em altas doses pode causar dano renal (RODRIGO *et al.*, 2002). Padrão de uso de álcool tipo binge, caracterizado por consumo pontual de álcool em altas doses, num curto espaço de tempo, ou uso crônico em doses elevadas também estão relacionados

com necrose e disfunção tubular renal (DE MARCHI *et al.*, 1993; HIRSCH *et al.*, 1994). Também em animais alimentados com dieta contendo álcool, estudos evidenciam disfunção renal, edema intersticial e hipertrofia renal, acompanhada de aumento da proteínas, gordura e água (VAN THIEL *et al.*, 1977).

Estudos em animais que mostram que o rim responde de modo positivo frente ao insulto produzido por doses baixas a moderadas de álcool evidenciado pelo aumento da atividade de enzimas antioxidantes como a glutatona peroxidase (GSH-Px) (SCOTT *et al.*, 2000), sem dano lipídico (DINU, NECHIFOR E MOVILEANU, 2005). No entanto, a maioria dos estudos mostra aumento da lipoperoxidação no tecido renal pelo tratamento crônico com álcool, acompanhados de alterações morfológicas como necrose tubular renal (DAS *et al.*, 2008). Associação entre álcool e cigarro ou nicotina também está associada a aumento do dano lipídico (BINDU E ANNAMALAI, 2004; Cooper, 2006).

Mais consistentes, resultados de diversos estudos evidenciam dano renal pelo uso crônico de cigarro ou mesmo administração de nicotina. Fumar reduz o diâmetro do glomérulo renal de ratos expostos a fumaça de cigarro, durante 5 dias por semana, por 16 semanas (DUNDAR, KOCAK E CULHACI, 2004). Fumaça de cigarro também está implicada na etiologia de carcinoma de células renais, com aumento forte de risco associado ao número de cigarros fumados por dia (HUNT *et al.*, 2005).

Do mesmo modo que acima, para avaliação dos efeitos do álcool, fumaça do cigarro ou sua associação sobre o tecido renal, consideramos a frequência de eventos com gravidade 2 (moderado) e 3 (severo) e os resultados globais dão conta de que para o grupo ALC, foram 14 eventos; para o grupo TAB foram 17 eventos e para o grupo associação foram 22 eventos. Novamente, embora empírico, esse perfil de resposta dá

indicativos de que a fumaça do cigarro apresenta maior grau de dano, em especial se associado ao cigarro.

7. CONCLUSÕES

Em resumo, nossos resultados revelaram que a exposição à fumaça de cigarro reduz o ganho de peso e gordura retroabdominal em ratos. A fumaça de cigarro ainda promoveu diminuição dos níveis séricos da enzima ALT, e o grupo exposto a associação apresentou níveis aumentados de creatinina. Em relação aos parâmetros morfológicos, evidenciamos que o uso de álcool, exposição à fumaça de cigarro ou sua associação promoveu necrose hepática e renal. Ainda com relação aos parâmetros morfológicos observamos aumento de tumefação e infiltrado celular pela associação, porém apenas o álcool foi capaz de produzir tumefação no tecido hepático. Em relação as alterações sobre o tecido renal, além da presença de necrose em todos os grupos, ainda observamos presença de vacuolização citoplasmática pelo uso da associação.

Podemos, então, concluir que o uso de álcool, exposição à fumaça de cigarro ou sua associação promovem necrose hepática e renal. O risco de dano hepático parece ser maior pelo álcool, enquanto o risco de dano renal parece ser maior para o cigarro. A associação contribui apenas para aumento do dano renal.

Embora a implicação dessas duas drogas de abuso com risco aumentado de morbidade e mortalidade, implicando em elevados custos para os sistemas de saúde, chama atenção a escassez de resultados avaliando os efeitos da associação entre essas duas drogas de abuso. Por serem drogas lícitas e frequentemente utilizadas em associação, faz-se necessários mais estudos explorando potencialização de dano em diferentes tecidos pelo uso combinado.

8. PERSPECTIVAS

Embora nossos resultados mostrem o efeito danoso do álcool e tabaco sobre os tecidos hepático e renal, outros estudos são necessários para investigar os mecanismos intracelulares envolvidos com esse dano. Para esse entendimento, são necessárias algumas análises de imunistoquímica com marcadores específicos, como por exemplo, para necrose, apoptose entre outras. Ainda se faz necessário dosagem de interleucinas plasmáticas e/ou teciduais, para dessa forma, identificarmos quais são os fatores específicos que levam ao dano tecidual hepático e renal.

9. REFERÊNCIAS

ADEWALE, A.; IFUDU, O. Kidney injury, fluid, electrolyte and acid-base abnormalities in alcoholics. **Niger Med J**, v. 55, n. 2, p. 93-8, Mar 2014.

AGARWAL, R. Smoking, oxidative stress and inflammation: impact on resting energy expenditure in diabetic nephropathy. **BMC Nephrol**, v. 6, p. 13, 2005.

ALSALHEN, K. S.; ABDALSALAM, R. D. Effect of cigarette smoking on liver functions: a comparative study conducted among smokers and non-smokers male in El-beida City, Libya. **Pharmaceutical Journal**, v. 3, n. 7, p. 291-295, 2014.

ALTAMIRANO, J.; BATALLER, R. Cigarette smoking and chronic liver diseases. **Gut**, v. 59, n. 9, p. 1159-62, Sep 2010.

ARROYO, V.; GUEVARA, M.; GINES, P. Hepatorenal syndrome in cirrhosis: pathogenesis and treatment. **Gastroenterology**, v. 122, n. 6, p. 1658-76, May 2002.

ARTEEL, G. E. et al. Chronic enteral ethanol treatment causes hypoxia in rat liver tissue in vivo. **Hepatology**, v. 25, n. 4, p. 920-6, Apr 1997.

AZZALINI, L. et al. Cigarette smoking exacerbates nonalcoholic fatty liver disease in obese rats. **Hepatology**, v. 51, n. 5, p. 1567-76, May 2010.

BAILEY, S. M. et al. Ethanol and tobacco smoke increase hepatic steatosis and hypoxia in the hypercholesterolemic apoE(-/-) mouse: implications for a "multihit" hypothesis of fatty liver disease. **Free Radic Biol Med**, v. 46, n. 7, p. 928-38, Apr 1 2009.

BERNARDIS, L. L.; PATTERSON, B. D. Correlation between 'Lee index' and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. **J Endocrinol**, v. 40, n. 4, p. 527-8, Apr 1968.

BINDU, M. P.; ANNAMALAI, P. T. Combined effect of alcohol and cigarette smoke on lipid peroxidation and antioxidant status in rats. **Indian J Biochem Biophys**, v. 41, n. 1, p. 40-4, Feb 2004.

BLACK, H. R. et al. Effect of heavy cigarette smoking on renal and myocardial arterioles. **Nephron**, v. 34, n. 3, p. 173-9, 1983.

BOOR, P. et al. Renal, vascular and cardiac fibrosis in rats exposed to passive smoking and industrial dust fibre amosite. **J Cell Mol Med**, v. 13, n. 11-12, p. 4484-91, Nov-Dec 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Vigitel Brasil 2013: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. – Brasília: Ministério da Saúde, 2014.

- CECCHIN, E.; DE MARCHI, S. Alcohol misuse and renal damage. **Addict Biol**, v. 1, n. 1, p. 7-17, 1996.
- CENI, E.; MELLO, T.; GALLI, A. Pathogenesis of alcoholic liver disease: Role of oxidative metabolism. **World J Gastroenterol**, v. 20, n. 47, p. 17756-17772, Dec 21 2014.
- CHAN-YEUNG, M. et al. The effects of age, smoking, and alcohol on routine laboratory tests. **Am J Clin Pathol**, v. 75, n. 3, p. 320-6, Mar 1981.
- CHEN, H. et al. Effect of short-term cigarette smoke exposure on body weight, appetite and brain neuropeptide Y in mice. **Neuropsychopharmacology**, v. 30, n. 4, p. 713-9, Apr 2005.
- CHIOLERO, A. et al. Consequences of smoking for body weight, body fat distribution, and insulin resistance. **Am J Clin Nutr**, v. 87, n. 4, p. 801-9, Apr 2008.
- COLLINS, M. P.; ARNOLD, W. D.; KISSEL, J. T. The neuropathies of vasculitis. **Neurol Clin**, v. 31, n. 2, p. 557-95, May 2013.
- COOPER, R. G. Effect of tobacco smoking on renal function. **Indian J Med Res**, v. 124, n. 3, p. 261-8, Sep 2006.
- COOPER, R. G.. Renal function in male rats concurrently exposed to nicotine & ethanol. **Indian J Med Res**, v. 125, n. 6, p. 791-3, Jun 2007.
- CREWS, F. T. et al. Cytokines and alcohol. In: (Ed.). **Alcohol Clin Exp Res**. United States, v.30, 2006. p.720-30.
- DAM, M. K. et al. Smoking and risk of liver cirrhosis: a population-based cohort study. **Scand J Gastroenterol**, v. 48, n. 5, p. 585-91, May 2013.
- DAS, S. K. et al. Effects of chronic ethanol exposure on renal function tests and oxidative stress in kidney. **Indian J Clin Biochem**, v. 23, n. 4, p. 341-4, Oct 2008.
- DAS, S. K.; VASUDEVAN, D. M. Alcohol-induced oxidative stress. **Life Sci**, v. 81, n. 3, p. 177-87, Jun 27 2007.
- DE MARCHI, S. et al. Renal tubular dysfunction in chronic alcohol abuse--effects of abstinence. **N Engl J Med**, v. 329, n. 26, p. 1927-34, Dec 23 1993.
- DEVARAJ, V. C. et al. Hepatoprotective activity of Hepax-a polyherbal formulation. **Asian Pac J Trop Biomed**, v. 1, n. 2, p. 142-6, Apr 2011.
- DINU, D.; NECHIFOR, M. T.; MOVILEANU, L. Ethanol-induced alterations of the antioxidant defense system in rat kidney. **J Biochem Mol Toxicol**, v. 19, n. 6, p. 386-95, 2005.
- DUNDAR, M.; KOCAK, I.; CULHACI, N. Effects of long-term passive smoking on the diameter of glomeruli in rats: Histopathological evaluation. **Nephrology (Carlton)**, v. 9, n. 2, p. 53-7, Apr 2004.

EKE, B. C.; VURAL, N.; ISCAN, M. Combined effects of ethanol and cigarette smoke on hepatic and pulmonary xenobiotic metabolizing enzymes in rats. **Chem Biol Interact**, v. 102, n. 3, p. 155-67, Dec 20 1996.

EL-ZAYADI, A. R. Heavy smoking and liver. **World J Gastroenterol**, v. 12, n. 38, p. 6098-101, Oct 14 2006.

ELISAF, M. et al. Acid-base and electrolyte abnormalities in alcoholic patients. **Miner Electrolyte Metab**, v. 20, n. 5, p. 274-81, 1994.

ESQUIVEL, A. L. et al. The effect of obesity and tobacco smoke exposure on inflammatory mediators and matrix metalloproteinases in rat model. **Toxicol Mech Methods**, v. 24, n. 9, p. 633-43, Dec 2014.

FELDMAN, M. D.; CHRISTENSEN, J. F.; SATTERFIELD, J. M. **Behavioral Medicine: A Guide for Clinical Practice**. 2014.

FILOZOF, C.; FERNANDEZ PINILLA, M. C.; FERNANDEZ-CRUZ, A. Smoking cessation and weight gain. **Obes Rev**, v. 5, n. 2, p. 95-103, May 2004.

GEISS, O.; KOTZIAS, D. Tobacco, Cigarettes and Cigarette Smoke An Overview. **Institute for Health and Consumer Protection**, 2007.

GENTRY-NIELSEN, M. J. et al. A rat model to determine the biomedical consequences of concurrent ethanol ingestion and cigarette smoke exposure. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 28, n. 7, p. 1120-8, Jul 2004.

GONZÁLEZ, F. D. **Introdução a Bioquímica Clínica veterinária**. 2^a edição. 2003.

GUICCIARDI, M. E. et al. Apoptosis and necrosis in the liver. **Compr Physiol**, v. 3, n. 2, p. 977-1010, Apr 2013.

HASHIBE, M. et al. Interaction between tobacco and alcohol use and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 18, n. 2, p. 541-50, Feb 2009.

HIRSCH, D. J. et al. Acute renal failure after binge drinking. **Nephrol Dial Transplant**, v. 9, n. 3, p. 330-1, 1994.

HUNT, J. D. et al. Renal cell carcinoma in relation to cigarette smoking: meta-analysis of 24 studies. **Int J Cancer**, v. 114, n. 1, p. 101-8, Mar 10 2005.

HUSAIN, K. et al. Chronic ethanol and nicotine interaction on rat tissue antioxidant defense system. **Alcohol**, v. 25, n. 2, p. 89-97, Oct 2001.

JAIMES, E. A. et al. Nicotine augments glomerular injury in a rat model of acute nephritis. **Am J Nephrol**, v. 29, n. 4, p. 319-26, 2009.

JANG, E. S. et al. Effects of coffee, smoking, and alcohol on liver function tests: a comprehensive cross-sectional study. **BMC Gastroenterol**, v. 12, p. 145, 2012.

JENSEN, E. X. et al. Impact of chronic cigarette smoking on body composition and fuel metabolism. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 80, n. 7, p. 2181-5, Jul 1995.

KUEHNEL, W. **Color Atlas of Cytology, Histology, and Microscopic Anatomy**. 4 th. New York: 2003.

LARANJEIRA, R, PINSKY, I., ZALESKI, M., CAETANO, R. I Levantamento Nacional sobre os padrões de consumo de álcool na população brasileira. Secretaria Nacional Antidrogas, 2007. Acessado em 26/01/2015: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/relatorio_padroes_consumo_alcool.pdf.

LEE, Y. C.; HASHIBE, M. Tobacco, Alcohol, and Cancer in Low and High Income Countries. **Ann Glob Health**, v. 80, n. 5, p. 378-383, September - October 2014.

LEFKOWITCH, J. H. Morphology of alcoholic liver disease. **Clin Liver Dis**, v. 9, n. 1, p. 37-53, Feb 2005.

LEVINE, J. A.; HARRIS, M. M.; MORGAN, M. Y. Energy expenditure in chronic alcohol abuse. **Eur J Clin Invest**, v. 30, n. 9, p. 779-86, Sep 2000.

LI, H.; FORSTERMANN, U. Red wine and cardiovascular health. In: (Ed.). **Circ Res**. United States, v.111, p.959-61.2012.

LIU, J. et al. Carvedilol attenuates the progression of alcohol fatty liver disease in rats. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 36, n. 9, p. 1587-99, Sep 2012.

LIU, X. et al. Delayed ethanol elimination and enhanced susceptibility to ethanol-induced hepatosteatosis after liver resection. **World J Gastroenterol**, v. 20, n. 48, p. 18249-59, Dec 28 2014.

LIU, Y. et al. Active smoking, passive smoking, and risk of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD): a population-based study in China. **J Epidemiol**, v. 23, n. 2, p. 115-21, 2013.

LONGO, D. L. et al. **Harrison Principles of Internal Medicine**. 2012.

LU, Y.; WARD, S. C.; CEDERBAUM, A. I. Nicotine enhances ethanol-induced fat accumulation and collagen deposition but not inflammation in mouse liver. **Alcohol**, v. 47, n. 5, p. 353-7, Aug 2013.

MAJUMDAR, S. K. et al. Plasma urea and creatinine status in chronic alcoholics. **Drug Alcohol Depend**, v. 9, n. 2, p. 97-100, Apr 1982.

MEYERHOFF, D. J. et al. Smoking comorbidity in alcoholism: neurobiological and neurocognitive consequences. In: (Ed.). **Alcohol Clin Exp Res**. United States, v.30, 2006. p.253-64.

MORSY, M. A. et al. Protective effects of curcumin, alpha-lipoic acid, and N-acetylcysteine against carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in rats. **J Physiol Biochem**, v. 68, n. 1, p. 29-35, Mar 2012.

MOTTA, V. T. **Bioquímica Clínica: princípios e interpretações**. 2000.

NEIMAN, J. Alcohol as a risk factor for brain damage: neurologic aspects. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 22, n. 7 Suppl, p. 346s-351s, Oct 1998.

OMS. **Organização Mundial da Saúde. Information System on Alcohol/Tobacco and Health**. <http://www.who.int/research/en/>. . Acessado em 07/01/2015. 2014.

ORTH, S. R. Effects of smoking on systemic and intrarenal hemodynamics: influence on renal function. **J Am Soc Nephrol**, v. 15 Suppl 1, p. S58-63, Jan 2004.

PEKMEZ, H. et al. The protective effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) against liver damage induced by cigarette smoke inhalation in rats. **Cell Biochem Funct**, v. 25, n. 4, p. 395-400, Jul-Aug 2007.

PEREIRA, C. E. et al. Ambient particulate air pollution from vehicles promotes lipid peroxidation and inflammatory responses in rat lung. **Braz J Med Biol Res**, v. 40, n. 10, p. 1353-9, Oct 2007.

PINTO-SIETSMA, S. J. et al. Smoking is related to albuminuria and abnormal renal function in nondiabetic persons. **Ann Intern Med**, v. 133, n. 8, p. 585-91, Oct 17 2000.

PIRES, M. D. A.; TRAVASSOS, F. S.; GARTNER, F. **Atlas de Patologia Veterinária**. Lisboa: 2004.

PISINGER, C.; JORGENSEN, T. Waist circumference and weight following smoking cessation in a general population: the Inter99 study. **Prev Med**, v. 44, n. 4, p. 290-5, Apr 2007.

RODRIGO, R. et al. Rat kidney antioxidant response to long-term exposure to flavonol rich red wine. **Life Sci**, v. 71, n. 24, p. 2881-95, Nov 1 2002.

SCOTT, R. B. et al. Dose response of ethanol on antioxidant defense system of liver, lung, and kidney in rat. **Pathophysiology**, v. 7, n. 1, p. 25-32, Apr 2000.

SEOANE-COLLAZO, P. et al. Nicotine improves obesity and hepatic steatosis and ER stress in diet-induced obese male rats. **Endocrinology**, v. 155, n. 5, p. 1679-89, May 2014.

SISSON, J. H. Alcohol and airways function in health and disease. **Alcohol**, v. 41, n. 5, p. 293-307, Aug 2007.

SOLIMAN, M. M.; NASSAN, M. A.; ISMAIL, T. A. Immunohistochemical and molecular study on the protective effect of curcumin against hepatic toxicity induced by paracetamol in Wistar rats. **BMC Complement Altern Med**, v. 14, n. 1, p. 457, 2014.

- STORR, C. L. et al. Smoking estimates from around the world: data from the first 17 participating countries in the World Mental Health Survey Consortium. **Tob Control**, v. 19, n. 1, p. 65-74, Feb 2010.
- TALHOUT, R. et al. Hazardous compounds in tobacco smoke. **Int J Environ Res Public Health**, v. 8, n. 2, p. 613-28, Feb 2011.
- TOZAWA, M. et al. Influence of smoking and obesity on the development of proteinuria. **Kidney Int**, v. 62, n. 3, p. 956-62, Sep 2002.
- TYLICKI, L. et al. Smoking as a risk factor for renal injury in essential hypertension. **Nephron Clin Pract**, v. 103, n. 4, p. c121-8, 2006.
- VAMVAKAS, S. et al. Alcohol abuse: potential role in electrolyte disturbances and kidney diseases. **Clin Nephrol**, v. 49, n. 4, p. 205-13, Apr 1998.
- VAN THIEL, D. H. et al. Alcohol: its effect on the kidney. **Metabolism**, v. 26, n. 8, p. 857-66, Aug 1977.
- VANDENABEELE, P. et al. Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 11, n. 10, p. 700-14, Oct 2010.
- VANISREE, A. J.; SUDHA, N. Curcumin combats against cigarette smoke and ethanol-induced lipid alterations in rat lung and liver. **Mol Cell Biochem**, v. 288, n. 1-2, p. 115-23, Aug 2006.
- VOSKUYL, A. E. et al. The diagnostic value of perivascular infiltrates in muscle biopsy specimens for the assessment of rheumatoid vasculitis. **Ann Rheum Dis**, v. 57, n. 2, p. 114-7, Feb 1998.
- WATANABE, K. et al. Effect of cigarette smoke on lipid peroxidation and liver function tests in rats. **Acta Med Okayama**, v. 49, n. 5, p. 271-4, Oct 1995.
- WHITEHEAD, T. P.; ROBINSON, D.; ALLAWAY, S. L. The effects of cigarette smoking and alcohol consumption on serum liver enzyme activities: a dose-related study in men. **Ann Clin Biochem**, v. 33 (Pt 6), p. 530-5, Nov 1996.
- WIECZOREK, M. G. G.; GOMEZ, R. Efeito da associação entre álcool e cigarro sobre a proliferação celular hipocampal e memória em ratos. 2013 2013. Disponível em: <<http://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/76606>>.
- WISNIEWSKA, E. et al. Exposure to ethanol and tobacco smoke in relation to level of PCNA antigen expression in pancreatic and hepatic rat cells. **Pharmacol Rep**, v. 65, n. 4, p. 914-26, 2013.
- YOKOYAMA, A. et al. Alcohol dehydrogenase-1B genotype (rs1229984) is a strong determinant of the relationship between body weight and alcohol intake in Japanese alcoholic men. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 37, n. 7, p. 1123-32, Jul 2013.

YUEN, S. T. et al. The effect of nicotine and its interaction with carbon tetrachloride in the rat liver. **Pharmacol Toxicol**, v. 77, n. 3, p. 225-30, Sep 1995.

10. ANEXOS

	UFRGS UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL	PRÓ-REITORIA DE PESQUISA Comissão De Ética No Uso De Animais	
---	--	--	---

CARTA DE APROVAÇÃO

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 25022

Título: Efeito da exposição crônica ao álcool, fumaça de cigarro ou sua associação sobre marcadores inflamatórios plasmáticos e alterações morfológicas sobre os aparelhos respiratório, cardiovascular e renal

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

ROSANE GOMEZ - coordenador desde 05/03/2013
ADRIANA SIMON COITINHO - coordenador desde 05/03/2013
CAROLINA FERREIRA SANTOS - pesquisador desde 05/03/2013
RIANNE REMUS PULCINELLI - pesquisador desde 05/03/2013
Solange Bandiera - pesquisador desde 05/03/2013
TANIA MARA SANTORO PERES - Técnico de Laboratório desde 05/03/2013

Equipe Externa:

Marilda C Fernandes - coordenador desde 05/03/2013
Eliane Dallegrave - pesquisador desde 05/03/2013

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 48 ratos, Wistar, machos, adultos, de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008 que disciplina a criação e utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa.

Porto Alegre, Quarta-Feira, 25 de Setembro de 2013



BRUNO CASSEL NETO
Vice Pró-Reitor de Pesquisa