

INFLUÊNCIA DA TOXICIDADE COMBINADA NO DESENVOLVIMENTO DA LESÃO PANCREÁTICA ALCOÓLICA

Ensaio Experimental prolongado

JORGE PENEDA, AMÉLIA BAPTISTA

Instituto Nacional de Saúde, Núcleo de Alcoologia. Serviço de Anatomia Patológica,
Hospital de St.^a Maria, Centro de Estudos de Anatomia Patológica da Universidade de Lisboa. Lisboa.

RESUMO

O presente ensaio pretende apreciar a influência da toxicidade alcoólica combinada no comportamento morfológico do pâncreas sob efeito do etanol e, do etanol e congéneres. Em 3 grupos de ratos Wistar, grupo controlo e 2 grupos sob experiência um sujeito a injeção intra-peritoneal (I.P.) diária de solução hidroalcoólica de etanol (SHAE) e o outro sujeito a injeção (I.P.) de solução hidroalcoólica de etanol, acetaldeído, metanol e alcoóis superiores (SHAF); ambos os grupos receberam igual volume de etanol por inoculação individual (250mg/100g peso). A experiência prolongou-se por 9 semanas. O ajuste calórico e o desenvolvimento dos animais nos 3 grupos foi semelhante. No estudo das lesões histológicas avaliou-se as suas frequências e características em 7 parâmetros: esteatose, necrose do parenquima, dilatação ductal, rolhões intraluminais, inflamação parenquimatosa, fibrose e necrose gorda e inflamação peripancreáticas. As lesões encontradas nos 2 grupos sob experiência diferem significativamente das dos pâncreas do grupo controlo, excepto para a esteatose. Entre os grupos sob experiência (SHAF-SHAE), todas as lesões são mais frequentes ou mais intensas no grupo SHAF; a diferença das pontuações atingidas adquire significância na necrose, na dilatação ductal e na pontuação total das lesões. Os resultados sugerem que no pâncreas, a toxicidade do etanol é favorecida ou reforçada pela acção sinérgica dos vários agentes químicos voláteis coexistentes nas bebidas alcoólicas.

SUMMARY

Influence of Combined Toxicity on the Development of Alcoholic Lesions

The aim of this study was to evaluate the adverse effects on the exocrine pancreas of ethanol and ethanol with congeners which coexist in alcoholic beverages most commonly consumed by the Portuguese population. Eighteen male wistar rats were divided into three groups and submitted to a daily intraperitoneal injection of a hydroalcoholic solution of ethanol (SHAE) and a hydroalcoholic solution of ethanol, acetaldehyde, methanol and higher alcohols (SHAF); the third group served as a control and received an equivalent volume of an isocaloric solution of dextrose. All the animals were sacrificed at the end of the 9th week of the experiment. The following histological lesions were considered: acinar cell necrosis and steatosis, ductal dilatation, intraluminal plugs, parenchymal inflammation, fibrosis, peripancreatic fat necrosis and inflammation. Their severity was graded by means of a scoring system. The histopathologic changes which characterize pancreatitis (acinar cell necrosis, parenchymal inflammation, fibrosis and peripancreatic fat necrosis and inflammation) were found in the majority of animals of both study groups, but in none of the control group. The lesions tend to be more frequent and severe in the group treated with ethanol and its congeners (SHAF) than in the SHAE group; these differences are statistically significant when necrosis, ductal dilatation and overall severity of lesions are considered. The results of this study suggest that in the pancreas the toxicity of ethanol is enhanced by interaction with other components of alcoholic beverages.

INTRODUÇÃO

Ao longo do tempo a área da etiopatogenia na doença orgânica alcoólica tem retido, obstinadamente, dificuldades na sua compreensão. De facto, constata-se com frequência, por exemplo, que a *exposição* (quantidade/tempo) ao etanol por si só nem sempre se pode correlacionar com a presença e com a gravidade das lesões estruturais dos órgãos alvo.

Assim admite-se, numa perspectiva exploratória de carácter não reducionista que, no estudo do comportamento da associação álcool/pâncreas, a actuação de factores coexistentes adicionais ao etanol deva ser equacionada na conjugação de condições e circunstâncias de investigar, influenciadoras eventuais na indução/promoção da doença pancreática¹⁻⁸.

Nesta área, embora não exista o modelo experimental que reproduza a doença do homem, mantém-se a necessidade do contributo da investigação pré-clínica com o recurso a modelos animais para promover o desenvolvimento do conhecimento sobre a complexa patogenia das lesões induzidas no órgão⁹, concretamente na área da toxicidade combinada.

No presente ensaio pretende-se apreciar a comparação do comportamento do tecido pancreático de animais sob tratamento persistente com etanol e, com etanol e outros constituintes voláteis coexistentes em bebidas alcoólicas habitualmente consumidas pela nossa população.

MATERIAL E MÉTODOS

Utilizaram-se ratos Wistar, machos adultos, de uma colónia estabilizada proveniente do biotério do Instituto Gulbenkian de Ciência (Oeiras), com peso inicial variável de 196 a 230 gramas. Após uma semana de adaptação (luminosidade, temperatura, humidade, alimentação) no biotério do Instituto Nacional de Saúde (INSA), foram distribuídos ao acaso por 3 grupos de seis animais cada, individualizados em compartimentos unitários standardizados.

Dois dos 3 grupos receberam tratamento diário, por via intraperitoneal (I.P.), de diferentes soluções hidro-alcoólicas expressamente preparadas e controladas semanalmente. Os animais de todos os grupos tinham livre acesso a alimentação com idêntica composição (SAPEC - Roedores/Setúbal; valor energético alimentar digestível de 290 kcal/100g de alimento com a seguinte composição: proteínas totais 22,0g/ 100g de peso seco; gordura total 4,6g/100g de peso seco; amido 30,0g/100,0g de peso seco; açúcar 7,5g/ 100gr peso seco; oligolementos e vitaminas) e idêntico modo de acesso à água. Cada animal do grupo controlo recebeu (I.P.) um volume de solução dextrosada isocalórica equivalente ao valor calórico do etanol injectado em cada animal dos 2 grupos de ensaio.

O tempo de tratamento prolongou-se por nove semanas. A captação alimentar sólida e de água, assim como o peso corporal, foram controlados semanalmente. Um dos animais do grupo controlo e de um dos grupos sob tratamento faleceram antes da conclusão da experiência.

Uma das soluções hidro-alcoólicas sintéticas preparadas reproduz uma composição real (concentração propor-

cional de etanol, acetaldeído, metanol e álcoois superiores) das bebidas alcoólicas vínicas fermentadas (SHAF) habitualmente consumidas pela nossa população. A outra solução hidro-alcoólica (SHAE) tem apenas etanol em igual concentração à da anterior. As soluções foram constituídas a partir de matéria prima de elevado grau de pureza, sendo o seu controlo feito através de cromatografia gasosa segundo metodologia seguida no Laboratório de Controlo de Qualidade do Instituto da Vinha e do Vinho/Ministério da Agricultura.

No *Quadro 1* discrimina-se o referencial das concentrações reais de vários constituintes voláteis de bebidas vínicas fermentadas comercializadas, base para a reprodução das soluções sintéticas a utilizar. O volume injectado diariamente, por via I.P. em cada animal dos 2 grupos (SHAE; SHAF), contém 250mg de etanol por 100 gramas de peso corporal e contém ainda para o grupo SHAF os restantes constituintes voláteis nas quantidades expressas no *Quadro 2*. Escolheu-se esta via (I.P.) para evitar perdas por volatilização e atingir níveis precisos de alcoolemias moderadas¹⁰.

Quadro 1 – Composição referencial para a constituição das soluções hidro-alcoólicas sintéticas a utilizar

	SHAF	SHAE
Etanol Vínico	10% V.V.	10% V.V.
Acetaldeído	40,24g/ haa	–
Metanol	1 93,08g/ haa	–
Álcoois Superiores	225,74g/ hacl	–

* Valores legislados: Regulamento (CEE) 1576/89 do Conselho de 29 de Maio de 1989.

Quadro 2 – Composição qualitativa dos solutos e quantidades administradas em cada animal do respectivo grupo

	SHAF n = 6	SHAE n = 5
Etanol	250	250
Acetaldeído	1,7	–
Metanol	4,3	–
Alc. Superiores*	5,4	–

mg/ 100g de peso corporal; * butanol 2; n-propanol; isobutanol; álcool alílico; n-butanol e isopentanois.

Após completar 9 semanas de experiência os animais foram sacrificados por decapitação e procedeu-se de imediato à remoção de todo o pâncreas que foi fixado em soluto de formalina a 10%, após o que se procedeu à colheita de 2 fragmentos em cada caso, sendo processados segundo a técnica habitual e incluídos em parafina;

fizeram-se cortes de 5 µm que foram corados pela hematoxilina eosina e tricrômio de Masson para observação em microscopia óptica. Em alguns dos casos procedeu-se a congelamento de fragmentos dos quais se fizeram cortes que foram corados pelo *oil red* para reconhecimento dos lípidos. Foram também colhidos e submetidos aos mesmos métodos fragmentos de fígado destes animais (o resultado do estudo do fígado foi objecto de publicação¹¹) Na avaliação histológica foram considerados os seguintes parâmetros: esteatose, necrose das células acinares, dilatação dos ductos, presença de rolhões de material proteico no lume destes, infiltração por células inflamatórias no parênquima, fibrose, necrose gorda e inflamação peri-pancreática; a gravidade destas lesões foi graduada segundo uma escala arbitrária adaptada do trabalho de Sporman¹² (quadro 3). As pontuações atribuídas a cada um dos parâmetros estudados em cada pâncreas foram somadas (valor máximo possível: 29). Todos os cortes foram examinados sem conhecimento do grupo de experiência a que pertenciam. No tratamento estatístico para o estudo do significado da comparação das várias pontuações atingidas pelas lesões histológicas foi utilizado o teste não paramétrico de Mall - Whitney¹³.

Quadro 3 – Critérios de avaliação histológica

Parâmetros	Graduação	Pontuação
Esteatose	ligeira	1
	moderada	2
	intensa	3
	focal (< 5%)	3
Necrose Parenquimatosa	e/ou sublobular (<20%)	5
	e/ ou lobular (>20%)	7
Dilatação Ductal	<2 / corte	1
	>2 <5 / corte	2
	>5 / corte	3
Rolhões Intraluminais	<2 / corte	1
	>2 <5 / corte	2
	>5 / corte	3
Inflamação Parenquimatosa	ligeira	1
	moderada	2
	intensa	3
Fibrose	focal	1
	lobular	2
	difusa	3
Necrose gorda e inflamação peripancreática	focal	3
	multifocal	5
	difusa	7

Pontuação máxima possível 29 (em cada animal)

RESULTADOS

As composições qualitativas e quantitativas das duas soluções hidro-alcoólicas em ensaio não parecem ter

influenciado a captação *ad libitum* da alimentação nos grupos sob experiência e, sendo aquela semelhante à do grupo controlo, admite-se que todos os 3 grupos terão uma aquisição nutritiva e calórica similar, com ganho ponderal final em média de 190 gramas. O crescimento dos animais não parece influenciado pelo etanol (Quadro 4).

Quadro 4 – Parâmetros de desenvolvimento dos animais (média e d.p. dos grupos)

grupos	n	capitação alimentar média/semana (g)	peso corporal final (g)	ganho ponderal médio (g)
Controlo	5	193,9 ± 32,9	425,1 ± 12,6	192,7 ± 12,3
SHAF	6	196,7 ± 33,2	436,0 ± 10,8	207,2 ± 10,1
SHAE	5	210,8 ± 41,9	381,4 ± 14,1	188,6 ± 7,7

SHAF = solução hidro-alcoólica de etanol, metanol, acetaldedo e alc. superiores; SHAE = solução hidro-alcoólica de etanol

A frequência e a pontuação individual e total atingida pelas alterações microscópicas do pâncreas dos animais dos grupos de experiência e no grupo controlo estão expressas nos quadros 5 e 6 e o tratamento estatístico dos resultados no quadro 7. Em dois animais do grupo controlo há esteatose acinar de grau ligeiro e moderado e em dois, há um pequeno número de ductos dilatados e conteúdo de material proteico. Não se observam neste grupo outras alterações.

Quadro 5 – Frequência das alterações histológicas do pâncreas nos 3 grupos de animais

Histopatologia	SHAE n=5	SHAF n=6	Controlo n=5
Esteatose	3	5	2
Necrose	4	6*	0
Inflamação	4	6	0
Dilatação dos ductos	3	5	2
Rolhões proteicos	2	3	2
Fibrose	1	4	0
Inflamação e necrose gorda peripancreática*	4	6	0

* um caso com extensa necrose do parênquima pancreático; dois casos com necrose sublobular e substituição dos lóbulos por ductos proliferados.

Nos dois grupos de experimentação as alterações histológicas foram: deposição de lípidos e necrose das células acinares, infiltração por células inflamatórias, dilatação dos lumes de alguns ductos interlobulares (Fig. 1), por vezes acompanhada de depósito de rolhões de material proteico, fibrose parenquimatosa e inflamação do tecido peripancreático rodeando em algumas zonas focos de esteatonecrose (Fig. 2). A distribuição das áreas alteradas é difusa, embora haja zonas em que os ácinos não tem lesões. Os vacúolos de natureza lipídica são mais fre-

Quadro 5 – Frequência das alterações histológicas do pâncreas nos 3 grupos de animais

Histopatologia	SHAE n = 5	SHAF n = 6	Controlo n = 5
Esteatose	3	5	2
Necrose	4	6*	0
Inflamação	4	6	0
Dilatação dos ductos	3	5	2
Rolhões proteicos	2	3	2
Fibrose	1	4	0
Inflamação e necrose gorda peripancreática*	4	6	0

* um caso com extensa necrose do parenquima pancreático; dois casos com necrose sublobular e substituição dos lóbulos por ductos proliferados.

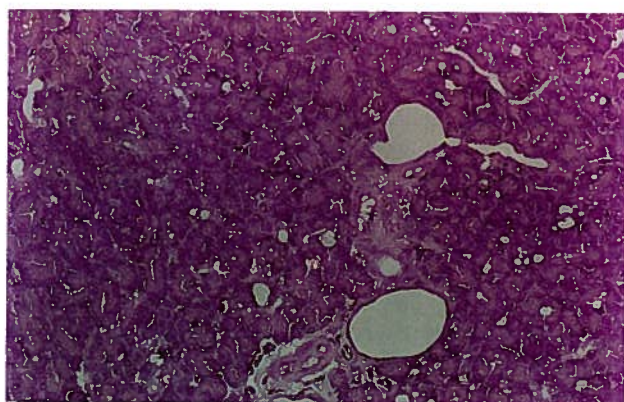


Fig. 1 – Depósitos de lípidos no citoplasma das células acinares; necrose focal destas; dilatação dos ductos interlobulares cujo epitélio é achatado. Grupo SHAE. H.&E. X160.

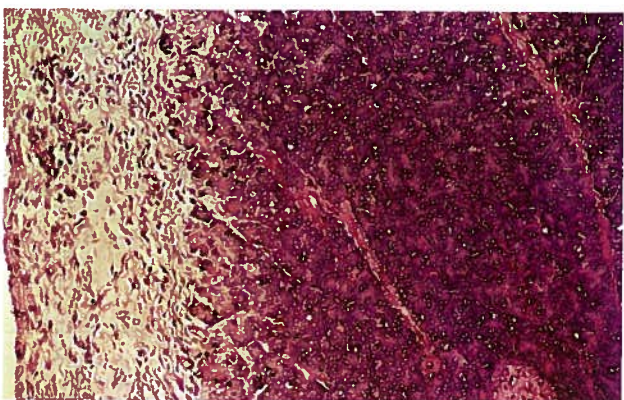


Fig. 2 – Inflamação dos tecidos peripancreáticos e necrose parenquimatosa na periferia do lóbulo. Grupo SHAE. X160.

quentemente pequenos e múltiplos e mais numerosos no polo apical das células acinares. Em três casos em que a esteatose é moderada ou intensa há células acinares cujo citoplasma está totalmente substituído por um único vacúolo que empurra o núcleo para o polo basal da célula. Um pequeno número de vacúolos corresponde muito provavelmente a vacúolos autofágicos pois contêm detri-

Quadro 6 – Pontuação das lesões pancreáticas nos 3 grupos de animais

Histopatologia	SHAE n=5	SHAF n=6	Controlo n=5
Esteatose	7	7	3
Necrose	12	28	0
Inflamação	4	8	0
Dilatação dos ductos	4	16	2
Rolhões proteicos	2	5	2
Fibrose	2	8	0
Inflamação e necrose gorda peripancreática	25	36	0
Pontuação total	56	108	7

tos celulares. Não há vacúolos lipídicos nas células ductais. A esteatose tem tendência a ser mais frequente e intensa nos grupos sob tratamento alcoólico.

As células acinares com necrose focal tem volume reduzido, citoplasma denso e núcleos pequenos com a cromatina disposta em granulações grosseiras e densas ou em picnose. Nestas células as granulações de zimogênio estão total ou parcialmente desaparecidas; nas células desgranuladas o citoplasma é basófilo e homogéneo. Há diminuição do número de granulações de zimogênio em células sem outras alterações, constituindo-se por vezes uma faixa basófila no polo basal destas células. A necrose das células acinares é em geral mais intensa na superfície dos lóbulos. A necrose é mais intensa no grupo SHAF do que no grupo SHAE, e no primeiro grupo num dos ratos observa-se necrose lobular extensa e esteatonecrose de tecido adiposo interlobular (Fig. 3), e em outros dois há necrose sublobular com desaparecimento de grupos de ácinos (Fig. 4); nestas áreas há ductos, infiltração por linfócitos e granulócitos neutrófilos e fibrose (Fig. 5).

A inflamação e necrose do tecido adiposo peripancreático e necrose gorda consideradas, tal como a necrose do parenquima, alterações específicas da pancreatite, observam-se nos dois grupos de experimentação, mas tendem a ser mais severas de modo geral no grupo SHAF; de

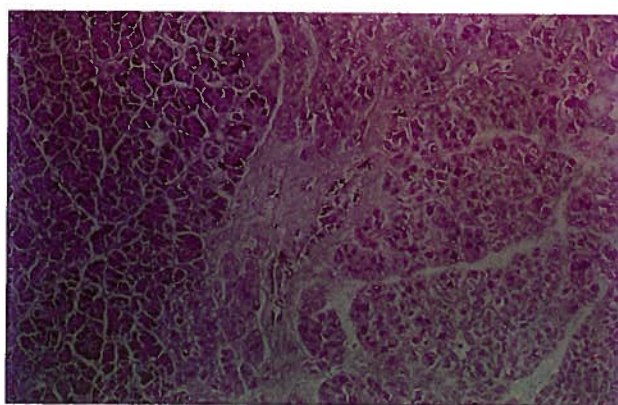


Fig. 3 – Necrose lobular extensa e esteatonecrose peripancreática. Grupo SHAF; H.&E. X 63.

Quadro 7- Estudo estatístico da significância (comparação das pontuações das alterações histológicas)

Grupos	Esteatose	Necrose	Inflamação	DU. Ductal	Mal. Proteico	Fibrose	Infl.P Pancreática	TOTAL
Controlo [†] (n=5) SHAE (n=5) SHAF (n=5)	0,4453	0,0028*	0,0039*	0,0078*	0,6951	0,0237**	0,0028*	0,0028*
Controlo/ /SHAE [†]	0,3092	0,0143**	0,0143**	0,4189	1,000	0,3173	0,0027*	0,0078*
Controlo/ SHAF ^{††}	0,2458	0,0036*	0,0031*	0,0062*	0,4799	0,0116**	0,0032*	0,0057*
SHAE/ /SHAF ^{††}	0,7032	0,0268*	0,1028	0,0117*	0,4799	0,0941 ⁰	0,1247	0,0436**

[†] Kruskal-Wallis 1 Way Anova; ^{††} Mann-Whitney U - Wilcoxon Rank Sum W Test 13; ** Significativo a um nível de significância (5%) $p < 0,05$; * Significativo a um nível de significância (1%) $p < 0,01$; ⁰ Não significativo a um nível de significância de 5%, significativo a um nível de 10% $0,05 < p < 0,10$

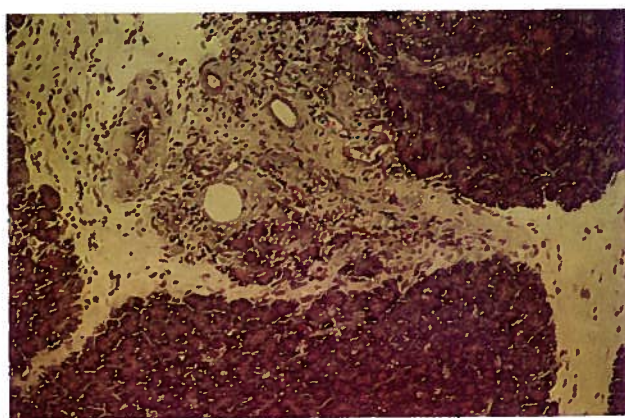


Fig. 4 – Inflamação e fibrose dum lóbulo pancreático com desaparecimento de grande parte do mesmo, possivelmente na sequência de necrose; granuloma lipofásico. Grupo SHAF; H.&E. X160.

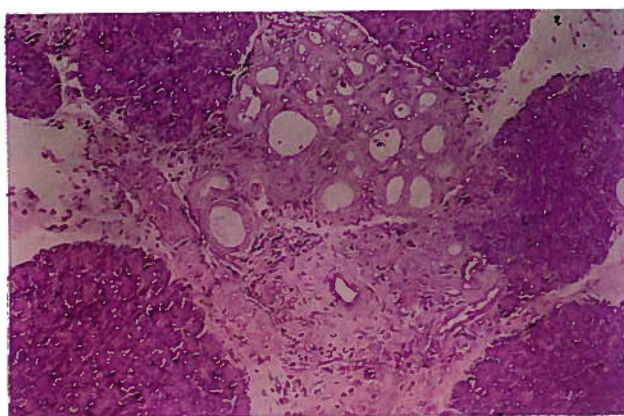


Fig 5 – Desaparecimento de um lóbulo pancreático substituído por fibrose, células inflamatórias com predomínio de linfócitos e ductos pancreáticos. Grupo SHAF; H.&E. X160.

facto na comparação das pontuações atingidas nos vários parâmetros avaliados nos grupos SHAF e SHAE adquire significância estatística a necrose, a dilatação ductal e a pontuação total das lesões observadas (quadro 7).

DISCUSSÃO

Comparado com o fígado, o pâncreas mantém uma reduzida acessibilidade ao estudo da sua fisiopatologia.

A etiopatogenia da doença pancreática alcoólica é controversa ainda ¹⁴⁻¹⁹ e grande parte do seu conhecimento fundamenta-se na área da investigação experimental no domínio da toxicologia. A magnitude da biotransformação do álcool no fígado tem desfavorecido a importância da capacidade metabólica do etanol no tecido extra-hepático.

Vários trabalhos sugerem que o pâncreas é capaz de participar na metabolização do álcool ^{5,19-21,23,24}. No rato o etanol é metabolizado por via oxidativa, álcool desidrogenase dependente, nas células acinares, onde estimula a síntese lipídica e é inibida a oxidação dos ácidos gordos com a consequente deposição de gordura ²². Por outro lado, os produtos desta oxidação do etanol aumentam a fragilidade das ultra estruturas das células pancreáticas ²⁵.

Sob efeito do álcool constatou-se que no fígado e outros órgãos, nomeadamente no pâncreas, existem níveis elevados de éster etílico dos ácidos gordos e significativa actividade enzimática de uma sintetase específica, que suporta uma metabolização não oxidativa do etanol ^{26,27}, parecendo existir uma associação positiva entre aqueles níveis, as lesões observadas e a ingestão de álcool ²⁵. Estes ésteres assim gerados têm grande agressividade para a função mitocondrial e, sendo capazes de inibir a esterificação do colesterol promovem o depósito de gordura celular ²⁸.

Assim, as duas vias de metabolização oxidativa e não oxidativa do etanol concorrem para a patogenia da lesão orgânica alcoólica no pâncreas.

A álcool-dehidrogenase (ADH) tem grande especificidade para a metabolização de múltiplas substâncias químicas incluindo os álcoois alifáticos primários e secundários, aldeídos, polifenóis e ésteres ²⁹. Por outro lado, interessa conhecer que, no estudo da actividade da ADH na metabolização oxidativa de vários álcoois no pâncreas do rato, tomando como referência a metabolização de 100% de etanol, a actividade oxidativa do metanol é nula; a do 1-propanol é de 96%; a do 1-butanol é de 148%; a do 1-pentanol é

de 210% e do 2-propanol é de 196%, sendo estes álcoois superiores mais tóxicos que o etanol²¹.

Do acetaldeído (metabolito do etanol), que tem sido largamente implicado na patologia orgânica do abuso de álcool sabe-se, pelo menos, que inibe no pâncreas a síntese proteica em concentrações de 1mmol/l^{30,31} e, sendo neste órgão a actividade da aldeído-dehidrogenase (ALDH) muito baixa²¹, poderá haver acumulação deste aldeído que é 10 a 30 vezes mais citotóxico que o etanol²⁰ e, em experimentação mesmo em concentrações mínimas induz lesões estruturais no órgão³¹. Quanto ao metanol, conhece-se no homem o seu efeito tóxico directo no pâncreas^{32,33} e, não sofrendo metabolização no tecido pancreático do rato é de suspeitar o seu efeito agressivo no pâncreas do presente modelo experimental.

O factor dietético tem de ser equacionado na doença pancreática alcoólica pois uma dieta hiperproteica tem influência no desenvolvimento das lesões experimentais no órgão^{33,35,36} e a dieta hiperlipídica sob consumo de álcool provoca marca de disfunção do órgão e intensifica a esteatose^{1,6,38}. No presente ensaio o teor proteico ingerido é normal e, apesar do baixo teor lipídico da dieta vem a desenvolver-se nos grupos sob experiência esteatose acinar mais marcada que no controlo, o que é consistente com a bem conhecida citotoxicidade do etanol^{37,39} independentemente da via de administração do álcool^{24,40}.

Assim conjugam-se fundamentos para o pertinente juízo da análise experimental ensaiada.

Os achados histopatológicos, de distribuição difusa pelo órgão (necrose, inflamação, dilatação ductal, rolhões proteicos ductais, fibrose, necrose do tecido adiposo e inflamação peri-pancreáticas) em ambos os grupos sob tratamento alcoólico prolongado, reproduzem grande parte das lesões pancreáticas dos doentes alcoólicos crónicos com pancreatite. No entanto, estas lesões são mais frequentes e mais graves no grupo de animais sob intoxicação com os vários constituintes voláteis coexistentes em bebidas alcoólicas habituais; são de realçar a necrose, a dilatação ductal e a pontuação total (somatório da graduação quantitativa das lesões) por adquirirem significado não aleatório em relação ao grupo sob intoxicação apenas com etanol.

A persistência da exposição e o sinergismo dos vários agentes químicos em ensaio, parecem favorecer o desenvolvimento da frequência e gravidade das lesões, pois os resultados apoiam a ideia do reforço da toxicidade do etanol (pré-requisito) por acção acrescida daqueles agentes (toxicidade combinada) como sugere o presente estudo.

AGRADECIMENTO

Agradecemos ao Sr. Eng. José Manuel Lopes responsável pelo Laboratório de Controlo de Qualidade I.V.V. - Ministério da Agricultura a disponibilidade e o cuidado na preparação e controlo dos produtos alcoólicos para o ensaio.

A Senhora D. Teresa Venancio Silva, técnica do INSA, agradecemos toda a colaboração e excelente trabalho nas tarefas do Biotério do Núcleo de Alcoologia (INSA), assim como agradecemos à Sra. D. Helena Simões o processamento da técnica histológica.

Expressamos o nosso reconhecimento ao Dr. Paulo Nogueira e Dr. Marinho Falcão, responsável pelo Centro de Epidemiologia e Bioestatística do INSA, pelo tratamento matemático dos resultados.

BIBLIOGRAFIA

1. SARLES H: An international survey in nutrition and pancreatitis. *Digestion* 1973; 9:389-403
2. DREILING DA, KOLLER M: The natural history of alcoholic pancreatitis: update 1985. *Mt. Sinai Med* 1985; 52:340-342
3. PEREZ JF, SINGH M, BOCKMAN DE, HAHN HIC: Interaction between marginal zinc deficiency and chronic alcoholism: pancreatic structure and function in rats in vitro. *Pancreas* 1986; 1: 254-263
4. MALAGELADA JR: The pathophysiology of alcoholic pancreatitis. *Pancreas* 1986; 1:270-278
5. Steer M, Neldolesi J: The cell biology of experimental pancreatitis. *N. Engl J Medicine* 1987; 316:144-150
6. RÂMÕ OJ, SPAJA SARKKINEN M, JALOVAARA P: Experimental acute pancreatitis in rats receiving different diets and ethanol. *Res Exp Med* 1987; 187: 33-41
7. TSUKAMOTO H, TOWNER SJ, YN GSM, FRENCH SW: Potentiation of ethanol-induced pancreatic injury by dietary fat. *Am J Pathol* 1988; 131: 246-257
8. SINGH M: Alcoholic pancreatitis in rats fed ethanol in a nutritionally adequate liquid diet. *Int J Pancreatol* 1987; 2: 311-324
9. WILSON C, IMRIE CW: Experimental models of acute pancreatitis in: Johnson CD; Imrie CW(eds). *Pancreatic Disease, Progress and Prospects*; SpringerVerlag 1991; 227-239
10. GVOZDJAK A, BROVIC F, BADEY, KRUTY F, NIEDERLAND TR: Myocardial cell damage due to ethanol - Recent Advances on Cardiac Structure and Metabolism. In: Harris P; Bing RJ and Fleckenstein: *Biochemistry and Pharmacology of Myocardial Hypertrophy, Hypoxia, and Infarction*, Baltimore: A University Park Press 1976; 7: 451-57
11. PENEDA J, BAPTISTA A, LOPES JM: Interação de constituintes das bebidas alcoólicas na promoção da lesão hepática. *Acta Méd Port* 1993; 6: 577-581
12. SPORMAN H, SOKOLOWSKI A, LEIKO G: Effect of temporary ischemia upon development and histological patterns of acute pancreatitis in rat. *Path Res Pract* 1989; 184: 507-513
13. SIEGEL S: *Nonparametric statistics for the behaviour sciences*, New York: McGraw-Hill 1956
14. MATSUNO S, KANO IC, MIYAGAWA K et al: Effects of long term intravenous administrations of ethanol on rat pancreas. *Tohoku J Exp Med* 1983; 141: 77-89
15. TANAKA T, ICHIBD Y, MIURA Y et al: Pathogenesis of chronic pancreatitis. *Am J Gastroenterology* 1993; 88: 321-322
16. SINGH M: Pathophysiology of alcohol-related pancreatitis. *Semin Gastrointest Dis* 1991; 2:140-151
17. BORDALO O, GONÇALVES D, NORONHA M et al: Newer concept for the pathogenesis of chronic alcoholic pancreatitis. *Am J Gastroenterol* 1977; 68: 278-285
18. NORONHA M, SALGADINHO A, ALMEIDA MJF et al: Alcohol and the pancreas: clinical associations and Histopathology of minimal pancreatic inflammation. *Am J Gastroenterol* 1982; 72: 827-832
19. CLEMENTE F, ESTIVAL A, DURAND S, RIBET A: Biochemical events in rat pancreatic cells in acute and chronic alcohol intoxications, in: Gyr KF, Singer MV, Sarles H, eds. *Pancreatitis. Concepts and Classification: Excerpta Medica* 1984: 111-116
20. TURMA DJ, ZETTERMAN RK, SORRELL MF: Inhibition of glycoprotein secretion by ethanol and acetaldehyde in rat liver slices. *Biochem Pharmacol* 1980; 29: 35-38
21. ESTIVAL A, CLEMENTE F, RIBET A: Ethanol metabolism by the rat pancreas. *Toxicology and Applied Pharmacology* 1981; 61: 153-165
22. DURAND S, ESTIVAL A, CLEMENTE F et al: The decrease of the non secretory phospholipase A in rat pancreas during a chronic alcohol intoxication. *Biomed Pharmacol Thera* 1982; 36: 254-256
23. RAMO OJ, JALOVAARO P, MOKELA A, SCHRODER T: The effect of fat-rich diet and chronic ethanol ingestion on ascitic fluid and plasma enzyme activities in acute pancreatitis in rats. *Acta Chi Scand* 1987; 153: 203-207
24. SARLES H, BERNARD JP, GULLO L: Pathogenesis of chronic pancreatitis. *Gut* 1990; 31: 629-632.
25. WILSON JS, APTE MV, THOMAS MC et al: Effects of ethanol, acetaldehyde and cholesteryl esters on pancreatic lysosomes. *Gut* 1992; 33: 1099-1104

26. LAPOSATA EA, LANGE LG: Presence of nonoxidative ethanol metabolism in human organs commonly damaged by ethanol abuse. *Science* 1986; 231: 497-499
27. CRABB DW, LANDS W: Highlights of RSA symposium on Enzymes of Alcohol Metabolism. *Alcohol Clin Exp Res* 1992; 16: 870-874
28. LANGE LG: Nonoxidante ethanol metabolism. Formation of fatty acid ethylesters by cholesterol esterase. *Proc Natl Acad Sci* 1982; 79: 3954-3957
29. BLAIR AH, VALLEE BL: Some catalytic properties of human liver alcohol dehydrogenase. *Biochemistry* 1966; 5: 2026-2034
30. LEVIN MB, WONG A, DEVENCY CW, SANKARAN H: Reversible acetaldehyde inhibition of A23187- stimulated amylase secretion in isolated rat pancreatic acini. *FEBS Lett* 1985; 184: 259-262
31. MAJUNDAR APN, HAIMAN MU, ZYLBET BA et al: Acetaldehyde inhibition of protein synthesis in isolated rat pancreatic acini. *Toxicol Appl Pharmacol* 1986; 83: 86-94
32. BENETT LL, CARY FH, MICHELL GL, et al: Acute methyl alcohol poisoning: a review based an experience in an outbreak of 323 cases. *Medicine* 1953; 32: 431-463
33. GEOKAS MC: Ethanol and the pancreas. *Medical Clinics North America* 1984; 68: 57-75
34. MAKI T, KOKISAKI G, SATO T, SAITO Y, SUDA Y: Effect of diet on experimental pancreatitis in rat Tohoku *J Exp Med* 1967; 92: 301-309
35. KORSTEN MA, WILSON JS, SAELI J, LIEBER CS: Protein deficiency abolishes the stimulatory effect of ethanol on protein synthesis in rat pancreas. *Gastroenterology*, 1988; 94: A237
36. GUY O, ROBLER-DIAZ-G, ADRICH HZ et al: Protein content of precipitates with chronic calcifying pancreatitis. *Gastroenterol* 1983; 84: 102-107
37. SINGH M: Effect of chronic ethanol feeding on pancreatic enzyme secretion in rats in vitro. *Dig Dis Sci* 1983; 28: 117-123
38. SINGH M: Alcoholic pancreatitis in rats fed ethanol in a nutritionally adequate liquid diet *Int J Pancreatol* 1987; 2: 311-324
39. JOFFE S, FERRIE M, O'HARA R: The effect of ethanol on plasma biochemistry and the pancreas in the rat. *Acta Hepatogastroenterol* 1979; 26: 323-325
40. LETKO G, NOSOFKOV T, SIECH M: Transition of rat pancreatic juice edema into acute pancreatitis by single ethanol administration. *Pathol Res Pract* 1991; 187: 247-250