UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

JANAINA APARECIDA SIMPLICIO

**Participação do TNF- α nas disfunções vasculares induzidas pelo
consumo crônico de etanol: envolvimento do tecido adiposo
perivascular**

Ribeirão Preto

2017

JANAINA APARECIDA SIMPLICIO

Participação do TNF- α nas disfunções vasculares induzidas pelo consumo crônico de etanol: envolvimento do tecido adiposo perivascular

Versão Original

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Carlos Renato Tirapelli

Ribeirão Preto

2017

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Simplicio, Janaina Aparecida

Participação do TNF- α nas disfunções vasculares induzidas pelo consumo crônico de etanol: envolvimento do tecido adiposo perivascular. Ribeirão Preto, 2017.

87 p. : il. ; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP.
Área de concentração: Farmacologia.

Orientador: Tirapelli, Carlos Renato.

1. Etanol. 2. Inflamação. 3. Estresse oxidativo. 4. TNF- α

Nome: SIMPLICIO, Janaina Aparecida.

Título: Participação do TNF- α nas disfunções vasculares induzidas pelo consumo crônico de etanol: envolvimento do tecido adiposo perivascular

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Farmacologia

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____	Instituição: _____
Julgamento: _____	Assinatura: _____

Prof. Dr. _____	Instituição: _____
Julgamento: _____	Assinatura: _____

Prof. Dr. _____	Instituição: _____
Julgamento: _____	Assinatura: _____

Prof. Dr. _____	Instituição: _____
Julgamento: _____	Assinatura: _____

Prof. Dr. _____	Instituição: _____
Julgamento: _____	Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Ao grande responsável pelo desenvolvimento deste trabalho! Aquele que me ensinou a ter humildade, coragem e confiança. Aquele que me proporcionou a vida. Aquele que eu chamo de Meu Porto Seguro, Meu Amado e Querido Deus!

Sem Ti eu jamais teria chegado até aqui! Sem Ti eu nada seria!

À Deus não só dedico este trabalho, como também dedico a minha vida, o meu conhecimento, o que sou e possuo, e que tudo isso possa ser usado para o bem da ciência, em virtude do próximo, com o intuito de ensinar e ajudar, sempre com objetivos nobres e verdadeiros.

AGRADECIMENTOS

À Deus por tudo! Não tenho palavras que descrevam meus sinceros agradecimentos ao Ser mais grandioso deste Universo, que com sua força onipresente soube guiar meus passos dando-me força para cultivar as sementes e regozijar desta colheita. Sem Ele eu jamais teria chegado até aqui! Obrigada meu amado Deus por nunca desistir de mim!

Aos meus amados pais, Lucy e Moacyr, pela educação proporcionada, pelo carinho oferecido, pela confiança em mim depositada, pelos gestos solidários ao longo destes anos. Mãe, obrigada por me confortar nos momentos que eu mais precisei, obrigada pelo colo e pelas palavras de sabedoria que me ajudaram a seguir em frente. Pai, obrigada por me guiar aos caminhos do conhecimento, por me achar tão capaz e sempre apoiar minhas escolhas. O amor de vocês é essencial para a minha vida e minhas conquistas. Amo vocês incondicionalmente!

Ao meu grande companheiro Zeino, por sempre acreditar em mim, apoiar minhas escolhas, me confortar e me proporcionar tanto carinho. Obrigada por toda sua dedicação, por sua capacidade de compreensão e pelo aguardo paciente nos momentos de ausência. Amo-te sempre e para sempre!

Ao meu orientador, Prof. Dr. Carlos Renato Tirapelli, pela amizade, pela oportunidade de aprendizado, pelo profissionalismo e pela orientação ao longo desses anos que foram essenciais para o desenvolvimento desta tese e para meu crescimento acadêmico. Meus sinceros agradecimentos.

Aos membros da banca examinadora, professores Fernando Silva Carneiro, Michele M. de Castro, Eliana Hiromi Akamine e Cristina Antoniali, pela disponibilidade, contribuições e sugestões para a melhoria deste projeto.

Às minhas eternas amigas Carla Brigagão, Letícia Nogueira e ao meu grande amigo Gabriel, um presente que a USP me deu para a eternidade. Obrigada por me ouvirem, me ajudarem e me apoiarem sempre! Obrigada por cada palavra e por toda ajuda concedida ao longo desses anos! Mesmo com a distância, sinto-me abraçada diariamente por vocês! Vocês fazem parte do meu dia e da minha vida! Amo vocês!

Aos meus amados “pupilos” Marcelo Nakashima e Paola Salamanca por me ensinarem a ensinar e aprender. Obrigada por todo apoio e amparo oferecido para o desenvolvimento deste trabalho e para o meu crescimento. Vocês moram eternamente em meu coração.

Aos amigos que a USP me proporcionou, em especial: Carla Ceron, Wanessa Awata, Paulinho, Ulisses Hipólito, Sthefany Ricci, Juliana, Patrícia Passaglia, Felipe Faim, Joice Muniz, Katia Colombo, Ana Paula e Natália Almeida. Obrigada por fazerem parte da minha vida e tornarem o meu mundo tão especial.

Aos meus lindos sobrinhos, Luciano e Davi, por existirem e serem minha fonte de inspiração para a realização deste trabalho. Mesmo havendo distância, vocês moram em meu coração.

Ao professor Thiago Mattar Cunha pela co-orientação e sugestões para o desenvolvimento deste trabalho.

À Vanessa Borges pela ajuda no experimento de MPO, pelas conversas e conselhos durante a execução deste experimento.

À Soninha, por todo o suporte com os documentos da pós-graduação, por toda paciência e amizade durante esses seis anos.

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia, José Waldick Ramon, Fátima Helena Petan e Gislaine P.de Moraes Marques, por toda paciência e apoio prestado.

À professora Cláudia Padovan pelo fornecimento de seu laboratório para realização de experimentos presentes neste trabalho.

À Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP) - USP pela oportunidade de realizar o doutorado, participar de reuniões científicas nacionais e internacionais, adquirir conhecimento e senso crítico, imprescindíveis para meu crescimento pessoal e profissional.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – 2014/0109595-0009-3) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio

financeiro que foram imprescindíveis para meu desenvolvimento científico e pela credibilidade para realização deste trabalho.

“Jamais considere seus estudos como uma obrigação, mas como uma oportunidade invejável para aprender a conhecer a influência libertadora da beleza do reino do espírito, para o seu próprio prazer pessoal e para proveito da comunidade à qual seu futuro trabalho pertencer”.

Albert Einstein, aos estudantes de Princeton, EUA.

RESUMO

SIMPLICIO, JA. **Participação do TNF- α nas disfunções vasculares induzidas pelo consumo crônico de etanol: envolvimento do tecido adiposo perivascular** [tese]. Ribeirão Preto: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo; 2017.

O consumo crônico de etanol é um importante fator de risco no desenvolvimento de doenças cardiovasculares induzindo elevação da pressão arterial, inflamação, disfunção vascular e aumento do estresse oxidativo em vários tecidos. Além disso, o consumo crônico de etanol induz aumento dos níveis de Fator de necrose tumoral- α (TNF- α). O tecido adiposo perivascular (*Perivascular adipose tissue* - PVAT) é reconhecido como uma importante fonte de adipocinas e citocinas pró-inflamatórias e esse tecido está envolvido na fisiopatologia de diferentes doenças cardiovasculares. A hipótese deste trabalho é a de que o consumo crônico de etanol estimule a produção de TNF- α no tecido vascular, que por sua vez, induzirá um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), redução da biodisponibilidade do óxido nítrico (NO), inflamação vascular, prejuízo na função do PVAT, alteração da reatividade vascular e aumento da pressão arterial. Portanto, o objetivo deste estudo foi investigar a participação do TNF- α nas disfunções vasculares induzidas pelo consumo de etanol e avaliar o papel do PVAT em tais danos. O trabalho mostra que o consumo crônico de etanol por 12 semanas induziu aumento da pressão arterial sistólica (PAS) em camundongos machos C57BL/6 (*Wild Type* –WT) e este aumento foi menor nos animais nocautes para os receptores R1 do TNF- α (TNFR1^{-/-}). O tratamento com etanol não alterou o relaxamento vascular induzido por acetilcolina e nitroprussiato de sódio (NPS). O consumo de etanol induziu aumento da geração de ânion superóxido (O₂⁻), aumento das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e redução dos níveis de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em aortas com e sem PVAT (PVAT⁺ e PVAT⁻, respectivamente) de animais WT, mas não em camundongos TNFR1^{-/-}. Houve aumento da atividade da catalase (CAT) e da superóxido dismutase (SOD) em aorta PVAT⁻ e PVAT⁺ e redução dos níveis plasmáticos da glutathiona reduzida (GSH) em animais WT, mas não em TNFR1^{-/-}, após o consumo crônico de etanol. Não houve alteração na atividade da glutathiona peroxidase (GPx) na aorta dos grupos estudados após o consumo de etanol. Observou-se redução dos níveis de nitrato/nitrito (NOx) em aortas de animais WT após o consumo de etanol, porém não em camundongos TNFR1^{-/-}. O consumo de etanol gerou aumento tecidual das citocinas TNF- α e IL-6 e aumento da atividade da mieloperoxidase (MPO), evidenciando uma exacerbada inflamação vascular e indicando migração de neutrófilos para o tecido aórtico. Tais alterações não foram observadas em animais TNFR1^{-/-}. Os resultados mostram pela primeira vez a participação do TNF- α no aumento da pressão arterial, no aumento do estresse oxidativo e nos prejuízos vasculares induzidos pelo consumo crônico de etanol. O tecido adiposo perivascular não apresentou qualquer efeito benéfico nas alterações supracitadas.

Palavras chaves: Etanol. Inflamação. Estresse oxidativo. Tecido Adiposo Perivascular. TNF- α .

ABSTRACT

SIMPLICIO, JA. **Role of TNF- α in vascular dysfunctions induced by chronic ethanol consumption: involvement of perivascular adipose tissue** [thesis]. Ribeirão Preto: Medical School, University of São Paulo; 2017.

Chronic ethanol consumption is an important risk factor in the development of cardiovascular diseases, inducing increased blood pressure, inflammation, vascular dysfunction and enhanced oxidative stress in several tissues. Furthermore, chronic ethanol consumption induces the production of Tumor necrosis factor- α (TNF- α). Perivascular adipose tissue (PVAT) is known as an important source of adipokines and proinflammatory cytokines. This tissue is involved in the pathophysiology of different cardiovascular diseases. The hypothesis of this work is that the chronic ethanol consumption stimulates the production of TNF- α , which in turn, will induce an increase in reactive oxygen species (ROS) generation, nitric oxide (NO) reduction, vascular inflammation, impairment of PVAT function, alterations of vascular reactivity and increased blood pressure. Therefore, the aim of this study was to investigate the role of TNF- α in chronic ethanol consumption-induced vascular dysfunctions and to evaluate the role of PVAT in such damages. This study demonstrated that chronic ethanol consumption for 12 weeks induced an increase in systolic blood pressure (SBP) in C57BL/6 mice (wild type-WT) and this increase was blunted in TNF- α receptor 1 knockout mice (TNFR1^{-/-}). There was no change in vascular relaxation induced by acetylcholine and sodium nitroprusside (NPS). Ethanol consumption increased the superoxide anion (O₂⁻) generation, thiobarbituric acid reactive species (TBARS) and reduction of hydrogen peroxide (H₂O₂) levels in aorta without and with PVAT (PVAT⁻ and PVAT⁺, respectively) from WT animals, but not from TNFR1^{-/-} mice. There was an increase in catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) activities in aorta PVAT⁻ and PVAT⁺, decrease on plasma reduced-glutathione (GSH) levels from ethanol-treated WT but not in TNFR1^{-/-}. Ethanol consumption did not change glutathione peroxidase (GPx) activity in any group. Nitrate/nitrite (NOx) aortic levels were decreased in WT animals, but not in TNFR1^{-/-} after chronic ethanol consumption. Ethanol consumption increased TNF- α , IL-6 cytokines and myeloperoxidase activity (MPO) which suggest a strong vascular inflammation and migration of neutrophils into the aortic tissue. Such changes were not observed in TNFR1^{-/-} mice. The results show for the first time the participation of TNF- α in the increase of blood pressure, increase of oxidative stress and vascular dysfunction induced by the chronic ethanol consumption. The perivascular adipose tissue had no beneficial effect on these changes.

Keywords: Ethanol. Inflammation. Oxidative stress. Perivascular adipose tissue. TNF- α

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
(NH ₄) ₂ SO ₄	Sulfato de amônio
μL	Microlitros
μm	Micrômetros
μmol/L	Micromol por litro
CaCl ₂	Cloreto de Cálcio
CD120a	Cluster of Differentiation 120 ^a
CD120b	Cluster of Differentiation 120b
CO ₂	Dióxido de Carbono
COX-2	Ciclooxigenase-2
DAF-2DA	diacetato de 4,5-diaminofluoresceína
DCFH-DA	diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína
DHE	Dihidroetídeo
dL	Decilitros
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTNB	Ácido 5,5-ditiobis (2-nitrobenzóico)
Duox1	Dual oxidase 1
Duox2	Dual oxidase 2
EC ₅₀	Logaritmo negativo da concentração molar do agonista que promove 50% do efeito máximo
EDTA	Ácido etileno-diamino-tetracético
EGTA	Ácido etileno-glicol-tetracético
E _{max}	Efeito máximo
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
ERO	Espécies reativas de oxigênio
G	Gramas
gp91phox	NAD(P)H protótipo ou Nox2
GPx	Glutathiona peroxidase
GR	Glutathiona redutase
GSH	Glutathiona reduzida
GTPases	Enzimas hidrolases que hidrolizam o GTP

H ⁺	Hidrogênio
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HA	Hipertensão arterial
HRP	peroxidase <i>horseradish</i>
HTAB	Brometo de hexa-1,6-bis-deciltrimetilamônio
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular-1
IL-10	Interleucina 10
IL-1β	Interleucina 1β
IL-6	Interleucina 6
iNOS	Enzima óxido nítrico sintase induzível
KCl	Cloreto de potássio
kDa	Quilodaltons
Kg	Quilogramas
KH ₂ PO ₄	Fosfato monopotássico
KH ₂ PO ₄	Fosfato de Potássio Dibásico Anidro
m	Metros
M	Molar
MDA	Malonaldeído
MEC	Matriz extracelular
MG	Miligramas
MgSO ₄	Sulfato de Magnésio
mL	Mililitros
Mm	Milímetros
mmHg	Milímetro de mercúrio
mmol/L	Milimol por litro
MPO	Mieloperoxidase
NaCl	Cloreto de sódio
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NAD(P)H oxidase	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NaHCO ₃	Bicarbonato de Sódio
NF-κB	Fator nuclear kappa B
NO	Óxido Nítrico

Nox1	NADPH oxidase 1
Nox2	NAD(P)H protótipo ou gp91phox
Nox3	NADPH oxidase 3
Nox4	NADPH oxidase 4 ou renal oxidase
Nox5	NADPH oxidase 5
OMS	Organização Mundial de Saúde
O ₂	Oxigênio
O ₂ ⁻	Ânion superóxido
°C	Graus Celsius
ONOO ⁻	Peroxinitrito
p22phox	Unidade catalítica da NAD(P)H oxidase
p40phox	Unidade catalítica da NAD(P)H oxidase
p47phox	Unidade catalítica da NAD(P)H oxidase
p55	p55 TNF receptor
p67phox	Unidade catalítica da NAD(P)H oxidase
p75	p75 TNF receptor
PAD	Pressão arterial diastólica
PAS	Pressão arterial sistólica
PBS	Tampão fosfato em salina 0,15 M
pD ₂	Logarítmo negativo da EC ₅₀
Pg	Picogramas
pH	Potencial hidrogeniônico
PVAT	Perivascular adipose tissue
PVAT ⁻	Artéria aorta sem tecido adiposo perivascular
PVAT ⁺	Artéria aorta com tecido adiposo perivascular
Rac	Subfamília da família Rho de GTPases
Renox	Renal oxidase ou Nox4
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	Ácido ribonucléico mensageiro
SENAD	Secretaria Nacional Antidrogas
TBARS	Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
TMB	3,3', 3,3'-tetrametilbenzidina

TNFR1	Tumor necrosis factor receptor 1
TNFR1 ^{-/-}	Nocautes para o receptor R1 do TNF- α
TNFR2	Tumor necrosis factor receptor 2
TNFRSF1A	TNF Receptor Superfamily Member 1A
TNFRSF1B	TNF Receptor Superfamily Member 1B
TNF- α	Fator de necrose tumoral- α
URL	Unidades relativas de luz
VCAM-1	Molécula de adesão vascular-1
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
WT	Wild type
$\mu\text{mol/L}$	Micromolol por litro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
2. OBJETIVOS.....	26
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	28
3.1 Animais	29
3.2 Grupos experimentais.....	29
3.3 Evolução temporal do peso dos animais.....	30
3.4 Evolução temporal do consumo de ração pelos animais.....	30
3.5 Evolução temporal da ingestão de líquidos pelos animais	30
3.6 Avaliação da PAS.....	31
3.7 Determinação dos níveis sanguíneos de etanol.....	31
3.8 Estudo funcional da reatividade vascular em aorta de camundongo	32
3.9 Determinação da formação de ERO.....	33
3.9.1 Avaliação de O_2^- <i>in situ</i> (DHE)	33
3.9.2 Detecção de O_2^- pelo método de quimioluminescência da lucigenina.....	33
3.9.3 Avaliação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no plasma e em tecido aórtico	34
3.9.4 Avaliação dos níveis teciduais de peróxido de hidrogênio (H_2O_2)	34
3.9.5 Avaliação de H_2O_2 <i>in situ</i> (DCFH-DA).....	35
3.10 Determinação da capacidade antioxidante	36
3.10.1 Avaliação da atividade plasmática e tecidual da superóxido dismutase (SOD)	36
3.10.2 Avaliação da atividade tecidual e plasmática da catalase (CAT).....	36
3.10.3 Avaliação da atividade tecidual da glutatona peroxidase (GPx).....	37
3.10.4 Avaliação dos níveis plasmáticos e teciduais de glutatona reduzida (GSH) ...	37
3.11 Determinação dos níveis de NO.....	38
3.11.1 Avaliação dos níveis plasmáticos e teciduais de nitrato/nitrito (NOx)	38
3.11.2 Avaliação dos níveis de NO <i>in situ</i> (DAF-2DA)	38
3.12 Determinação dos níveis plasmáticos e teciduais de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10 ...	39
3.13 Determinação da atividade tecidual da mieloperoxidase (MPO)	40
3.14 Análise estatística	40
4. RESULTADOS.....	41
4.1. Efeito do tratamento crônico com etanol sobre a evolução temporal do peso dos animais	42
4.2. Efeito do tratamento crônico com etanol sobre a evolução temporal do consumo de ração	42
4.3. Efeito do tratamento crônico com etanol sobre a evolução temporal da ingestão de líquido	43
4.4. Avaliação dos níveis sanguíneos de etanol	44
4.5. Participação do TNF- α sobre a PAS após o tratamento crônico com etanol	44

4.6. Participação do TNF- α sobre o estudo funcional da reatividade vascular em aorta após o consumo de etanol.....	45
4.6.1. Participação do TNF- α sobre a curva concentração-efeito para acetilcolina.....	45
4.6.2. Participação do TNF- α sobre a curva concentração-efeito para NPS após o consumo crônico de etanol.....	46
4.7. Participação do TNF- α sobre a formação de ERO após o consumo crônico de etanol.....	48
4.7.1. Participação do TNF- α sobre a formação de O ₂ ⁻ <i>in situ</i> após consumo de etanol.....	48
4.7.2. Participação do TNF- α sobre a geração de O ₂ ⁻ após o consumo crônico de etanol.....	48
4.7.3. Participação do TNF- α sobre os níveis de TBARS após o consumo de etanol.....	49
4.7.4. Participação do TNF- α sobre os níveis teciduais de H ₂ O ₂ após o consumo crônico de etanol.....	50
4.7.5. Participação do TNF- α na geração de H ₂ O ₂ <i>in situ</i> após o consumo crônico de etanol.....	51
4.8. Participação do TNF- α sobre os níveis de NO após o consumo crônico de etanol.....	52
4.8.1. Participação do TNF- α sobre os níveis de NOx após o consumo de etanol.....	52
4.8.2. Participação do TNF- α sobre a geração de NO <i>in situ</i> após o consumo crônico de etanol.....	54
4.9. Participação do TNF- α sobre a capacidade antioxidante após o consumo crônico de etanol.....	54
4.9.1. Participação do TNF- α sobre a atividade plasmática e tecidual da SOD após o consumo crônico de etanol.....	54
4.9.2. Participação do TNF- α sobre a atividade da CAT após o consumo crônico de etanol.....	55
4.9.3. Participação do TNF- α sobre os níveis de GSH após o consumo crônico de etanol.....	56
4.9.4. Participação do TNF- α sobre a atividade da GPx após o consumo crônico de etanol.....	58
4.10. Participação do TNF- α sobre os níveis de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10 após o consumo crônico de etanol.....	58
4.11. Participação do TNF- α sobre a atividade da MPO após o consumo crônico de etanol.....	62
5. DISCUSSÃO.....	64
REFERÊNCIAS.....	76
ANEXO	87
ANEXO A – CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....	87

Fonte: A Embriaguez de Noé - Capela Sistina (Michelangelo Buonarroti, 1508-1510).

1.Introdução

Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) mostram que as doenças cardiovasculares (DCV) são as principais causas de morte em todo o mundo, sendo a hipertensão arterial (HA) responsável por 12,8% desses óbitos (Organização Mundial da Saúde, 2013). A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é uma condição clínica multifatorial caracterizada por elevação sustentada dos níveis pressóricos ≥ 140 e/ou 90 mmHg (sistólica e diastólica, respectivamente) e se associa a diversos distúrbios metabólicos, alterações celulares, funcionais e estruturais de órgãos-alvo. É importante lembrar-se da classificação da pressão arterial (PA) em indivíduos. Consideram-se indivíduos normotensos quando as medidas de PA são $\leq 120/80$ mmHg. A Pré-hipertensão (PH) caracteriza-se pela presença de pressão arterial sistólica (PAS) entre 121 e 139 e/ou pressão arterial diastólica (PAD) entre 81 e 89 mmHg. Uma vez estabelecido o diagnóstico de hipertensão arterial sistêmica, a mesma divide-se em 3 estágios: Hipertensão estágio I - PAS entre 140 e 159 mmHg e PAD entre 90 e 99 mmHg; Hipertensão estágio II - PAS entre 160-179 e PAD entre 100 e 109; Hipertensão estágio III - PAS ≥ 180 e PAD ≥ 110 (VII Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial, 2016).

Em uma década, cerca de 7,6 milhões de mortes no mundo foram atribuídas à HA, sendo a maioria em países de baixo e médio desenvolvimento econômico (I Diretriz de Prevenção Cardiovascular, 2013). No Brasil, as DCV se encontram entre as principais causas de óbitos, sendo responsáveis por 20 a 30% do total de mortes no país (VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão, 2010). A HA atinge 32,5% (36 milhões) de indivíduos adultos, mais de 60% dos idosos, contribuindo direta ou indiretamente para 50% das mortes por DCV (VII Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial, 2016). Existem vários fatores que contribuem para o desenvolvimento das DCV, sendo o etanol uma das principais variáveis de comorbidade associadas ao aumento da incidência de tais doenças (Di Castelnuovo *et al.*, 2009).

O etanol é uma substância psicoativa, cujo consumo exacerbado induz a um estado de dependência crônica conhecido como alcoolismo. O consumo habitual de etanol eleva a PA de forma linear, já o seu consumo excessivo associa-se com o aumento na incidência de HA (VII Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial, 2016). Em 2014, o relatório da OMS mostrou que 5,9% de todas as mortes no mundo são atribuídas ao consumo de etanol. O relatório ainda afirma que o uso abusivo de etanol provoca 3,3 milhões de mortes anualmente, englobando acidentes, doenças e mortes prematuras. A porcentagem de mortes pelo abuso da substância é maior do que as de mortes causadas por AIDS (2,8%), violência (0,9%) e tuberculose (1,7%) (Organização Mundial da Saúde, 2014). Quando esses índices são analisados em comparação a América Latina, o consumo da substância atinge um escalão mais agravante, pois cerca de

16% de vida útil são perdidos neste continente devido ao consumo de etanol, índice quatro vezes maior que a média mundial (Babor & Caetano, 2005). Neste índice, o Brasil é o quarto maior consumidor de álcool das Américas (Organização Mundial da Saúde, 2011, 2014).

Estudos mostram uma complexa associação entre o consumo de etanol e as doenças cardiovasculares. Em humanos, o consumo moderado (entre três a quatro doses* diárias) ou abusivo de etanol (superior a cinco doses diárias) (MacMahon, 1987) a médio e longo prazo induz aumento da PAS (>150-160 mmHg) e PAD (>95 mmHg). No entanto, o consumo de uma ou duas doses diárias está associado a uma redução da PA (Klatsky *et al.*, 1977), indicando que a associação entre a quantidade de etanol consumida e os níveis pressóricos é do tipo J, onde em baixas concentrações (equivalentes a 20g/dia) o etanol induz redução da PA promovendo uma proteção contra as DCV, e em altas concentrações (equivalente a 80 g/dia) essa substância induz aumento da PA e aumenta a probabilidade do desenvolvimento das DCV (Klatsky *et al.*, 1977; MacMahon, 1987).

O aumento da PAS associado ao consumo crônico de etanol está amplamente elucidado na literatura. Em 2015, o trabalho de Lian (1915) completava um século de sua publicação, sendo o primeiro estudo associando a relação entre o aumento da PA e o consumo de etanol. Na sequência, vários estudos foram realizados corroborando os resultados de Lian (1915). Tais estudos mostram que o consumo crônico de etanol acarreta alterações significativas da função circulatória, figurando como um importante fator de risco no desenvolvimento de DCV, em especial a HA (Klatsky *et al.*, 1977; Milon *et al.*, 1982; Klatsky *et al.*, 1986; MacMahon, 1987; Vander, 1988; Fuchs *et al.*, 2001; Skliros *et al.*, 2012). Em países desenvolvidos como a Inglaterra e os Estados Unidos, 30% dos óbitos associados à HA são atribuídos ao consumo de etanol (Mathews, 1976). Além disso, vários estudos na América do Norte, Austrália, Japão, Europa (MacMahon, 1987) e Brasil (Fuchs *et al.*, 2001) mostraram aumento da prevalência de HA em indivíduos que consomem etanol regularmente.

Em 2007, a Secretaria Nacional Antidrogas (SENAD) investigou os padrões de consumo de etanol na população brasileira e detectou que 12,3% das pessoas pesquisadas, com idade entre 12 e 65 anos, preenchem critérios para a dependência dessa substância, e cerca de 75% já beberam pelo menos uma vez na vida. Os dados também indicam que o consumo de etanol acontece em faixas etárias cada vez mais precoces e sugerem a necessidade de revisão das medidas de controle, prevenção e tratamento (SENAD, 2007).

* uma dose equivale a 8-14 gramas de etanol (MacMahon, 1987), que no contexto Brasileiro corresponde a 350 mL de cerveja ou 90 mL de vinho (SENAD, 2011).

Estes dados mostram que o consumo de etanol acarreta sérios danos à saúde pública, mostrando o quão importante é o estudo e a elucidação das vias celulares envolvidas no processo de aumento da PA.

Em modelos animais também foram evidenciados uma relação entre o consumo de etanol e o aumento da PA, onde ratos tratados com solução de etanol 20% apresentaram um aumento da PAS após a quarta semana de tratamento (Chan & Sutter, 1983; Chan *et al.*, 1985; Strickland & Wooles, 1988). Aumento significativo da PAS também foi evidenciado em ratos após uma semana de tratamento com etanol (7,2% v/v) (Utkan *et al.*, 2001). Nosso grupo de pesquisa mostrou que o tratamento com etanol 20% por 2, 6 ou 10 semanas provoca um aumento da pressão arterial média (PAM), PAS e PAD em ratos (Resstel *et al.*, 2006; Tirapelli *et al.*, 2007, 2008; Rocha *et al.*, 2012). No entanto, apesar de bem evidenciado a relação entre consumo crônico de etanol e a HA, os mecanismos envolvidos nestes eventos não foram totalmente esclarecidos.

O etanol tem sido descrito como um importante indutor de disfunção endotelial levando a alteração da reatividade vascular (Utkan *et al.*, 2001; Tirapelli *et al.*, 2006a,b). Nesse sentido, Pinardi *et al.* (1992) observaram aumento da resposta contrátil à fenilefrina em aorta de ratos tratados com etanol 20% durante 18 dias. Resposta semelhante foi descrita em aorta de ratos tratados com etanol por 2, 6, 10 ou 16 semanas (Stewart & Kennedy, 1999; Tirapelli *et al.*, 2006b). Em relação às respostas de relaxamento, Husain *et al.* (2008) mostraram redução na resposta vasorelaxante da acetilcolina em aorta de ratos tratados com etanol 20% durante 12 semanas. Mais recentemente, Hipólito *et al.* (2011) observaram redução da resposta de relaxamento à adrenomedulina em aorta de ratos tratados com etanol por 6 semanas.

O consumo crônico de etanol envolve ainda a modulação e ativação de células do sistema imune inato, tais como monócitos/macrófagos e neutrófilos induzindo inflamação de órgãos e tecidos. A inflamação induzida pelo etanol pode acometer o sistema cardiovascular e promover aumento da produção de diversas citocinas inflamatórias. O Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α) é uma das principais citocinas produzidas durante o processo inflamatório induzido pelo etanol (Mandrekar *et al.* 2009). O TNF- α é produzido principalmente por macrófagos ativados e linfócitos T como uma proteína de 26 kDa, denominada pró-TNF, que é expresso na membrana plasmática, onde é clivado no domínio extracelular por metaloproteinases de matriz originando a forma solúvel. Tanto a forma solúvel do TNF como aquela acoplada à membrana são ativas na sua forma trimérica. O TNF- α exerce seus efeitos por meio da interação com dois receptores específicos, o TNFR1 (também chamado

TNFRSF1A, CD120a, p55) e o TNFR2 (também chamado TNFRSF1B, CD120b, p75) que são expressos em diferentes tecidos (Al-Lamki *et al.*, 2001). O TNFR1 é expresso na maioria dos tipos celulares, já a expressão do TNFR2 parece estar limitada às células do sistema imunológico e endoteliais (Aggarwal, 2003). Apesar da importância de ambos os receptores para a resposta mediada pelo TNF- α , o receptor R1 tem maior relevância sobre as vias de sinalização relacionadas com disfunção vascular (Figura 1). A primeira proteína adaptadora recrutada pela ativação do receptor TNFR1 é a TRADD (TNFR1 associated death domain protein). A TRADD funciona como uma plataforma para recrutar outras três proteínas: FADD (Fas associated death domain protein), TRAF2 (fator 2 associado ao receptor de TNF) e RIP1 (proteína de interação com o receptor 1). A TRAF2 é compartilhada por ambos receptores TNFR1 e TNFR2, porém tem uma maior afinidade pela proteína adaptadora TRADD associada ao TNFR1 do que pelo receptor TNFR2, o que poderia explicar o fato de o TNFR1 participar da grande maioria das respostas biológicas (Carneiro *et al.*, 2010).

A ativação do receptor TNFR1 medeia importantes respostas celulares, tais como aumento do estresse oxidativo via ativação da enzima NAD(P)H oxidase, aumento da infiltração celular, aumento da resposta inflamatória vascular e redução da biodisponibilidade de NO. Atua regulando outras respostas biológicas como proliferação, diferenciação e apoptose celular (Heyninck & Beyaert, 2001), indução da expressão de genes que vão codificar diversas citocinas pró-inflamatórias dependentes ou não dos fatores de transcrição NF- κ B e AP-1, e ativação de vias intracelulares que aumentam a expressão de moléculas de adesão, tais como a molécula de adesão vascular-1 (VCAM-1) e a molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1), fatores de crescimento e enzimas induzíveis, tais como a ciclooxigenase-2 (COX-2) e a óxido nítrico sintase induzível (iNOS), além de induzir a expressão de fatores quimiotáticos responsáveis pela migração celular (Zhang *et al.*, 2009).

Conforme supracitado, uma importante função do TNFR1 está relacionada à sua capacidade em promover a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) via ativação da enzima NAD(P)H oxidase, sendo essa resposta mediada por uma riboflavina quinase (Yazdanpanah *et al.*, 2009). Husain *et al.* (2005) sugeriram que o consumo crônico de etanol induz hipertensão por um mecanismo de disfunção endotelial causada pelas ERO com consequente redução da produção de NO. As ERO oxidam biomoléculas como proteínas, DNA e RNA e iniciam um processo de peroxidação lipídica da membrana levando a produção de mediadores inflamatórios e a depleção do sistema de defesa antioxidante (Husain *et al.*, 2011). A enzima NAD(P)H oxidase, formada por diferentes subunidades, é a principal produtora de ERO na vasculatura. A NAD(P)H oxidase protótipo foi inicialmente descrita em

neutrófilos sendo formada por 5 subunidades: p47phox (“*phox*” ou “*phagocyte oxidase*”), p67phox, p40phox, Rac 1 e 2 (proteínas da família Rho de GTPases monoméricas), p22phox e a subunidade catalítica gp91phox (também chamada de Nox2). As subunidades p47phox, p67phox, p40phox e Rac estão localizadas no citoplasma enquanto as subunidades gp91phox e p22phox estão localizadas na membrana, onde elas ocorrem na forma de uma flavoproteína heterodimérica, o citocromo *b558*. Quando a enzima é exposta a um estímulo, os componentes citosólico (p47phox, p67phox e Rac1) se translocam para a membrana e associam-se ao citocromo *b558*, resultando na ativação da oxidase (Paravicini & Touyz, 2008). Embora a NAD(P)H oxidase tenha sido descrita originalmente em células fagocíticas, a descoberta de homólogos da gp91phox indicou a existência de uma família de NAD(P)H oxidases formada por sete membros que são caracterizados pela subunidade catalítica que utilizam. Assim, esta família de enzimas é formada pela Nox1, Nox2 (gp91phox), Nox3, Nox4 (*Renox – renal oxidase*), Nox5, Duox1 e Duox2 (Touyz & Briones, 2011). Nas células da musculatura lisa e nas células endoteliais são encontradas as seguintes enzimas: Nox1, Nox2, Nox4 e a Nox5 (esta última em humanos).

A NAD(P)H oxidase catalisa a produção de ânion superóxido (O_2^-) pela redução do oxigênio molecular (O_2) usando o NADPH ou NADH como doadores de elétron: $2O_2 + NADPH \rightarrow 2O_2^- + NADP^+ + H^+$ (Paravicini & Touyz, 2008). O O_2^- pode agir como um agente oxidante, sendo reduzido a peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ou como agente redutor, doando o seu elétron extra ao NO para formar peroxinitrito ($OONO^-$). O $OONO^-$ formado é capaz de oxidar proteínas, lipídios e ácidos nucleicos provocando diversos danos celulares (Beckman & Koppenol, 1996). Dessa forma, haverá uma diminuição da biodisponibilidade de NO endotelial, com diminuição do seu efeito vasorelaxante, somado ao próprio efeito vasoconstritor do O_2^- (Cai & Harrison, 2000).

A inflamação vascular mediada pelo consumo de etanol pode envolver a participação do tecido adiposo perivascular (*perivascular adipose tissue* - PVAT). Este tecido é capaz de promover um aumento local de grande número de mediadores inflamatórios sendo conhecido como uma importante fonte de adipocinas e citocinas pró-inflamatórias (Szasz & Webb, 2012). No passado, o PVAT era considerado apenas uma estrutura de sustentação, no entanto hoje ele é considerado um órgão endócrino capaz de gerar e secretar uma ampla variedade de substâncias biológicas que influenciam significativamente o tônus vascular (Gálvez *et al.*, 2008; Aghamohammadzadeh, 2012; Szasz & Webb, 2012), como fatores de crescimento, citocinas, hormônios (Hajer *et al.*, 2008), substâncias vasodilatadoras (Löhn *et al.*, 2002; Dubrovskaya *et al.*, 2004; Gao *et al.*, 2007) e vasoconstritores (Gao *et al.*, 2006). Vários estudos

foram realizados com o objetivo de mostrar o papel benéfico do PVAT sobre a modulação do tônus vascular, sendo capaz de exercer um efeito anticonstrítil no vaso em reposta a diversos agonistas como a noradrenalina (Soltis & Cassis, 1991), a serotonina (Löhn *et al.*, 2002), e endotelina-1 (Verlohren *et al.*, 2004). Os estudos têm sugerido que este efeito anticonstrítil se deve à liberação de fatores relaxantes derivados de adipócitos (FRDA), tais como adiponectina (Fesus *et al.*, 2007), angiotensina 1-7 (Galvez *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2011), sulfeto de hidrogênio (Wojcicka & Jamroz-Wisniewska, 2011; Beltowski & Jamroz-Wisniewska, 2012) e metil palmitato (Lee *et al.*, 2011), além do envolvimento dos canais para potássio (Löhn *et al.*, 2002; Verlohren *et al.*, 2004). Em condições fisiológicas, o PVAT apresenta um efeito protetor e benéfico na regulação do tônus vascular, porém em situações patológicas, como na obesidade, diabetes, lesão vascular, infecções e na senilidade, o PVAT promove disfunção endotelial e aumento da síntese de citocinas inflamatórias (Guzik *et al.*, 2007; Ketonen *et al.*, 2010; Miao & Li, 2011), mostrando um importante papel na patogênese da HA (Oriowo, 2015). No entanto não se sabe ao certo sua participação em condições de etilismo crônico.

É importante ressaltar que o TNF- α está envolvido na fisiopatologia de DCV, e o seu papel na disfunção vascular tem sido demonstrado por sua capacidade em induzir um processo pró-inflamatório na vasculatura. A administração de TNF- α em indivíduos saudáveis induz inflamação local e redução do relaxamento vascular dependente do endotélio (Chia *et al.*, 2003), aumento da produção de prostanóides vasoconstritores e redução da biodisponibilidade do NO (Nakamura *et al.*, 2000). Outra ação do TNF- α que contribui para a inflamação vascular é a indução da síntese de citocinas pró-inflamatórias como, por exemplo, a IL-1 β , IL-6 e IL-18. Essas citocinas são produzidas pelas células endoteliais e músculo liso vascular e possuem ação pró-aterogênica uma vez que induzem proliferação, diferenciação e remodelamento vascular (Sprague & Khalil, 2009). Além disso, estudos mostram que a incubação com TNF- α em vasos é capaz de reduzir o efeito anticonstrítil causado pelo PVAT (Greenstein *et al.*, 2009), mostrando que esta citocina é capaz de modificar a função benéfica do PVAT.

Figura 1. Esquema dos efeitos vasculares mediados pelo TNF- α . EDHF: Fator hiperpolarizante derivado do endotélio; eNOS: óxido nítrico sintase endotelial; NO: óxido nítrico; IL: Interleucina; iNOS: óxido nítrico sintase induzível; MMP: Metaloproteinase de matriz; VCAM-1: molécula de adesão vascular-1; ICAM-1: molécula de adesão intercelular-1 (adaptado de Zhang *et al.*, 2009).

Vários mecanismos foram propostos para explicar a disfunção vascular induzida pelo TNF- α . Em células endoteliais, o TNF- α induz redução da expressão e dos níveis de RNAm para a óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) (MacNaul & Hutchinson, 1993), levando à redução da produção de NO e do relaxamento vascular (Gao *et al.*, 2007). Apesar de promover redução da expressão da eNOS, o TNF- α está associado ao aumento da expressão da iNOS em diferentes tecidos, uma resposta que é mediada pela via do NF- κ B (MacNaul & Hutchinson, 1993).

Além disso, diversos estudos descrevem que o consumo crônico de etanol induz a produção de TNF- α . Lin *et al.* (1998) mostraram que o consumo crônico de etanol induz aumento da produção de TNF- α e IL-6 no fígado e tecido adiposo de ratos. El-Taouky *et al.* (2006) mostraram um aumento dos níveis de TNF- α e IL-6 no soro de ratos tratados com etanol. Koken *et al.* (2010) detectaram um aumento dos níveis plasmáticos de TNF- α em ratos tratados com etanol. Das *et al.* (2010), mostraram que o consumo crônico de etanol induziu aumento do estresse oxidativo e dos níveis plasmáticos de TNF- α . Além disso, vários estudos em camundongos mostram que o TNF- α desempenha um papel crucial na hepatotoxicidade induzida pelo consumo de etanol (Segawa *et al.*, 2008; Lv *et al.*, 2010). Esses resultados sugerem que o TNF- α medeia os efeitos deletérios associados ao consumo de etanol. No

entanto, a participação do TNF- α nas disfunções vasculares associadas ao etanol permanece elusiva.

Diante dos dados apresentados, observa-se a importância do entendimento do papel do TNF- α sobre os prejuízos associados ao consumo de etanol. Logo, a hipótese do presente estudo é a de que o consumo crônico de etanol estimule a produção de TNF- α no sistema cardiovascular. Esse processo levaria a ao aumento de outras interleucinas (IL-1 β , IL-6 e IL-10), formação de ERO, redução da biodisponibilidade de NO e aumento da PA. Além disso, o papel protetor exercido pelo PVAT seria desvanecido, piorando o prejuízo vascular após o consumo de etanol.

Fonte: A Embriaguez de Noé - Capela Sistina (Michelangelo Buonarroti, 1508-1510).

2. Objetivos

O consumo crônico de etanol é um importante problema de saúde pública. Seu consumo acarreta aumento da PA, alteração na reatividade vascular, inflamação e aumento do estresse oxidativo em vários tecidos, atuando como um importante fator de risco no desenvolvimento de DCV. Desta forma torna-se pertinente o estudo dos mecanismos de alterações celulares e funcionais decorrentes do seu uso. Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar a participação do TNF- α no estresse oxidativo, inflamação, alteração da reatividade vascular e aumento da PA induzidos pelo consumo crônico de etanol e o envolvimento do PVAT em tais respostas.

Fonte: A Embriaguez de Noé – Capela Sistina (Michelangelo Buonarroti, 1508-1510).

3.Material e métodos

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos adultos C57BL/6 (*Wild Type* –WT) e nocautes para os receptores R1 do TNF- α (TNFR1^{-/-}), com idade média entre 6 e 8 semanas (20-25 g), provenientes do Centro de Criação de Camundongos Especiais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e do Biotério Central do *Campus* de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo (USP). Os protocolos experimentais descritos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do *Campus* de Ribeirão Preto da USP (Protocolo número: 12.1.1654.53.9). Os animais foram mantidos no Biotério de Manutenção da Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto, em mini-isoladores alocados em rack ventilada (ALESCO, Brasil), em ambiente com temperatura controlada (22 ± 2 °C), sob ciclo claro-escuro de 12 horas (luzes acesas entre as 06:00 e 18:00 horas) e com livre acesso à alimento.

3.2 Grupos experimentais

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos: **1) Grupo controle C57BL/6:** recebeu água *ad libitum*; **2) Grupo controle TNFR1^{-/-}:** recebeu água *ad libitum*; **3) Grupo etanol C57BL/6:** recebeu diariamente solução de etanol a 20% em água; **4) Grupo etanol TNFR1^{-/-}:** recebeu diariamente solução de etanol a 20% em água. Os animais dos grupos etanol foram condicionados a um breve período de adaptação gradativa do consumo de etanol, que consistiu no fornecimento de etanol em concentrações crescentes semanais de 5, 10 e 20%, totalizando 12 semanas de tratamento (Esquema 1) (Yeligar *et al.*, 2012). Ao término da 12^a semana de tratamento, os animais foram anestesiados com uretana (1,25 g/kg, i.p.) e mortos. Os tecidos [aortas com PVAT (PVAT⁺) e sem PVAT (PVAT⁻)] e o sangue foram coletados para realização dos experimentos funcionais e bioquímicos.

Esquema 1. Modelo utilizado para o tratamento com etanol por 12 semanas. Houve adaptação dos animais do grupo etanol que consistiu no fornecimento de etanol em concentrações crescentes semanais de 5, 10 e 20%.

3.3 Evolução temporal do peso dos animais

Foram realizadas medidas semanais do peso dos animais dos quatro grupos experimentais. Os resultados foram expressos em gramas (g) do peso médio dos animais de cada grupo.

3.4 Evolução temporal do consumo de ração pelos animais

Foi realizada uma estimativa do consumo de ração pelos animais dos quatro grupos experimentais. Os resultados foram expressos em gramas (g) do consumo médio de ração pelos animais de cada grupo experimental.

3.5 Evolução temporal da ingestão de líquidos pelos animais

Foi realizada uma estimativa da ingestão de líquidos pelos animais dos grupos experimentais. Os resultados foram expressos em mililitros (mL) do consumo médio da ingestão de líquidos (água ou solução de etanol) pelos animais de cada grupo experimental.

3.6 Avaliação da PAS

A PAS foi aferida semanalmente pelo método de pletismografia de cauda, utilizando o pletismógrafo EFF306 (Insight, Brasil). Os animais dos quatro grupos experimentais passaram por um período de adaptação e acondicionamento de três dias, onde os mesmos foram colocados em tubo de contenção para medida dos valores de PAS. Inicialmente os animais de cada grupo experimental foram colocados em caixas e aquecidos por 10 minutos. Foram obtidas três medidas de PAS por animal e posteriormente realizada a média dos valores obtidos. Os resultados de PAS estão expressos em mmHg.

Objetivo: Verificar se o consumo crônico de etanol induz aumento da PAS e avaliar se o *TNF- α* participa dessa resposta.

3.7 Determinação dos níveis sanguíneos de etanol

Os animais foram anestesiados com uretana (1,25g/Kg, i.p., Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) e o sangue (1 mL) foi coletado através do plexo retro-orbital. As amostras foram acondicionadas em tubos contendo o conservador fluoreto de sódio (1 mg/mL de sangue). Posteriormente, 100 μ L de amostra foram transferidas para tubos headspace de 20 mL, contendo 500 μ L de solução aquosa de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 10%. O Isobutanol (100 mg/dL) foi utilizado como padrão interno. Os frascos foram devidamente lacrados e colocados em suporte do amostrador automático, operando no modo headspace e incubados sob agitação (400 rpm) por 15 minutos a 80°C. A análise da concentração de etanol das amostras procedeu-se no cromatógrafo gasoso Varian CP3380 (Varian, CA, USA) equipado com detector de ionização de chama e coluna capilar de sílica fundida Carbowax (30 m $\times$ 0,25 mm I.D., espessura 0,25 μ m) (Chrompack, São Paulo, SP, Brasil). O modo de injeção foi realizado sem divisão de amostra por 30 segundos. A temperatura da coluna foi ajustada para 40°C (4 minutos) a 220°C (2 minutos) (15°C/minuto). A temperatura do injetor e detector foram ajustadas para 220 e 300°C, respectivamente (Gonzagata *et al.*, 2015). Os resultados foram expressos em mg de etanol/dL de sangue.

Objetivo: Determinar os níveis sanguíneos de etanol obtidos após o tratamento crônico.

3.8 Estudo funcional da reatividade vascular em aorta de camundongo

Os animais foram anestesiados e posteriormente sacrificados por exsanguinação seguida de rompimento do diafragma. A artéria aorta torácica foi isolada e o tecido adiposo perivascular foi preservado de acordo com o protocolo utilizado na reatividade (artérias PVAT⁻ e artérias PVAT⁺). Em seguida, a artéria aorta foi cortada em quatro segmentos de aproximadamente 5 mm cada. Após a retirada e isolamento das artérias, dois ganchos de metal foram inseridos no lúmen das mesmas para produzir tensão. Um dos ganchos foi conectado a um suporte fixo ajustável e o outro a um transdutor de força isométrica, visando detectar modificações do tônus muscular. As modificações de tônus vascular foram registradas através de sistema de aquisição de sinais TRI201 (Panlab, Espanha) e processadas pelo software Chart Pro 5.0 (ADInstruments, Austrália). O sistema foi montado em câmara para órgão isolado contendo 5 mL de solução de Krebs cuja composição é (em mmol/L): NaCl 118; KCl 4,7; KH₂PO₄ 1,2; MgSO₄ 1,2; NaHCO₃ 15; Glicose 5,5; CaCl₂ 2,5; pH 7,4. Os anéis foram mantidos a uma temperatura constante de 37°C e gaseificados com mistura carbogênica (95% O₂ e 5% CO₂). As preparações de aorta, sob tensão de 4,9 mN, permaneceram em repouso durante 60 minutos para estabilização. O endotélio vascular foi preservado ou removido mecanicamente de acordo com o protocolo experimental. A integridade do endotélio foi testada pelo relaxamento produzido pela acetilcolina (1 µmol/L) após a contração produzida pela fenilefrina. Foi considerado artéria com endotélio (E⁺) aquela que mostrou um relaxamento igual ou superior a 80%. As artérias que não apresentaram relaxamento produzido pela acetilcolina foram consideradas sem endotélio (E⁻). A reatividade vascular foi estudada a partir da obtenção de curvas concentração-resposta para acetilcolina (0,1 nmol/L a 10 µmol/L) e nitroprussiato de sódio (NPS) (10 nmol/L a 10 µmol/L). A partir das curvas concentração-resposta, foram determinados os valores de potência (pD₂) que consiste no logaritmo negativo da concentração molar do composto vasoativo que promove 50% do efeito máximo (EC₅₀), bem como os respectivos efeitos máximos (E_{max}). As EC₅₀ foram calculadas por regressão não-linear, utilizando-se o programa GraphPad Prism® (versão 5.0 Prism, GraphPad, USA).

Objetivo: Verificar se o consumo crônico de etanol induz alteração da reatividade vascular em artéria aorta PVAT⁺ e PVAT⁻ e avaliar se o TNF- α participa dessa resposta.

3.9 Determinação da formação de ERO

3.9.1 Avaliação de O_2^- *in situ* (DHE)

As concentrações de O_2^- foram analisadas *in situ* em artéria aorta (PVAT⁺ e PVAT⁻), utilizando dihidroetídeo (DHE, 10 μ mol/L). Os segmentos de aorta foram congelados em OCT (Sakura Finetek, Torrance, CA, USA) utilizando acetona e gelo seco. Os tecidos foram cortados em criostato, a 8 μ m de espessura. Posteriormente, os tecidos foram incubados com DHE por 30 minutos a 37°C em câmara úmida e escura. Os cortes foram lavados 3 vezes com tampão salina fosfato (PBS, pH 7,4). Com auxílio de um microscópio de fluorescência acoplado a câmera fotográfica (Leica Imaging Systems Ltd., Cambridge, England) as imagens foram avaliadas fluorimetricamente (em uma λ excitação de 550 e λ emissão de 570 nm) com um aumento de 400x. A intensidade de fluorescência vermelha avaliada consiste na reação do DHE com o O_2^- , resultando na formação do 2-hidroxi-etídeo e etídeo, produtos que emitem a fluorescência avermelhada (Ceron *et. al.*, 2010).

Objetivo: Verificar se o consumo crônico de etanol induz formação de O_2^- em aortas PVAT⁺ e PVAT⁻ e avaliar se o TNF- α participa dessa resposta.

3.9.2 Detecção de O_2^- pelo método de quimioluminescência da lucigenina

O tecido aórtico (PVAT⁺ e PVAT⁻) foi coletado e congelado em nitrogênio líquido. Posteriormente, o tecido foi homogeneizado em tampão fosfato, cuja composição é: 20 mmol/L de KH_2PO_4 , 1 mmol/L de EGTA e 150 mmol/L de sacarose, com pH 7,4. A reação foi iniciada pela adição de NADPH (0,1 mmol/L) a uma suspensão (com volume final de 250 μ L) contendo amostra (50 μ L), lucigenina (5 μ mol/L) e tampão fosfato pH 7,4. Os valores foram obtidos a partir da subtração do valor basal (obtido pela medida da amostra com tampão fosfato e lucigenina) pelo valor obtido após adição de NADPH. Foram realizados 30 ciclos de leitura utilizando o luminômetro Orion II-Microplate Luminometer MPL4 (Berthold). O conteúdo proteico das amostras foi analisado pelo método de Lowry (Bio-Rad, EUA). Os resultados foram normalizados pela concentração proteica de cada amostra e expressos como URL (unidades relativa de luz) /mg de proteína (Yogi *et al.*, 2010).

Objetivo: Verificar se o consumo crônico de etanol altera a produção de O_2^- em aorta PVAT⁺ e PVAT⁻ e avaliar se o TNF- α participa dessa resposta.

3.9.3 Avaliação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no plasma e em tecido aórtico

O sangue foi coletado com seringas heparinizadas e em seguida centrifugado (4000 x g, 10 minutos, 4°C) e a aorta torácica PVAT⁺ e PVAT⁻ foi retirada e posteriormente congelada em nitrogênio líquido. As amostras de tecido foram homogeneizadas em tampão de RIPA e em seguida foram centrifugadas (1600 x g, 10 minutos, 4°C). As amostras de tecido ou plasma foram aquecidas (100°C, 1 hora) e em seguida centrifugadas novamente. O sobrenadante foi utilizado para posterior dosagem, que foi realizada seguindo as instruções do fabricante do kit (TBARS assay kit, Cayman Chemical Company, EUA, Cat. nº 10009055). O ensaio consistiu na medida colorimétrica (540 nm) do complexo formado pela reação do malondialdeído (MDA), produto de peroxidação lipídica, com o ácido tiobarbitúrico (TBA) sob alta temperatura e em meio ácido. O conteúdo proteico das amostras foi analisado pelo método de Lowry (Bio-Rad, EUA). Os resultados foram representados como nmol TBARS/mL de plasma ou nmol TBARS/mg de proteína (Simplicio *et al.*, 2015).

Objetivo: Verificar se o consumo crônico de etanol induz estresse oxidativo sistêmico e tecidual e avaliar se o TNF- α participa dessa resposta.

3.9.4 Avaliação dos níveis teciduais de peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

O tecido aórtico (PVAT⁺ e PVAT⁻) foi coletado e congelado em nitrogênio líquido. As amostras foram homogeneizadas em solução e Krebs gelado (pH 7,4) e centrifugadas 10000 x g por 5 minutos a 4°C. Em seguida, o H_2O_2 foi avaliado utilizando o reagente Amplex Red (10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine) (Amplex® Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay Kit, Invitrogen, código A22188). Para a montagem da placa, à cada 50 μ L do sobrenadante obtido foi adicionado 50 μ L de *working solution* formado basicamente pelo reagente *Amplex Red* (10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine) e a peroxidase horseradish (HRP). O reagente, na presença da peroxidase *horseradish* (HRP) reage com o H_2O_2 , produzindo a resorufina,

produto altamente fluorescente (λ excitação 571, λ emissão 585 nm). Uma curva padrão de H_2O_2 foi realizada, o conteúdo proteico das amostras foi analisado pelo método de Lowry (Bio-Rad, EUA) e os valores de concentração obtidos foram expressos em nmol de H_2O_2 /mg proteína (Carda *et al.*, 2015).

Objetivo: Verificar se o consumo crônico de etanol induz formação de H_2O_2 em aortas $PVAT^+$ e $PVAT^-$ e avaliar se o $TNF-\alpha$ participa dessa resposta.

3.9.5 Avaliação de H_2O_2 *in situ* (DCFH-DA)

As concentrações de H_2O_2 foram analisadas *in situ*, na artéria aorta $PVAT^+$ e $PVAT^-$, utilizando diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA 0,5 μ mol/L). Os segmentos de aorta foram congelados em OCT (Sakura Finetek, Torrance, CA, USA), utilizando acetona e gelo seco. Os tecidos foram cortados em criostato, a uma espessura de 8 μ m. Posteriormente, os tecidos foram incubados com DCFH-DA por 30 minutos e a 37°C em câmara úmida e escura. Os cortes foram lavados 3 vezes com tampão salina fosfato (PBS, pH 7,4). Com auxílio de um microscópio de fluorescência acoplado a câmera fotográfica (Leica Imaging Systems Ltd., Cambridge, England) as imagens foram avaliadas (λ excitação de 480 e λ emissão de 510 nm) e fotografadas com um aumento de 400x, conforme descrito previamente (Marchi *et al.*, 2016). O DCFH-DA é um composto lipofílico que atravessa facilmente o interior das células. Uma vez em seu interior, enzimas citosólicas desacetilam o DCFH-DA e formam o DCFH (2',7'- diclorofluoresceína). Este composto reage com H_2O_2 formando o DCFoxi (2',7'-diclorofluoresceína oxidada), responsável pela emissão da fluorescência esverdeada (Bass *et al.*, 1983).

Objetivo: Verificar se o consumo crônico de etanol altera a formação de H_2O_2 em aortas $PVAT^+$ e $PVAT^-$ e avaliar se o $TNF-\alpha$ participa dessa resposta.

3.10 Determinação da capacidade antioxidante

3.10.1 Avaliação da atividade plasmática e tecidual da superóxido dismutase (SOD)

As amostras de artéria aorta (PVAT⁺ e PVAT⁻) coletadas e congeladas em nitrogênio líquido foram homogeneizadas em PBS pH 7,4 e centrifugadas a 1500 x g, 4°C por 12 minutos. O sangue foi coletado com seringas heparinizadas e centrifugado (6000 x g, 10 minutos, 4°C). A atividade da SOD foi avaliada de acordo com instruções do kit (#19160, SOD AssayKit, Sigma-Aldrich), onde 20 µL de sobrenadante ou plasma foram adicionados a placa para iniciar a reação com o tetrazólio (solução de trabalho). Quanto menor a atividade da SOD, maior a concentração de O₂⁻ na amostra, que por sua vez reage com o tetrazólio levando a formação do formazan, que possui coloração amarela. Os resultados foram expressos em % da taxa de inibição, ou seja, a capacidade da SOD em inibir a reação do O₂⁻ com o tetrazólio. O conteúdo proteico das amostras foi analisado pelo método de Lowry (Bio-Rad, EUA).

***Objetivo:** Verificar se o consumo crônico de etanol altera a atividade da SOD, avaliar se o TNF-α participa dessa resposta e qual o envolvimento do PVAT.*

3.10.2 Avaliação da atividade tecidual e plasmática da catalase (CAT)

As amostras de artéria aorta (PVAT⁺ e PVAT⁻) coletadas e congeladas em nitrogênio líquido foram homogeneizadas em PBS pH 7,4 e centrifugadas a 10000 x g, 4°C por 12 minutos. Ao homogenato de tecido aórtico ou ao plasma, foi adicionado 100 µL de tampão fosfato (K₂HPO₄ 0,1 mol/L, KH₂PO₄ 0,1 mol/L, pH 6,5) e centrifugados a 7800 x g por 20 minutos. A solução reação foi preparada pela adição de 2,5 mL de tampão TRIS-EDTA, 47,3 mL de água ultra purificada e 175,5 µL de H₂O₂ (30 mmol/L) e mantida em banho-maria a 36°C. O ensaio foi realizado pela adição de 20 µL do sobrenadante da amostra a 980 µL de *solução reação* em cubetas de quartzo e, após homogeneização, a velocidade de decomposição do H₂O₂ foi medida durante 60 segundos. O valor inicial de absorbância foi subtraído do valor final obtido. O conteúdo proteico das amostras foi analisado pelo método

de Lowry (Bio-Rad, EUA) e os resultados foram expressos como unidades CAT/mg proteína ou CAT/mL de plasma.

Objetivo: *Verificar se o consumo crônico de etanol altera a atividade da CAT, avaliar se o TNF- α participa dessa resposta e qual o envolvimento do PVAT.*

3.10.3 Avaliação da atividade tecidual da glutathiona peroxidase (GPx)

As amostras de artéria aorta (PVAT⁺ e PVAT⁻) coletadas e congeladas em nitrogênio líquido foram homogeneizadas em Tris-HCl buffer (50mM), pH 7,5 contendo EDTA (5mM) e DTT (1mM). Posteriormente, o homogenato foi centrifugado a 10000 x g, 4°C por 15 minutos. A atividade da GPx foi avaliada seguindo instruções do kit para atividade desta enzima (#703102, Cayman Chemical) que se baseia em uma reação com a glutathiona redutase (GR) gerando NADP⁺ e provocando uma redução da absorbância avaliada em 340 nm. A taxa de redução da absorbância de cada amostra avaliada em 2 pontos distintos é proporcional a atividade da GPx. O conteúdo proteico das amostras foi analisado pelo método de Lowry (Bio-Rad, EUA) e os resultados foram expressos em nmol/minuto/mg de proteína.

Objetivo: *Verificar se o consumo crônico de etanol altera a atividade da GPx, avaliar se o TNF- α participa dessa resposta e qual o envolvimento do PVAT.*

3.10.4 Avaliação dos níveis plasmáticos e teciduais de glutathiona reduzida (GSH)

As amostras de artéria aorta (PVAT⁺ e PVAT⁻) coletadas e congeladas em nitrogênio líquido foram homogeneizadas em PBS pH 7,4 e centrifugadas a 6000 x g, 4°C por 12 minutos. O sangue foi coletado com seringas heparinizadas e em seguida centrifugado (1000 x g, 10 minutos, 4°C). Posteriormente, 100 μ L do homogenato ou plasma foram adicionados a 100 μ L de ácido tricloroacético (TCA, 12,5%), permanecendo no gelo por 30 minutos, centrifugado a 1.600 x g por 15 minutos e 4°C. A montagem da placa foi realizada pela adição de 30 μ L da amostra, 270 μ L de Tris-HCl. A cada poço foi incorporado 5 μ L de ácido 5,5-ditiobis (2-nitrobenzóico) (DTNB: 3,96 mg DTNB em 1 mL de metanol). Este reagente produz coloração amarela quando entra em contato com o grupo tiol (-SH). A leitura foi

realizada espectrofotometricamente a 415 nm. O conteúdo proteico das amostras foi analisado pelo método de Lowry (Bio-Rad, EUA). Os valores foram expressos em μg GSH/mg de proteína ou μg GSH/mL de plasma (Gonzaga *et al.*, 2014).

Objetivo: Verificar se o consumo crônico de etanol altera os níveis de GSH, avaliar se o TNF- α participa dessa resposta e qual o envolvimento do PVAT.

3.11 Determinação dos níveis de NO

3.11.1 Avaliação dos níveis plasmáticos e teciduais de nitrato/nitrito (NO_x)

As amostras de artéria aorta (PVAT⁺ e PVAT⁻) coletadas e congeladas em nitrogênio líquido foram homogeneizadas em PBS pH 7,4 e centrifugadas a 10000 x g, 20 minutos. O sangue foi coletado com seringas heparinizadas e, em seguida, centrifugado (6000 x g, 10 minutos, 4°C). O sobrenadante ou o plasma foram ultrafiltrados em filtros específicos (Amicon Ultra-0.5 ml 30Kda, Millipore). O filtrado foi utilizado em ensaio colorimétrico para as dosagens de nitrato/nitrito seguindo as instruções do kit (Nitrate/Nitrite Colorimetric Assay Kit, Cayman Chemical Company - 780001). Este ensaio fundamenta-se em uma reação do Nitrato/Nitrito com o reagente de Griess, que tem como produto um diazo-composto de coloração rosa. Após a medida das absorbâncias dos padrões e amostras (540-550nm) foram determinados os valores de NO_x, expressos em nmol/mL de plasma ou nmol/mg de proteína. O conteúdo proteico das amostras foi analisado pelo método de Lowry (Bio-Rad, EUA) (Gonzaga *et al.*, 2015).

Objetivo: Verificar se o consumo crônico de etanol reduz os níveis plasmáticos e teciduais de NO_x, avaliar se o TNF- α participa dessa resposta e qual o envolvimento do PVAT.

3.11.2 Avaliação dos níveis de NO *in situ* (DAF-2DA)

Os níveis de NO foram analisadas *in situ*, na aorta (PVAT⁺ e PVAT⁻), utilizando diacetato de 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2DA, 10 $\mu\text{mol/L}$). Os segmentos de aorta foram

congelados em OCT (Sakura Finetek, Torrance, CA, USA), utilizando acetona e gelo seco. Os tecidos foram cortados em criostato, a uma espessura de 8 μ m. Posteriormente, os tecidos foram incubados com DAF-2DA por 30 minutos a 37°C em câmara úmida e escura. Os cortes foram lavados 3 vezes com tampão salina fosfato (PBS, pH 7,4). Com auxílio de um microscópio de fluorescência acoplado a câmera fotográfica (Leica Imaging Systems Ltd., Cambridge, England) as imagens foram avaliadas (λ excitação de 488 e λ emissão de 530 nm) e fotografadas com um aumento de 400x (Ceron *et. al.*, 2010). Essa técnica consiste na reação do NO com a sonda diacetato de 4,5-diaminofluoresceína. O DAF-2DA é um composto permeável à membrana celular e, uma vez dentro das células, é clivado por esterases em 3,4-diaminofluoresceína (DAF-2). O DAF-2 reage com o NO na presença de oxigênio formando o triazolodiaminofluoresceína (DAF-2T), um composto que emite uma fluorescência esverdeada (Halbach, 2003).

Objetivo: *Verificar se o consumo crônico de etanol reduz a formação de NO em aortas PVAT⁺ e PVAT⁻ e avaliar se o TNF- α participa dessa resposta.*

3.12 Determinação dos níveis plasmáticos e teciduais de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10

O plasma ou a artéria aorta PVAT⁺ e PVAT⁻ foram coletadas e congeladas em nitrogênio líquido. Posteriormente, as artérias foram homogeneizadas em tampão salina fosfato (PBS, pH 7,4) e em seguida centrifugadas (10000 x g, 15 minutos e 4°C). O sobrenadante ou o plasma foi separado e 100 μ L do mesmo foi utilizado para o ensaio de ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) seguindo as instruções do Kit para dosagem de TNF- α , IL-6, IL-1 β e IL-10 (ELISA MAXTM Deluxe Sets – Biolegend, Cat. No. 430904, 431304, 432604 e 431414, respectivamente). Os resultados foram normalizados pela concentração proteica de cada amostra e representados como pg da citocina/mg de proteína ou pg da citocina/mL plasma. O conteúdo proteico das amostras foi analisado pelo método de Lowry (Bio-Rad, EUA).

Objetivo: *Verificar se o consumo crônico de etanol induz alteração dos níveis plasmáticos e teciduais das citocinas em aortas PVAT⁺ e PVAT⁻ e avaliar se o TNF- α participa dessa resposta*

3.13 Determinação da atividade tecidual da mieloperoxidase (MPO)

Aorta PVAT⁺ e PVAT⁻ dos animais foram homogeneizadas em tampão salina EDTA-fosfato de sódio-HCl, pH 4,7, agitadas vigorosamente, e posteriormente centrifugadas (800 x g, 15 minutos, 4°C). O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi solubilizado em 100 µL de tampão fosfato de sódio 0,05M, pH 5,4, contendo 0,5% de HTAB (brometo de hexa-1,6-bis-deciltrimetilamônio – Sigma-Aldrich), detergente iônico importante para solubilização da MPO facilitando sua extração. A suspensão foi centrifugada (10000 x g, 4°C, 15 minutos) e o sobrenadante foi utilizado para a medida da atividade da MPO. Posteriormente, foi adicionado em uma placa 50 µL da amostra, 25 µL de TMB (3,3', 3,3'-tetrametilbenzidina) e 100 µL de H₂O₂ 3% e incubados a 37°C por 5 minutos. A reação foi paralisada pela adição de 100 µL de ácido sulfúrico 4M a 4°C. A leitura foi realizada em comprimento de onda de 450 nm em espectrofotômetro. A atividade da MPO está representada pela absorbância em 450 nm (A450)/mg de proteína. O conteúdo proteico das amostras foi analisado pelo método de Lowry (Bio-Rad, EUA).

Objetivo: Verificar se o consumo de etanol induz aumento da atividade da MPO nas aortas PVAT⁺ e PVAT⁻ e avaliar a participação do TNF- α nessa resposta.

3.14 Análise estatística

Os valores obtidos foram expressos como média $\pm$ E.P.M. do número de animais utilizados em cada experimento. Os resultados foram analisados por análise de variância de duas vias (*two-way* ANOVA), seguidas pelo pós-teste de Bonferroni ou por teste “t” de Student não pareado, utilizando o programa GraphPad Prism® (versão 5.0 Prism, GraphPad, USA).

Fonte: A Embriaguez de Noé – Capela Sistina (Michelangelo Buonarroti, 1508-1510).

4.1. Efeito do tratamento crônico com etanol sobre a evolução temporal do peso dos animais

O peso dos camundongos WT e TNFR1^{-/-} (controle e etanol) foi avaliado por 12 semanas e realizada uma estimativa do ganho de peso por caixa, sendo que em cada caixa foram colocados 5 animais. Observou-se que o tratamento com etanol reduziu o ganho de peso dos camundongos WT e TNFR1^{-/-} na 12^o semana quando comparado ao respectivo grupo controle (Figura 2).

Figura 2. Efeito do tratamento crônico com etanol sobre o peso dos animais. O peso dos animais foi avaliado por 12 semanas. Os pontos representam a média $\pm$ EPM da estimativa do peso dos animais (n=15). *Diferença significativa em relação ao respectivo grupo controle (two-way ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni, $P < 0.05$).

4.2. Efeito do tratamento crônico com etanol sobre a evolução temporal do consumo de ração

O consumo de ração dos camundongos WT e TNFR1^{-/-} (controle e etanol) foi avaliados por 12 semanas e realizada uma estimativa deste consumo por caixa, sendo que em cada caixa foram colocados 5 animais. Observou-se que o tratamento com etanol reduziu gradativamente o consumo de ração dos animais WT e TNFR1^{-/-} quando comparado ao respectivo grupo controle (Figura 3).

Figura 3. Efeito do tratamento crônico com etanol sobre o consumo de ração. O consumo de ração foi avaliado por 12 semanas. Os pontos representam a média $\pm$ EPM da estimativa do consumo de ração (n=15). *Diferença significativa em relação ao respectivo grupo controle (two-way ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni, $P < 0.05$).

4.3. Efeito do tratamento crônico com etanol sobre a evolução temporal da ingestão de líquido

A ingestão de líquido dos camundongos WT e TNFR1^{-/-} (controle e etanol) foi avaliada por 12 semanas e realizada uma estimativa desta ingestão por caixa, sendo que em cada caixa foram colocados 5 animais. Observou-se que o tratamento com etanol reduziu gradativamente a ingestão de líquido dos animais WT e TNFR1^{-/-} quando comparado ao respectivo grupo controle (Figura 4).

Figura 4. Efeito do tratamento crônico com etanol sobre a ingestão de líquido. A ingestão de líquido foi avaliada por 12 semanas. Os pontos representam a média $\pm$ EPM da estimativa da ingestão de água ou etanol (n=15). *Diferença significativa em relação ao respectivo grupo controle (two-way ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni, $P < 0.05$).

4.4. Avaliação dos níveis sanguíneos de etanol

O etanol foi detectado no sangue dos animais, sendo que os animais WT apresentaram concentração de $226,7 \pm 26,8$ mg/dL, n=7 (~ 49 mmol/L) e os animais TNFR1^{-/-} o equivalente a $206,8 \pm 23,1$ mg/dL, n= 5 (~ 45 mmol/L). Não foi encontrada diferença significativa na concentração sanguínea de etanol entre os grupos WT e TNFR1^{-/-}.

4.5. Participação do TNF- α sobre a PAS após o tratamento crônico com etanol

O consumo crônico de etanol promoveu aumento significativo dos valores da PAS na quarta semana de tratamento em animais WT. Os animais TNFR1^{-/-} também mostraram um aumento da PAS após a quinta semana de tratamento, porém não tão acentuado como observado nos animais WT (Figura 5).

Figura 5. Efeito do consumo crônico de etanol sobre os valores de pressão arterial sistólica. Os pontos representam as médias dos valores, aferidos semanalmente, da pressão arterial sistólica em mmHg de animais do grupo controle e etanol WT e controle e etanol TNFR1^{-/-}. Os valores representam a média $\pm$ E.P.M. (n = 9-11 animais). *Diferença em relação ao grupo controle WT e TNFR1^{-/-}; #Diferença em relação ao grupo etanol TNFR1^{-/-} e ao grupo controle WT e TNFR1^{-/-} (two-way ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni, $P < 0.05$).

4.6. Participação do TNF- α sobre o estudo funcional da reatividade vascular em aorta após o consumo de etanol

4.6.1. Participação do TNF- α sobre a curva concentração-efeito para acetilcolina

Não houve alteração na resposta de relaxamento à acetilcolina entre os grupos experimentais (Figura 6; Tabela 1).

Figura 6. Efeito do consumo crônico de etanol no relaxamento induzido pela acetilcolina em anéis de artéria aorta torácica PVAT⁺ e PVAT⁻ de camundongos WT e TNFR1^{-/-}. As curvas concentração-efeito para acetilcolina foram determinadas em anéis com endotélio de camundongos WT e TNFR1^{-/-} tratados ou não com etanol. Os valores representam a média $\pm$ E.P.M. (n = 4-8 animais)

Tabela 1 - Efeito do consumo de etanol sobre os valores de $E_{\max}$ (% relaxamento) e pD_2 da acetilcolina em anéis de aorta com endotélio.

	PVAT ⁻		PVAT ⁺	
	$E_{\max}$ (% relaxamento)	pD_2	$E_{\max}$ (% relaxamento)	pD_2
WT				
Controle	93,23 $\pm$ 12,77 (5)	6,93 $\pm$ 0,64	87,01 $\pm$ 9,37 (4)	6,90 $\pm$ 0,82
Etanol	87,94 $\pm$ 11,10 (5)	7,56 $\pm$ 0,41	94,41 $\pm$ 5,48 (4)	7,42 $\pm$ 0,51
TNFR1^{-/-}				
Controle	102,70 $\pm$ 8,55 (8)	7,37 $\pm$ 0,26	96,17 $\pm$ 18,36 (6)	6,85 $\pm$ 0,25
Etanol	95,10 $\pm$ 10,44 (7)	7,53 $\pm$ 0,26	93,59 $\pm$ 6,10 (7)	6,52 $\pm$ 0,44

Os valores são expressos como a média $\pm$ EPM. Algarismos entre parênteses indicam o número de preparações.

4.6.2. Participação do TNF- α sobre a curva concentração-efeito para NPS após o consumo crônico de etanol

O consumo crônico de etanol não afetou a resposta de relaxamento independente do endotélio induzida pelo NPS nos anéis de aorta PVAT⁺ e PVAT⁻ pré-contraídos com fenilefrina (Figura 7; Tabela 2).

Figura 7. Efeito do consumo crônico de etanol no relaxamento induzido pelo nitroprussiato de sódio (NPS) em anéis de artéria aorta torácica PVAT⁺ e PVAT⁻ de camundongos WT e TNFR1^{-/-}. As curvas dose-resposta foram determinadas em anéis sem endotélio de camundongos WT e TNFR1^{-/-} tratados ou não com etanol. Os valores representam a média $\pm$ E.P.M. (n = 4-8 animais).

Tabela 2- Efeito do consumo de etanol sobre os valores de $E_{\max}$ (% relaxamento) e pD_2 do NPS em anéis de aorta sem endotélio.

	PVAT ⁻		PVAT ⁺	
	$E_{\max}$ (% relaxamento)	pD_2	$E_{\max}$ (% relaxamento)	pD_2
WT				
Controle	111,56 $\pm$ 4,72 (8)	7,70 $\pm$ 0,11	100,69 $\pm$ 10,55 (4)	7,25 $\pm$ 0,21
Etanol	118,33 $\pm$ 5,25 (6)	7,44 $\pm$ 0,23	113,831 $\pm$ 12,09 (4)	7,98 $\pm$ 0,27
TNFR1^{-/-}				
Controle	119,20 $\pm$ 3,62 (6)	7,98 $\pm$ 0,21	117,96 $\pm$ 4,6 (6)	7,46 $\pm$ 0,10
Etanol	117,10 $\pm$ 7,98 (4)	7,70 $\pm$ 0,16	117,05 $\pm$ 2,2 (5)	7,70 $\pm$ 0,16

Os valores são expressos como a média $\pm$ EPM. Algarismos entre parênteses indicam o número de preparações.

4.7. Participação do TNF- α sobre a formação de ERO após o consumo crônico de etanol

4.7.1. Participação do TNF- α sobre a formação de O_2^- *in situ* após consumo de etanol

Foi observado um aumento nos níveis de O_2^- na camada média da aorta e no PVAT dos animais WT tratados com etanol. Este aumento não foi observado nos animais TNFR1^{-/-} tratados ou não com etanol. As setas mostram a presença do PVAT (Figura 8).

Figura 8. Avaliação dos níveis de ERO em aortas PVAT⁻ e PVAT⁺ de animais WT e TNFR1^{-/-}. Os níveis de ERO foram avaliados por fotografias representativas de aortas (x400) incubadas com DHE (10 μ mol/L). O tratamento com etanol aumentou os níveis de ERO em aorta PVAT⁻ e PVAT⁺. Este aumento não foi verificado em animais TNFR1^{-/-}. As setas mostram a presença do PVAT.

4.7.2. Participação do TNF- α sobre a geração de O_2^- após o consumo crônico de etanol

O tratamento com etanol aumentou os níveis de O_2^- em aorta PVAT⁻ e PVAT⁺ de animais WT e este aumento não foi observado em aorta dos animais TNFR1^{-/-} (Figura 9). Além disso, em aorta PVAT⁺ a produção de O_2^- foi maior que em aortas PVAT⁻.

Figura 9. Avaliação da produção de O_2^- em aorta PVAT⁻ e PVAT⁺ de animais WT e TNFR1^{-/-}. Os níveis de O_2^- foram avaliados pelo método de quimioluminescência da lucigenina. O tratamento com etanol aumentou os níveis de O_2^- em aorta PVAT⁻ e PVAT⁺. Este aumento não foi verificado em animais TNFR1^{-/-}. As aortas PVAT⁺ apresentaram um aumento significativo na produção de O_2^- quando comparados as aortas PVAT⁻. Os valores representam a média $\pm$ E.P.M. (n=5-7). *Diferença estatística em relação aos demais grupos PVAT⁺; ** Diferença estatística em relação aos demais grupos PVAT⁻; #Diferença estatística em relação aos grupos PVAT⁻ (two-way ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni, $P < 0,05$).

4.7.3. Participação do TNF- α sobre os níveis de TBARS após o consumo de etanol

O tratamento com etanol aumentou os níveis de TBARS no plasma de animais WT e este aumento não foi observado nos animais TNFR1^{-/-} (Figura 10A). No tecido aórtico, o aumento da produção de TBARS foi observado tanto em aortas PVAT⁻ quanto em PVAT⁺ de camundongos WT tratados cronicamente com etanol. No entanto, este aumento não foi observado em aortas de camundongos TNFR1^{-/-} (Figura 10B).

Figura 10. Avaliação da produção de TBARS em plasma (A) e aorta PVAT⁻ e PVAT⁺ (B) de animais WT e TNFR1^{-/-}. Os níveis de TBARS foram avaliados utilizando kit colorimétrico. O tratamento com etanol aumentou os níveis de TBARS plasmático (n=6-7) e os níveis de TBARS em aorta PVAT⁻ e PVAT⁺ (n=8-10). Os animais TNFR1^{-/-} não apresentaram este aumento após tratamento com etanol. Os valores representam a média ± E.P.M. *Diferença estatística em relação aos demais grupos (two-way ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni, $P < 0,05$).

4.7.4. Participação do TNF- α sobre os níveis teciduais de H₂O₂ após o consumo crônico de etanol

Observou-se que o tratamento com etanol reduziu os níveis de H₂O₂ nas aortas PVAT⁻ e PVAT⁺ de animais WT (Figura 11). No tecido aórtico PVAT⁻ e PVAT⁺ de animais TNFR1^{-/-} os níveis de H₂O₂ não sofreram alteração após o tratamento com etanol. No entanto nestes

animais a sua formação é significativamente reduzida quando comparada aos animais controle WT (Figura 11).

Figura 11. Avaliação da produção de H₂O₂ em aorta PVAT⁻ e PVAT⁺ de animais WT e TNFR1^{-/-}. Os níveis de H₂O₂ foram avaliados utilizando kit fluorimétrico. O tratamento com etanol reduziu os níveis de H₂O₂ em aorta PVAT⁻ e PVAT⁺. Os animais TNFR1^{-/-} não apresentaram alterações após tratamento com etanol, no entanto a produção de H₂O₂ é acentuadamente reduzida nestes animais. Os valores representam a média ± E.P.M (n=7-8). *Diferença estatística em relação ao respectivo grupo controle PVAT⁻ ou PVAT⁺ (two-way ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni, P < 0,05).

4.7.5. Participação do TNF- α na geração de H₂O₂ *in situ* após o consumo crônico de etanol

Foi observada uma redução nos níveis de H₂O₂ na camada média das aortas e no PVAT dos animais WT tratados com etanol. Nos animais TNFR1^{-/-} tratados ou não com etanol, também foi observado uma redução dos níveis de H₂O₂. As setas mostram a presença do PVAT (Figura 12).

Figura 12. Avaliação dos níveis de H_2O_2 em aortas $PVAT^-$ e $PVAT^+$ de animais WT e $TNFR1^{-/-}$. Os níveis de H_2O_2 foram avaliados por fotografias representativas de aortas (x400) incubadas com DCFH-DA (0,5 $\mu\text{mol/L}$). O tratamento com etanol reduziu os níveis de H_2O_2 em aorta $PVAT^-$ e $PVAT^+$. Na aorta dos animais $TNFR1^{-/-}$ estes níveis encontram-se reduzidos. As setas mostram a presença do PVAT.

4.8. Participação do $TNF-\alpha$ sobre os níveis de NO após o consumo crônico de etanol

4.8.1. Participação do $TNF-\alpha$ sobre os níveis de NOx após o consumo de etanol

O tratamento com etanol não alterou os níveis de NOx no plasma dos animais (Figura 13A). Os níveis de NOx também foram avaliados em tecido aórtico $PVAT^-$ e $PVAT^+$ de animais WT e $TNFR1^{-/-}$ e o tratamento com etanol reduziu significativamente os níveis de NOx em aortas $PVAT^-$ e $PVAT^+$ de camundongos WT. No entanto, esta redução não foi observada em aortas de camundongos $TNFR1^{-/-}$ (Figura 14B).

Figura 13. Avaliação dos níveis de NOx em plasma (A) e aorta PVAT⁻ e PVAT⁺ (B) de animais WT e TNFR1^{-/-}. Os níveis de nitrato foram avaliados utilizando kit colorimétrico. O tratamento com etanol não alterou os níveis plasmáticos de NOx (n=10-16). O tratamento com etanol reduziu os níveis de NOx em aorta PVAT⁻ e PVAT⁺ de animais WT. Os animais TNFR1^{-/-} não apresentaram esta redução após tratamento com etanol (n=5-7). Os valores representam a média ± E.P.M. *Diferença estatística em relação aos demais grupos PVAT⁻ ou PVAT⁺; # Diferença estatística em relação ao grupo etanol PVAT⁻ (two-way ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni, P < 0,05).

4.8.2. Participação do TNF- α sobre a geração de NO *in situ* após o consumo crônico de etanol

Foi observada uma redução nos níveis de NO na camada média da aorta e no PVAT dos animais WT tratados com etanol. Nos animais TNFR1^{-/-} tratados ou não com etanol, essa redução dos níveis de NO não foi observada. As setas mostram a presença do PVAT.

Figura 14. Avaliação dos níveis de NO em aortas PVAT⁻ e PVAT⁺ de animais WT e TNFR1^{-/-}. Os níveis de NO foram avaliados por fotografias representativas de aortas (x400) incubadas com DAF-DA (10 μ mol/L). O tratamento com etanol reduziu os níveis de NO em aorta PVAT⁻ e PVAT⁺. Na aorta dos animais TNFR1^{-/-} estas alterações não foram observadas. As setas mostram a presença do PVAT.

4.9. Participação do TNF- α sobre a capacidade antioxidante após o consumo crônico de etanol

4.9.1. Participação do TNF- α sobre a atividade plasmática e tecidual da SOD após o consumo crônico de etanol

Observou-se que o tratamento com etanol não alterou a atividade da SOD no plasma dos animais WT e TNFR1^{-/-} (Figura 15A). No entanto, o tratamento crônico com etanol aumentou a atividade enzimática da SOD nas aortas PVAT⁻ e PVAT⁺ de animais WT (Figura 15B), e tais alterações não foram observadas nos animais TNFR1^{-/-}.

Figura 15. Avaliação da atividade da SOD no plasma (A) e na aorta (B) de animais WT e TNFR1^{-/-}. A atividade da SOD foi avaliada no plasma e aorta de animais WT e TNFR1^{-/-} por kit colorimétrico. O tratamento com etanol não alterou a atividade da SOD no plasma dos animais WT e TNFR1^{-/-} (n=7-8). O tratamento com etanol aumentou a atividade da SOD na aorta PVAT⁻ e PVAT⁺ de animais WT (n=6-7). Os valores representam a média ± E.P.M. *Diferença estatística em relação aos demais grupos PVAT⁻ e PVAT⁺ (two-way ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni, P < 0,05).

4.9.2. Participação do TNF- α sobre a atividade da CAT após o consumo crônico de etanol

Observou-se que o tratamento crônico com etanol não alterou a atividade plasmática da CAT (Figura 16A), no entanto aumentou a atividade enzimática da CAT nas aortas PVAT⁻ e PVAT⁺ de animais WT (Figura 16B), e estas alterações não foram observadas nos animais TNFR1^{-/-}. As aortas PVAT⁺ apresentaram uma redução acentuada desta enzima quando comparado às aortas PVAT⁻ (Figura 16B).

Figura 16. Avaliação da atividade da CAT no plasma (A) e na aorta (B) de animais WT e TNFR1^{-/-}. A atividade da CAT foi avaliada em plasma e na aorta de animais WT e TNFR1^{-/-}. O tratamento com etanol aumentou a atividade da CAT na aorta PVAT⁻ e PVAT⁺ de animais WT e a presença do PVAT⁺ mostrou uma redução maior na atividade tecidual desta enzima quando comparado as aortas PVAT⁻. Os valores representam a média ± E.P.M (n= 6-8). *Diferença estatística em relação aos demais grupos PVAT⁻; **Diferença estatística em relação aos demais grupos PVAT⁺; #Diferença estatística em relação ao grupo PVAT⁻ (two-way ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni, P < 0.05).

4.9.3. Participação do TNF- α sobre os níveis de GSH após o consumo crônico de etanol

Observou-se que o tratamento crônico com etanol reduziu os níveis de GSH no plasma dos animais WT. Esta redução não foi observada no plasma dos animais TNFR1^{-/-} (Figura 17A). Os níveis teciduais de GSH não foram alterados após o tratamento com etanol, no

entanto, aortas PVAT⁺ mostram um aumento nos níveis de GSH quando comparados às aortas PVAT⁻ (Figura 17B).

Figura 17. Avaliação dos níveis de GSH no plasma (A) e na aorta (B) de animais WT e TNFR1^{-/-}. Os níveis de GSH foram avaliados em plasma e aorta de animais WT e TNFR1^{-/-} por método colorimétrico. O tratamento com etanol reduziu os níveis plasmáticos de GSH nos animais WT e esta redução não foi observada nos animais TNFR1^{-/-} (n= 8-10). O tratamento com etanol não alterou os níveis de GSH na aorta PVAT⁻ e PVAT⁺ dos animais. No entanto, aortas PVAT⁺ apresentaram um aumento nos níveis teciduais de GSH (n= 7-8). Os valores representam a média ± E.P.M. *Diferença estatística em relação aos demais grupos (two-way ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni, P < 0,05).

4.9.4. Participação do TNF- α sobre a atividade da GPx após o consumo crônico de etanol

Observou-se que o tratamento crônico com etanol não alterou a atividade da GPx na aorta dos animais WT ou TNFR1^{-/-} (Figura 18).

Figura 18. Avaliação da atividade da GPx na aorta de animais WT e TNFR1^{-/-}. A atividade da GPx foi avaliada na aorta de animais WT e TNFR1^{-/-}. O tratamento com etanol não alterou a atividade da GPx na aorta PVAT⁻ e PVAT⁺ de animais WT e TNFR1^{-/-}. Os valores representam a média $\pm$ E.P.M (n= 4-8).

4.10. Participação do TNF- α sobre os níveis de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10 após o consumo crônico de etanol

O consumo crônico de etanol aumentou os níveis teciduais de TNF- α e IL-6 (Figura 19B e 20B) e os níveis plasmáticos de IL-6 (Figura 20A). Não houve alteração dos níveis plasmáticos de TNF- α (Figura 19A) após o consumo de etanol. Além disso, os níveis de TNF- α e IL-6 encontram-se aumentados nas aortas PVAT⁺ quando comparadas as aortas PVAT⁻ (Figura 19B E 20B). Os níveis plasmáticos e teciduais de IL-10 e IL-1 β (Figuras 21 e 22A e B) não foram alterados após o consumo crônico de etanol.

Figura 19. Avaliação dos níveis plasmáticos (A) e teciduais (B) de TNF- α em animais WT e TNFR1^{-/-}. Os níveis de TNF- α foram avaliados por ELISA. O tratamento com etanol aumentou os níveis de TNF- α em aorta PVAT⁻ e PVAT⁺ dos animais WT, mas não nos animais TNFR1^{-/-}. As aortas PVAT⁺ apresentaram um aumento significativo na produção de TNF- α quando comparadas as aortas PVAT⁻. Os valores representam a média $\pm$ E.P.M (n=6-9). *Diferença estatística em relação aos demais grupos PVAT⁻ ou PVAT⁺; #Diferença estatística em relação ao grupo PVAT⁻ (two-way ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni, P<0,05).

Figura 20. Avaliação dos níveis plasmáticos (A) e teciduais (B) de IL-6 em animais WT e TNFR1^{-/-}. Os níveis de IL-6 foram avaliados por ELISA. O tratamento com etanol aumentou os níveis de IL-6 em aorta PVAT⁻ e PVAT⁺ dos animais WT, mas não nos animais TNFR1^{-/-}. As aortas PVAT⁺ apresentaram um aumento significativo na produção de IL-6 quando comparadas as aortas PVAT⁻. Os valores representam a média ± E.P.M (n=5-9). *Diferença estatística em relação aos demais grupos PVAT⁻ ou PVAT⁺; #Diferença estatística em relação ao grupo PVAT⁻ (two-way ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni, P<0.05).

Figura 21. Avaliação dos níveis plasmáticos (A) e teciduais de IL-10 (B) em animais WT e TNFR1^{-/-}. Os níveis de IL-10 foram avaliados por ELISA. O tratamento com etanol não alterou os níveis de IL-10. Os valores representam a média $\pm$ E.P.M (n=4-5).

Figura 22. Avaliação dos níveis plasmáticos (A) e teciduais de IL-1 β (B) em animais WT e TNFR1^{-/-}. Os níveis de IL-1 β foram avaliados por ELISA. O tratamento com etanol não alterou os níveis de IL-1 β . Os valores representam a média $\pm$ E.P.M (n=7-8).

4.11. Participação do TNF- α sobre a atividade da MPO após o consumo crônico de etanol

O consumo crônico de etanol aumentou a atividade da MPO em aortas PVAT⁻ e PVAT⁺ de animais WT (Figura 23). Este aumento não foi observado na aorta de animais TNFR1^{-/-}.

Figura 23. Avaliação da atividade da MPO em aortas PVAT⁻ e PVAT⁺ de animais WT e TNF R1^{-/-}. A atividade da MPO foi avaliada em aorta torácica de camundongos. O tratamento com etanol aumentou a atividade da MPO em aorta PVAT⁻ e PVAT⁺. Este aumento não foi verificado em animais TNFR1^{-/-}. Os valores representam a média ± E.P.M (n=6-10). *Diferença estatística em relação aos demais grupos PVAT⁻ e PVAT⁺; (two-way ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni, P<0.05).

Fonte: A Embriaguez de Noé - Capela Sistina (Michelangelo Buonarroti, 1508-1510).

5.Discussão

No presente trabalho evidenciamos que o consumo crônico de etanol reduziu significativamente a ingestão de ração e a ingestão de líquido durante o tratamento crônico por 12 semanas. Essas alterações foram acompanhadas por um menor ganho de peso corpóreo dos animais. Essa redução de peso corrobora estudos de Chan *et al.* (1985), Wilsnack & Wilsnack *et al.* (1997), Aguiar *et al.* (2004), Tirapelli *et al.* (2008), Marchi *et al.* (2016) e Leite *et al.* (2017), onde modelos animais foram submetidos ao tratamento com etanol como única fonte de líquido e o seu consumo provocou mudanças no estado nutricional acarretando menor ganho de peso. O álcool é uma droga cuja oxidação pela enzima álcool desidrogenase produz 7.1 kcal por grama de etanol oxidado. No entanto, seu consumo é carecido de vitaminas, minerais e desregula a absorção e síntese de nutrientes essenciais (Lieber, 1991; Aguiar *et al.*, 2004). O menor ganho de peso observado pode ser justificado pela redução da ingestão de ração e líquido durante o tratamento crônico com etanol.

É importante lembrar que os dados citados se referem ao consumo crônico de etanol. Alguns estudos relacionam o consumo moderado dessa substância com um acúmulo de gordura e consequente ganho de peso corpóreo, no qual o etanol é apontado como um indutor do apetite, capaz de estimular vários sistemas implicados no controle da fome, tais como a inibição da leptina e indução de serotonina (Lands, 1993; Yeomans *et al.* 2003; 2004; Kachani *et al.*, 2008).

Em relação aos níveis plasmáticos de etanol, o modelo experimental padronizado por Yeligar *et al.* (2012) e empregado no presente estudo demonstrou níveis sanguíneos de etanol condizentes a outros tratamentos utilizados na literatura, onde a concentração sanguínea de etanol varia de 24 a 50 mmol/L (Husain *et al.*, 2004; Tirapelli *et al.*, 2008; Hipólito *et al.*, 2011). Os valores encontrados no presente estudo são de aproximadamente 200 mg/dL equivalente a 45 mmol/L, o suficiente para causar prejuízos cardiovasculares, tais como alterações da reatividade vascular, aumento do estresse oxidativo em vários tecidos e alterações da PA, como já foi demonstrado em estudos prévios em animais (Husain *et al.*, 2004; Tirapelli *et al.*, 2006a,b; Leite *et al.*, 2013; Passaglia *et al.*, 2015; Marchi *et al.*, 2016). Em seres humanos, valores sanguíneos referentes a 15 mg/dL de etanol são capazes de promover tênues alterações no organismo, porém concentrações maiores que 400 mg/dL estão relacionadas à intoxicação alcoólica (Dubowski, 1975; Urso *et al.*, 1981).

A hipertensão arterial sistêmica associada ao consumo crônico de etanol é uma condição amplamente documentada na literatura, uma vez que diversos estudos clínicos e experimentais já demonstraram a associação entre o consumo crônico de etanol e o aumento da pressão arterial (Klatsky *et al.*, 1977; Chan *et al.*, 1985; Fuchs *et al.*, 2001; Husain *et al.*,

2004, 2005; Resstel *et al.*, 2006; Husain *et al.*, 2011; Passaglia *et al.*, 2015, Marchi *et al.*, 2016). Além disso, os níveis aumentados de TNF- α são considerados fatores de risco para o desenvolvimento da HA e outras doenças cardiovasculares (Zhang *et al.*, 2009). É bem evidente na literatura a correlação entre esta citocina e aumento da PA. Giachini *et al.* (2009) mostraram que a infusão de TNF- α induz aumento da PA em camundongos WT. Da mesma forma, Filho *et al.* (2013) mostraram que o tratamento com anticorpo para TNF- α previne o aumento da PA em ratos espontaneamente hipertensos (SHR). Tais evidências confirmam a importância do TNF- α como intermediário no processo de aumento da PA apresentado neste trabalho. O mecanismo pelo qual o TNF- α provoca tal alteração envolve principalmente um prejuízo da eNOS, redução da biodisponibilidade de NO e uma vigorosa inflamação vascular causada por esta citocina (Zhang *et al.*, 2009; Giachini *et al.*, 2009; Filho *et al.*, 2013).

O presente estudo mostra que o consumo de etanol provocou um aumento da PAS. Este aumento foi observado na quarta semana de tratamento e se manteve elevado até o final do tratamento. É importante notar que nos animais TNFR1^{-/-} o aumento da PA também foi observado, no entanto essa alteração de PAS foi menor e mais tardia quando comparada aos animais WT, pois aconteceu na quinta semana de tratamento com etanol. Estas observações corroboram dados da literatura evidenciando a participação do TNF- α como um dos mediadores responsáveis pelo aumento e manutenção da PAS (Zhang *et al.*, 2009; Giachini *et al.*, 2009; Filho *et al.*, 2013). No entanto, este é o primeiro trabalho que associa o aumento da PAS mediada pelo TNF- α após o consumo crônico de etanol.

A disfunção vascular causada pelo etanol pode envolver a participação do PVAT. Este tecido modula o tônus vascular de tal forma, que é capaz de produzir um efeito anticontrátil e protetor no vaso em resposta à diferentes agonistas (Soltis & Cassis, 1991; Lohn *et al.*, 2002; Verlohren *et al.*, 2004). Os possíveis FRDA exercem um efeito protetor sobre o tônus vascular. Dentre essas substâncias estão a adiponectina (Fesus *et al.*, 2007), angiotensina 1-7 (Galvez *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2011), sulfeto de hidrogênio (Wojcicka & Jamroz-Wisniewska, 2011; Bełtowski & Jamroz-Wisniewska, 2012), metil palmitato (Lee *et al.*, 2011) e a participação dos canais para potássio (Lohn *et al.*, 2002; Verlohren *et al.*, 2004). Em nosso estudo, observamos que o aumento da resposta pré-contrátil induzida pela fenilefrina de animais WT tratados com etanol não foi observada quando o PVAT era preservado neste mesmo tecido. Essa observação sugere um papel protetor do PVAT sobre o vaso frente a um estímulo induzido por um agente contrátil.

Em relação ao relaxamento vascular, o consumo crônico de etanol não alterou o efeito vasorelaxante induzido pela acetilcolina em artérias PVAT⁺ ou PVAT⁻. A acetilcolina

promove relaxamento de forma dependente do endotélio por meio da ativação de receptores muscarínicos do tipo M₃. A ativação desses receptores é a principal causa de relaxamento em células do músculo liso vascular por intermédio da liberação de NO, um importante vasodilatador que ativa diversas vias intracelulares responsáveis pelo relaxamento vascular (Traish *et al.*, 1995). O consumo crônico de etanol não alterou o relaxamento induzido pela acetilcolina e tal resultado corrobora o estudo descrito por Tirapelli *et al.* (2008), no qual o tratamento crônico com etanol por 2 semanas não alterou a resposta vasodilatadora induzida pelo agonista em aorta de ratos. Esse dado sugere que a alteração da reatividade vascular não é a causa do aumento da PAS, considerando, então, que o aumento da PA pode ser uma consequência do consumo crônico de etanol (Tirapelli *et al.*, 2008). Da mesma forma, ao avaliar o relaxamento induzido pelo NPS, um doador de NO, observou-se que o consumo crônico de etanol não alterou a resposta vasorelaxante produzida por esse composto na aorta dos camundongos. Estas observações estão de acordo com o estudo de Utkan *et al.* (2001) mostrando que o consumo de etanol não altera o relaxamento vascular induzido pelo NPS, evidenciando que os mecanismos celulares que envolvem a via do NO-GMPc (guanosina monofosfato cíclica) não foram prejudicadas pelo etilismo.

Em nosso trabalho foi avaliado a geração de ERO e as condições dos sistemas de defesa antioxidantes. As ERO são importantes constituintes da fisiologia da célula e geralmente são produzidas frente a estímulos exógenos ou respostas endógenas e, são frequentemente sintetizadas, transformadas e consumidas durante uma atividade metabólica celular normal (Murphy *et al.*, 2011; Schieber *et al.*, 2014; Paniere & Santoro, 2015). Um conjunto de evidências sugere a existência de um intrincado equilíbrio entre o sistema de produção e inativação das ERO que são reguladas de acordo os elementos celulares redox sensíveis, modulando os eventos de sinalização celular (Paniere & Santoro, 2015). As células endoteliais, por exemplo, são expostas a todo o momento a estímulos bioquímicos e mecânicos e as ERO podem atuar como uma via de mão dupla na manutenção da função vascular nessas células. Um aumento significativo das ERO pode promover um aumento na proliferação e sobrevivência celular. No entanto, quando há uma produção exacerbada e a carga de ERO atinge um limiar tóxico, pode acarretar a perda da capacidade antioxidante e morte celular. Entende-se que deve haver um equilíbrio entre a formação e a eliminação dessas substâncias mantendo uma homeostase do estado redox da célula (Paniere & Santoro, 2015). Além disso, sua produção é muito importante na fisiopatologia do etilismo sobre o sistema cardiovascular, uma vez que o álcool é metabolizado no fígado à acetaldeído, pela enzima álcool desidrogenase e, em seguida, é oxidado a acetato pela enzima acetaldeído

desidrogenase, o que resulta na geração de ERO. As ERO são quimicamente reativas e incluem diversos radicais livres como o O_2^- , o radical hidroxil ($\bullet OH$) e compostos não radicalares como o H_2O_2 (Scott *et al.*, 1999; Husain *et al.*, 2011). Frente a estas informações, no presente estudo foi avaliada a formação de diferentes ERO por meio de técnicas qualitativas e quantitativas.

A avaliação da produção de O_2^- , uma das principais ERO, foi realizada em nosso estudo utilizando o ensaio de quimioluminescência da lucigenina. Esta técnica é utilizada para avaliar a produção de O_2^- advindo da enzima NA(P)DH oxidase presente na vasculatura, uma vez que para a realização do ensaio é adicionado um dos substratos da enzima, o NADPH (Pagano *et al.*, 1995). Os resultados mostraram que o consumo de etanol aumentou os níveis de O_2^- em tecido aórtico PVAT⁻ e PVAT⁺ de camundongos WT. Este aumento não foi observado em tecido aórtico de animais TNFR1^{-/-}. Tal resultado corrobora as imagens obtidas com a sonda DHE, sendo possível visualizar *in situ* o aumento da geração de O_2^- . Esse aumento foi observado pela intensidade de fluorescência produzida pela reação do DHE com o O_2^- , resultando na formação do 2-hidroxietídeo e etídeo, produtos que emitem uma fluorescência avermelhada. Este achado permite sugerir que, neste modelo de consumo crônico de etanol, o O_2^- presente em excesso no tecido aórtico PVAT⁻ e PVAT⁺, tem como principal fonte enzimática a NAD(P)H oxidase, e que o TNF- α é um importante mediador no processo de geração dessas ERO. Além disso, o PVAT não se mostrou benéfico em reduzir o aumento do O_2^- em artérias cujo tecido manteve-se intacto. É importante salientar que em condições fisiológicas, o PVAT promove ação benéfica sobre o controle do tônus vascular, porém em condições patológicas, como a HA, ele pode ser extremamente prejudicial (Guzik *et al.*, 2007; Oriowo, 2015), uma vez que o PVAT pode produzir fatores contráteis como angiotensina II (Oriowo, 2015) e O_2^- advindos da NA(P)H oxidase (Gao *et al.*, 2006; Oriowo, 2015). Ao avaliar a formação de O_2^- em aortas PVAT⁺, os resultados mostraram que os níveis dessa ERO encontram-se aumentadas quando comparadas as aortas PVAT⁻. Além disso, o tratamento com etanol induziu ainda mais a formação de O_2^- em artérias PVAT⁺ mostrando que este tecido em situações de etilismo crônico induz um aumento da formação de ERO.

Uma importante característica mediada pelo TNFR1 está relacionada à sua capacidade em promover a formação de ERO via ativação da enzima NAD(P)H oxidase. Yazdanpanah *et al.* (2009), mostraram que esta ativação ocorre por intermédio de uma riboflavina quinase (RBK) que forma ligações entre o receptor TNFR1 e a subunidade p22phox da enzima NAD(P)H oxidase. Outros autores sugerem que o TNF- α é capaz de aumentar a atividade desta enzima por meio de uma superexpressão de suas subunidades catalíticas, em especial

Nox1, Nox2 e Nox4 (De Keulenaer *et al.*, 1998; Moe *et al.*, 2006; Morgan *et al.*, 2008). Uma vez formada, as ERO reagem de forma inespecífica e rápida com DNA, proteínas, lipídeos e carboidratos, causando danos moleculares, tais como a mutação do DNA, oxidação de proteínas, peroxidação lipídica (Yazdanpanah *et al.*, 2009) e podem ainda iniciar um processo de morte celular por ativação de diversas outras vias de sinalização (Morgan *et al.*, 2007).

O tratamento com etanol aumentou os níveis de TBARS no plasma e no tecido aórtico PVAT⁻ e PVAT⁺ de animais WT e este aumento não foi observado nos animais TNFR1^{-/-}. O aumento dos níveis de TBARS é um indicativo da peroxidação lipídica que ocorre nas membranas, como consequência do estresse oxidativo. Este dado corrobora estudos recentes da literatura nos quais destacam o acentuado aumento dos níveis de TBARS após exposição crônica ao etanol (Passaglia *et al.*, 2015; Marchi *et al.*, 2016). É importante salientar que o aumento de TBARS ocorreu também no plasma dos animais tratados com etanol, sugerindo que a geração de TBARS é um fenômeno sistêmico e não apenas tecidual. Yogi *et al.* (2012) mostraram que o consumo agudo de etanol também induz aumento dos níveis de TBARS sistemicamente. Esse resultado, juntamente com o obtido neste trabalho mostra que tanto a ingestão crônica como a ingestão aguda podem causar peroxidação lipídica sistemicamente. Como tais alterações não foram vistas nos animais TNFR1^{-/-}, podemos sugerir que o aumento dos níveis de TBARS e a peroxidação lipídica vascular induzida pelo consumo crônico de etanol são mediadas pelo TNF- α e que o PVAT não altera essa resposta.

O NO é um radical livre, gasoso e incolor, muito importante para a homeostase vascular, uma vez que é um vasodilatador liberado pelas células endoteliais e é produzido por ação das isoformas da óxido nítrico sintase (NOS), as quais convertem a L-arginina em L-citrulina e NO (Briones & Touyz, 2010). O NO produzido na célula endotelial difunde-se rapidamente para a célula muscular e para o lúmen vascular (Ignarro, 1989). A difusão rápida e a facilidade com que esta molécula penetra em outras células ocorrem graças ao seu pequeno tamanho e à sua característica lipofílica (Moncada *et al.*, 1991). Durante o consumo de etanol, uma acentuada redução na biodisponibilidade de NO pode ser identificada (Husain *et al.*, 2005, 2011; Passaglia *et al.*, 2015). Isso pode acontecer por dois motivos principais: pela geração excessiva de O₂⁻ que reagem com o NO para formar o ONOO⁻, uma molécula altamente instável (Rubany & Vanhoutte, 1986) capaz de oxidar proteínas, lipídios e ácidos nucléicos provocando danos celulares e assim reduzindo a biodisponibilidade de NO (Tousoulis *et al.*, 2014); ou por atuação direta do TNF- α sobre a NOS promovendo diminuição da síntese de NO (Zang *et al.*, 2009). Em nosso estudo, o tratamento com etanol

não alterou as concentrações plasmáticas de NO_x, porém reduziu significativamente os níveis de NO_x teciduais e diminuiu os níveis de NO *in situ* no tecido aórtico de camundongos WT e, mais uma vez, essa alteração não foi observada nos animais TNFR1^{-/-}. O DAF-2DA, utilizado para avaliar os níveis de NO *in situ*, é um composto permeável à membrana celular e, uma vez dentro das células, é clivado por esterases em 3,4-diaminofluoresceína (DAF-2). O DAF-2 reage com o NO na presença de oxigênio formando o triazolodiaminofluoresceína (DAF-2T), um composto que emite uma fluorescência esverdeada (Halbach, 2003). Esse resultado sugere que a redução da biodisponibilidade de NO é tecidual e não sistêmica. Essa observação corrobora dados da literatura que correlacionam à redução da biodisponibilidade de NO após exposição ao etanol (Tirapelli *et al.* 2008, Husain *et al.*, 2011). Além disso, o TNF- α é capaz de atuar diretamente sobre a eNOS (Anderson *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2009), modificando sua função. Diante desses dados, podemos sugerir que o TNF- α é um importante mediador da redução da biodisponibilidade de NO, e tal redução pode ocorrer por ação direta do TNF- α sobre a NOS ou pela reação do NO com as ERO.

Os dados descritos até agora reforçam as evidências de que o consumo crônico de etanol aumenta a formação de ERO, peroxidação lipídica e disfunção endotelial, e que o TNF- α é um dos possíveis mediadores de tais respostas. Além disso, é bem descrito na literatura o papel do TNF- α como indutor do estresse oxidativo e disfunção endotelial em diversos modelos fisiopatológicos, como por exemplo, em modelo de diabetes, obesidade e isquemia (Picchi *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2006; Gao *et al.*, 2007; Carneiro *et al.*, 2010). Apesar da existência de um efeito protetor do PVAT sobre o tônus vascular bem descrito na literatura, de acordo com nossos resultados, em situações de consumo crônico de etanol, este efeito benéfico aparenta prejudicado, mostrando aumento da produção de ERO e redução de NO. Essa disfunção promovida pelo PVAT corrobora dados científicos, porém em outras situações fisiopatológicas, tais como obesidade, diabetes, lesão vascular, infecções e senilidade (Guzik *et al.*, 2007; Ketonen *et al.*, 2010; Miao & Li, 2011), onde ocorre disfunção vascular. Inovadoramente, este é o primeiro trabalho que associa o TNF- α e o PVAT com o consumo crônico de etanol.

Sugere-se que a formação exacerbada de ERO pelo consumo crônico de etanol é capaz de reagir com o NO tecidual, reduzindo sua biodisponibilidade (Tousoulis *et al.*, 2014). Esse dado explicaria a redução acentuada dos níveis de NO_x e aumentada de O₂⁻ em ambos tecidos aórticos PVAT⁺ e PVAT⁻. Dados científicos atuais mostram que o consumo de etanol é capaz de aumentar os níveis de O₂⁻ e reduzir a biodisponibilidade de NO. Passaglia *et al.* (2015) e Marchi *et al.* (2016) mostraram um aumento dos níveis de TBARS, O₂⁻ e redução dos níveis

de NOx em aorta torácica de ratos tratados com etanol 20% corroborando os achados do presente estudo.

O excesso de ERO formado na vasculatura pode ser neutralizado pelos sistemas de defesa antioxidantes enzimáticos. Entre eles destacam-se a SOD, CAT, GPx, além de tioredoxinas e peroxiredoxinas (Gongora *et al.*, 2006; Tajima *et al.*, 2009, Li *et al.*, 2013).

A SOD é a primeira linha de defesa contra os efeitos prejudiciais dos radicais livres. Esta enzima é capaz de catalisar a reação de dismutação do O_2^- em H_2O e H_2O_2 (Forstermann *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2013). Em mamíferos, existem três isoformas da SOD: a Cu-ZnSOD (SOD 1), uma enzima solúvel localizada no citoplasma e no espaço mitocondrial, a Mn-SOD (SOD 2), presente na matriz mitocondrial e a eSOD (SOD 3), uma enzima excretada para o meio extracelular (Popolo *et al.*, 2013). O O_2^- formado pode agir como um agente oxidante, sendo dismutado a H_2O_2 pela SOD, ou pode agir como agente redutor, doando o seu elétron extra ao NO para formar $ONOO^-$ (McIntyre *et al.*, 1999). Em condições fisiológicas, a SOD assegura que a primeira reação ocorra. Porém, em condições de estresse oxidativo, quando as células são expostas a níveis excessivos de ERO, quantidades significativas de O_2^- reagem com o NO formando o $ONOO^-$. Em nosso trabalho, o tratamento crônico com etanol não aumentou a atividade plasmática da SOD, porém aumentou significativamente a sua atividade em aortas $PVAT^+$ e $PVAT^-$ de camundongos WT, mas não em $TNFR1^{-/-}$. Este aumento tecidual mostra que essa alteração enzimática é local, ou seja, ocorre apenas no vaso em estudo. Este aumento enzimático da SOD pode ser explicado pela ocorrência da excessiva produção de O_2^- tecidual, uma vez que a SOD é a primeira linha de defesa no combate ao excesso desta substância. No entanto, existem trabalhos na literatura mostrando que a eficiência da SOD encontra-se diminuída após o tratamento com etanol. Essas alterações enzimáticas podem estar relacionadas à interação do substrato O_2^- e o produto da reação, o H_2O_2 , levando a produção de OH^- , podendo causar dano diretos a SOD, alterando sua eficiência in vivo (Schisler & Singh, 1989; Schlorff, 1999). Outros trabalhos, como os de Koch *et al.* (1994; 2000) sugeriram que o aumento da SOD ocorreria frente um mecanismo adaptativo à altas situações de estresse oxidativo com aumento de ERO. Park *et al.* (2012) mostraram que a exposição ao etanol promoveu um aumento da expressão da SOD-2 em células do epitélio intestinal de humanos. Marchi *et al.*, 2016 mostraram um aumento da expressão da SOD-2 em aorta de ratos após exposição crônica ao etanol. Esses resultados corroboram nossas observações de que o consumo de etanol aumenta a atividade desta enzima em aorta de camundongos WT. Além disso, existe uma forte associação entre o aumento dos níveis de TNF- α e da atividade da SOD-2. Dados da literatura mostram que o TNF- α é capaz

de modular a atividade e a expressão da SOD-2 por meio da transcrição de seus genes e aumento de sua atividade, promovendo uma proteção contra o aumento excessivo de radicais livres (Wong GH & Goeddel, 1988; Warner *et al.*, 1991; Wong, 1995). O PVAT não exerce nenhum efeito protetor no aumento da atividade da SOD e o TNF- α parece ser um importante mediador do aumento da resposta da atividade da SOD.

O H_2O_2 formado pela dismutação do O_2^- , sob ação das enzimas CAT e GPx, é convertido a H_2O e O_2 (Briones & Touyz, 2010). O H_2O_2 pode exercer efeitos prejudiciais nas células quando produzido em quantidades exacerbadas, principalmente pelo fato de ser capaz de produzir OH^- . Assim como o O_2^- , o H_2O_2 ativa diferentes vias intracelulares de sinalização e tem uma maior estabilidade quando comparado ao O_2^- (Montezano & Touyz, 2012). Nossos resultados mostraram que o consumo crônico de etanol reduziu os níveis de H_2O_2 em artérias PVAT $^-$ e PVAT $^+$. Alterações na atividade das principais enzimas que regulam a concentração intracelular de H_2O_2 , dentre as quais, CAT e GPx, podem levar à diminuição ou ao aumento dos níveis de H_2O_2 nas células. A diminuição do H_2O_2 aqui descrito pode ser resultado do aumento da atividade da enzima CAT observado no tecido aórtico dos animais WT tratados com etanol. A CAT é uma potente enzima antioxidante e tem um importante papel no sequestro de H_2O_2 , formado a partir de altas concentrações de O_2^- (Husain *et al.*, 2004; Singh *et al.*, 2012). Nos animais TNFR1 $^{-/-}$ tratados ou não com etanol observou-se que os níveis de H_2O_2 encontram-se reduzidos. Sugere-se que a ausência do receptor TNFR1 atue como um fator protetor, uma vez que em quantidades exacerbadas o H_2O_2 pode causar efeitos prejudiciais nas células, e nestes animais as quantidades encontram-se reduzidas.

Outra fonte enzimática responsável por manter o equilíbrio das ERO é a GPx. Esta enzima defende o organismo do estresse oxidativo através da redução do H_2O_2 em H_2O e lipoperóxidos em álcoois. Para que isso ocorra, a GPx utiliza a GSH como substrato da sua reação, levando a formação do dissulfeto oxidado (GSSG). Já a enzima GR transforma o GSSG a GSH novamente. Assim, a GSH é um tripeptídeo mantido sob a forma reduzida por um eficiente sistema enzimático envolvendo a GPx e a GR. Além disso, é um importante antioxidante endógeno que ajuda a proteger as células de estímulos nocivos advindos dos radicais livres e desempenha um importante papel na regulação da pressão arterial e da função cardiovascular (Husain *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2006; Onyema *et al.*, 2006). Singh & Ahluwalia (2012) mostraram que a redução dos níveis de GSH estão associados ao consumo de etanol em coração de ratos. Da mesma forma, o mesmo grupo de pesquisa mostrou que os níveis de GSH também estão reduzidos em artérias de ratos após consumo de etanol (Singh *et al.*, 2012). Nesse mesmo sentido, Husain *et al.* (2004) mostraram redução na atividade da GPx

e da relação GSH:GSSG em plasma de ratos tratados com etanol por 12 semanas. Em nosso estudo, os níveis de GSH e de GPx não foram alterados no tecido aórtico após consumo crônico de etanol. No entanto, os níveis plasmáticos de GSH mostraram-se diminuídos após o tratamento com etanol, indicando uma alteração sistêmica dos níveis desse tripeptídeo endógeno. Uma redução nos níveis de GSH indica um aumento da susceptibilidade aos danos oxidativos celulares (Singh & Ahluwalia, 2012; Singh *et al.*, 2012).

É importante ressaltar que as alterações observadas no sistema de defesa antioxidante (SOD, CAT e GSH) não foram observadas nos animais TNFR1^{-/-}, reforçando a hipótese de que o TNF- α é um importante mediador dos danos oxidativos vasculares induzidos pelo consumo de etanol e sua atuação altera o funcionamento adequado deste sistema. O fato de não observarmos alterações das enzimas antioxidantes nos animais TNFR1^{-/-}, pode ocorrer por 2 motivos: um fator protetor ocasionado pela ausência do receptor TNFR1, ou pelo fato de que nesses animais poucas alterações e danos oxidativos foram vistos, mantendo normalizada a manutenção do sistema de defesa antioxidante. É importante destacar também que o aumento de ERO é observado em diversos modelos animais onde os níveis de TNF- α encontram-se aumentados (Picchi *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2006, Gao *et al.*, 2007), mostrando a forte associação entre o TNF- α e sua atuação em induzir severa disfunção vascular.

O aumento dos níveis de TNF- α é bem evidenciado durante o consumo de etanol tanto em modelos animais como em humanos, principalmente em soro/plasma, fígado e também no sistema vascular. Limuro *et al.* (1997), mostraram que animais tratados com etanol apresentaram severos danos hepáticos, e tais danos foram revertidos pelo uso de um anticorpo anti-TNF- α . Yin *et al.* (1999), observaram que o consumo de etanol aumentou os níveis de citocinas pró-inflamatórias no fígado de animais WT. Lin *et al.* (1998), mostraram aumento dos níveis de TNF- α no fígado de camundongos tratados cronicamente com etanol. Estudos clínicos também mostram que pacientes etilistas apresentaram aumento plasmático dos níveis de TNF- α (Bird *et al.*, 1990; Felver *et al.*, 1990). Ao avaliar os efeitos do etanol na vasculatura, Husain *et al.* (2011), mostraram que animais tratados com etanol 20% por 12 semanas, apresentaram aumento da expressão proteica de TNF- α no tecido aórtico. Nesse mesmo sentido, diversos estudos mostram que o consumo de etanol é capaz de induzir aumentos dos níveis teciduais e sanguíneos de IL-6, outra citocina pró-inflamatória considerada um biomarcador de doença cardiovascular e muito importante no desencadear do processo inflamatório (Lin *et al.*, 1998; El-Taouky *et al.*, 2006). Em nosso trabalho, o consumo crônico de etanol foi capaz de aumentar os níveis de TNF- α e IL-6 no tecido aórtico

PVAT⁺ e PVAT⁻ e os níveis de IL-6 no plasma de camundongos WT. Além disso, nas aortas PVAT⁺ observou-se um aumento dos níveis das respectivas citocinas, TNF- α e IL-6, quando comparadas as aortas PVAT⁻. As citocinas IL1- β e IL-10 não sofreram alterações em tecido aórtico e em plasma dos camundongos tratados com etanol. O PVAT é conhecido como uma importante fonte de adipocinas e citocinas pró-inflamatórias, (Szasz & Webb, 2012) corroborando nossos achados onde artérias PVAT⁺ têm um aumento dos níveis de IL-6 e TNF- α . O TNF- α e a IL-6 são de grande importância para o sistema cardiovascular e são responsáveis pelo desencadear de diversas doenças metabólicas sendo consideradas biomarcadores de doenças cardiovasculares. O aumento das citocinas supracitadas observadas no presente estudo corrobora os recentes trabalhos de Leite *et al.* (2017) e Simplicio *et al.* (2017). Nestes trabalhos, os autores mostram que o consumo de etanol induz aumento dos níveis de TNF- α e IL-6, provocando danos vasculares e estresse oxidativo tecidual. Além disso, o aumento dos níveis de TNF- α parecem induzir um mecanismo de “feedback positivo”, onde quanto maior a produção de TNF- α causado pelo consumo crônico de etanol, mais ele é capaz de induzir a sua própria transcrição gênica e aumentar sua geração tecidual. É bem elucidada na literatura a capacidade do TNF- α em induzir não só o aumento de sua própria geração, como também a geração de outras citocinas pró-inflamatórias, em especial a IL-6. Essa indução pode ocorrer por ativação de tirosinas quinases ou por intermédio de fatores de transcrição (Amiot *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 2009; Tanabe *et al.*, 2010). Considerando que ambas citocinas, TNF- α e IL-6, são marcadores biológicos de doenças cardiovasculares, percebe-se o malefício que o aumento das mesmas pode causar no tecido vascular. Frente a estas considerações, observamos que o TNF- α é um importante protagonista da resposta inflamatória e oxidativa induzida pelo consumo crônico de etanol.

A atividade enzimática da MPO correlaciona-se fortemente com a inflamação vascular, uma vez que esta enzima é amplamente encontrada nos grânulos azurófilos de neutrófilos, representando 5% de seu peso seco (Cross *et al.*, 2003; Klebanoff, 2005). Sua atividade enzimática engloba desde a ativação de citocinas, quinases e outras enzimas, mostrando que os efeitos da MPO abrangem desde uma simples sinalização celular até a migração e ativação de células inflamatórias (Schreck *et al.*, 1982). Em nosso estudo, o aumento da atividade da MPO concatena-se fortemente com o número de neutrófilos recrutados durante o processo inflamatório e corrobora a ideia de que o consumo de etanol desencadeia um processo inflamatório na vasculatura. Essa resposta não foi observada na aorta de animais TNFR1^{-/-}, sugerindo que o TNF- α é um importante mediador da migração de células inflamatórias induzidas pelo consumo crônico de etanol. Além disso, o PVAT não mostrou nenhum efeito

benéfico em inibir a migração de neutrófilos, mostrando ser uma importante fonte de mediadores inflamatórios em situações associadas ao consumo de etanol.

Diante dos dados apresentados, concluímos que o consumo crônico de etanol induz aumento dos níveis de TNF- α , que por sua vez induz aumento da geração de O₂⁻, redução da biodisponibilidade de NO, aumento da peroxidação lipídica, alterações da atividade das enzimas antioxidantes (SOD e CAT), aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias e migração de neutrófilos para o tecido aórtico. O PVAT não desempenha ação protetora contra os danos oxidativos e inflamatórios induzidos pelo etanol e o TNF- α mostra-se participativo em todas as etapas dos prejuízos vasculares, indicando que esta citocina contribui para os efeitos deletérios causados pelo consumo crônico de etanol na vasculatura.

Fonte:A Embriaguez de Noé – Capela Sistina (Michelangelo Buonarroti, 1508-1510).

- Aggarwal BB. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol.* 2003 Sep;3(9):745-56.
- Aghamohammadzadeh R, Withers S, Lynch F, Greenstein A, Malik R, Heagerty A. Perivascular adipose tissue from human systemic and coronary vessels: the emergence of a new pharmacotherapeutic target. *Br J Pharmacol.* 2012;165:670-682.
- Aguiar AS, Da-silva VA, Boaventura GT. Can calories from ethanol contribute to body weight preservation by malnourished rats? *Braz J Med Biol Res.* 2004; 37:841-846.
- Al-Lamki RS, Wang J, Skepper JN, Thiru S, Pober JS, Bradley JR. Expression of tumor necrosis factor receptors in normal kidney and rejecting renal transplants. *Lab Invest.* 2001; 81(11):1503–1515.
- Amiot F, Boussadia O, Cases S, Fitting C, Lebastard M, Cavaillon JM *et al.* Mice heterozygous for a deletion of the tumor necrosis factor- α and lymphotoxin- α genes: biological importance of a nonlinear response of tumor necrosis factor- α to gene dosage. *Eur. J. Immunol.* 1997;27:1035-1042.
- Anderson HD, Rahmutula D, Gardner DG. Tumor necrosis factor- α inhibits endothelial nitric-oxide synthase gene promoter activity in bovine aortic endothelial cells. *J Biol Chem.* 2004 Jan;279(2):963-9.
- Babor T, Caetano R. Evidence-Based Alcohol Policy in the Americas: Strengths, Weaknesses, and Future Challenges. *Rev. Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health* 2005;18:4-5.
- Bass DA, Parce W, Dechatelet LR, Szejda P, Seeds MC, Thomas M. Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation. *Journal of Immunology.* 1983, v. 130, p. 1910-1917.
- Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol.* 1996; 5:C1424-C1437.
- Beltowski J, Jamroz-Wiśniewska A: Modulation of H₂S metabolism by statins: a new aspect of cardiovascular pharmacology. *Antioxid Redox Signal.* 2012;17:81-94.
- Bird GL, Sheron N, Goka AK, Alexander GJ. Williams, RS. Increased plasma tumor necrosis factor in severe alcoholic hepatitis. *Annals of Internal Medicine.* 1990;112(12):917-920.
- Briones AM, Touyz RM. Oxidative stress and hypertension: current concepts. *Curr Hypertens Rep.* 2010 Apr;12(2):135-42.
- Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res.* 2000;10:840-844.
- Carda AP, Marchi KC, Rizzi E, *et al.* Acute restraint stress induces endothelial dysfunction: role of vasoconstrictor prostanoids and oxidative stress. *Stress.* 2015;18(2):233-43.
- Carneiro FS, Webb RC, Tostes RC. Emerging role for TNF- α in erectile dysfunction. *J Sex Med.* 2010;7(12):3823-34.

- Chan TC, Wall RA, Sutter MC. Chronic ethanol consumption, stress, and hypertension. *Hypertension*. 1985;7:519-24.
- Chan TCK, Sutter MC. Ethanol consumption and blood pressure. *Life Sci*. 1983;33(20):1965-73.
- Chia S, Qadan M, Newton R, Ludlam CA, Fox KA, Newby DE. Intra-arterial tumor necrosis factor- α impairs endothelium-dependent vasodilatation and stimulates local tissue plasminogen activator release in humans. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 2003;23:695-701.
- Cross AS, Sakarya S, Rifat S, et al. Recruitment of murine neutrophils in vivo through endogenous sialidase activity. *J. Biol. Chem*. 2003;278(6): 4112-20.
- Das SK, Mukherjee S, Gupta G, Rao DN, Vasudevan DM. Protective effect of resveratrol and vitamin E against ethanol-induced oxidative damage in mice: biochemical and immunological basis. *Indian J Biochem Biophys*. 2010;47(1):32-7.
- De Keulenaer GW, Alexander RW, Ushio-Fukai M, Ishizaka N, Griendling KK. Tumour necrosis factor alpha activates a p22phox-based NADH oxidase in vascular smooth muscle. *Biochem J*. 1998;329(Pt 3):653-657.
- Di Castelnuovo A, Costanzo S, di Giuseppe R, de Gaetano G, Iacoviello L. Alcohol consumption and cardiovascular risk: mechanisms of action and epidemiologic perspectives. *Future Cardiol*. 2009 Sep;5(5):467-77.
- Dubowski, K.M. Stages of acute alcoholic influence/intoxication: Chemical test training school student manual. North Dakota State Toxicology Laboratory. 1975;43.
- Dubrovskaya G, Verlohren S, Luft FC, Gollasch M. Mechanisms of ADRF release from rat aortic adventitial adipose tissue. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004;286:H1107-H1113.
- El-Taukhy MA, Salama SM, Abou-Shousha SA, Ismail SS, Saleh M. Effects of chronic ethanol and vitamin C administration on production of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 in rats. *Egypt J Immunol*. 2006;13(1):1-10.
- Felver ME, Mezey E, McGuire M *et al*. Plasma tumor necrosis factor alpha predicts decreased longterm survival in severe alcoholic hepatitis. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*. 1990;14(2):255-259.
- Fésüs G, Dubrovskaya G, Gorzelniak K, Kluge R, *et al*. Adiponectin is a novel humoral vasodilator. *Cardiovasc Res*. 2007;75(4):719-27.
- Filho AG, Kinote A, Pereira DJ *et al*. Infliximab prevents increased systolic blood pressure and upregulates the AKT/eNOS pathway in the aorta of spontaneously hypertensive rats. *Eur J Pharmacol*. 2013;700(1-3):201-9.
- Forstermann U & Sessa, WC. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J*. 2012 Apr;33(7):829–837.
- Fuchs FD, Chambless LE, Whelton PK, Nieto FJ, Heiss G. Alcohol consumption and the incidence of hypertension. The atherosclerosis risk in communities study. *Hypertension* 2001; 37:1242-50.

- Galvez B, de Castro J, Herold D *et al.* Perivascular adipose tissue and mesenteric vascular function in spontaneously hypertensive rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006 Jun;26(6):1297-302.
- Gálvez-Prieto B, Bolbrinker J, Stucchi P *et al.* Comparative expression analysis of the rennin angiotensin system components between white and brown perivascular adipose tissue. *J Endocrinol.* 2008;197:55–64.
- Gao X, Belmadani S, Picchi A *et al.* Tumor necrosis factor- α induces endothelial dysfunction in Lepr^{db} mice. *Circulation.* 2007;115:245-254.
- Gao X, Xu X, Belmadani S *et al.* TNF- α contributes to endothelial dysfunction by upregulating arginase in ischemia/reperfusion injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007 Jun;27(6):1269-75.
- Gao YJ, Lu C, Su LY, Sharma AM, Lee RM. Modulation of vascular function by perivascular adipose tissue: The role of endothelium and hydrogen peroxide. *Br J Pharmacol.* 2007;151:323-331.
- Gao YJ, Takemori K, Su LY *et al.* Perivascular adipose tissue promotes vasoconstriction: The role of superoxide anion. *Cardiovasc Res.* 2006;71:363-373.
- Giachini FR, Zemse SM, Carneiro FS *et al.* Interleukin-10 attenuates vascular responses to endothelin-1 via effects on ERK1/2-dependent pathway. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2009 Feb;296(2):H489-96.
- Gongora MC, Qin Z, Laude K *et al.* Role of extracellular superoxide dismutase in hypertension. *Hypertension.* 2006 Sep;48(3):473-81.
- Gonzaga NA, Callera GE, Yogi A *et al.* Acute ethanol intake induces mitogen-activated protein kinase activation, platelet-derived growth factor receptor phosphorylation, and oxidative stress in resistance arteries. *J Physiol Biochem.* 2014 Jun;70(2):509-23.
- Gonzaga NA, Mecawi AS, Antunes-Rodrigues J, De Martinis BS, Padovan CM, Tirapelli CR. Ethanol withdrawal increases oxidative stress and reduces nitric oxide bioavailability in the vasculature of rats. *Alcohol.* 2015 Feb;49(1):47-56.
- Greenstein AS, Khavandi K, Withers SB *et al.* Local inflammation and hypoxia abolish the protective anticontractile properties of perivascular fat in obese patients. *Circulation.* 2009 Mar 31;119(12):1661-70.
- Guzik TJ, Marvar PJ, Czesnikiewicz-Guzik M, Korb R. Perivascular adipose tissue as a messenger of the brain-vessel axis: role in vascular inflammation and dysfunction. *J Physiol Pharmacol.* 2007 December; 58(4): 591-610.
- Hajer GR, van Haeften TW, Visseren FL. Adipose tissue dysfunction in obesity, diabetes, and vascular diseases. *Eur Heart J.* 2008;29:2959–2971.
- Halbach, OVB. Nitric oxide imaging in living neuronal tissues using fluorescent probes. *Nitric Oxide.* 2003;9:217-28.

- Heyninck K, Beyaert R. Crosstalk between NF-kappaB-activating and apoptosis-inducing proteins of the TNF-receptor complex. *Mol Cell Biol Res Commun*. 2001; Sep;4(5):259-65.
- Hipólito UV, Rocha JT, Martins-Oliveira A *et al*. Chronic ethanol consumption reduces adrenomedullin-induced relaxation in the isolated rat aorta. *Alcohol*. 2011;45(8):805-14.
- Husain K, Ferder L, Ansari RA, Lalla J. Chronic ethanol ingestion induces aortic inflammation/oxidative endothelial injury and hypertension in rats. *Hum Exp Toxicol*. 2011. Aug;30(8):930-9.
- Husain K, Mejia J, Lalla J, Kazim S. Dose response of alcohol-induced alterations in BP, nitric oxide and antioxidants in rat plasma. *Pharmacol Res*. 2005; 51:337-43.
- Husain K, Mejia J, Lalla J, Kazim S. Time response of alcohol-induced alterations in blood pressure, nitric oxide and oxidant to antioxidant balance in the plasma of rats. *Experimental and clinical cardiology*. 2004;9(4):229-34.
- Husain K, Vazquez M, Ansari RA, Malafa MP, Lalla J. Chronic alcohol-induced oxidative endothelial injury relates to angiotensin II levels in the rat. *Mol Cell Biochem*. 2008;307(1-2):51-8.
- I Diretriz Brasileira de Prevenção Cardiovascular. *Arq. Bras. Cardiol*. 2013, São Paulo, v. 101, n.6, Supl.2.
- Ignarro, L.J.; Biological actions and properties of endothelium-derived nitric oxide. *FASEB J*. 1989 Jan;3(1):31-6.
- Kachani AT, Brasiliano S, Hochgraf PB. The impact of alcohol consumption on weight gain. *Rev. psiquiatr. clín*. 2008;35(suppl.1). São Paulo.
- Ketonen J, Shi J, Martonen E, Mervaala E. Periadventitial adipose tissue promotes endothelial dysfunction via oxidative stress in diet-induced obese C57Bl/6 mice. *Circ J*. 2010;74(7):1479-87.
- Kim BJ, Hood BL, Aragon RA *et al*. Increased oxidation and degradation of cytosolic proteins in alcohol-exposed mouse liver and hepatoma cells. *Proteomics*. 2006;6:1250-60.
- Klatsky AL, Friedman GD, Armstrong MA. The relationships between alcoholic beverage use and other traits to blood pressure: a new Kaiser Permanente study. *Circulation*. 1986 Apr;73(4):628-36.
- Klatsky AL, Friedman GD, Siegelau AB, Gerard MJ. Alcohol consumption and blood pressure Kaiser-Permanente Multiphasic Health Examination data. *N Engl J Med*. 1977 May 26;296(21):1194-200.
- Klebanoff SJ. Myeloperoxidase: friend and foe. *J Leukoc Biol*. 2005 May;77(5):598-625.
- Koch O, Farré S, Leo M *et al*. Regulation of manganese superoxide dismutase (mnsod) in chronic experimental alcoholism: effects of vitamin esupplemented and -deficient diets. *Alcohol & Alcoholism*. 2000;35(2):159-63.

- Koch OR, Deleo ME, Borrello S, Palombini G, Galeotti T. Ethanol Treatment UpRegulates the Expression of Mitochondrial Manganese Superoxide Dismutase in Rat Liver. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1994; 201(3):1356-1365.
- Koken T, Gursoy F, Kahraman A. Long-term alcohol consumption increases pro-matrix metalloproteinase-9 levels via oxidative stress. *J Med Toxicol*. 2010;6(2):126-30.
- Lands WEM. A summary of the workshop "Alcohol and calories: a matter of balance". *Journal of Nutrition*. 1993;123:1338-1341.
- Lee RM, Bader M, Alenina N, Santos RA, Gao YJ, Lu C. Mas receptors in modulating relaxation induced by perivascular adipose tissue. *Life Sci*. 2011 Sep 26;89(13-14):467-72.
- Leite LN, do Vale GT, Simplicio JA, De Martinis BS, Carneiro FS, Tirapelli CR. Ethanol-induced erectile dysfunction and increased expression of pro-inflammatory proteins in the rat cavernosal smooth muscle are mediated by NADPH oxidase-derived reactive oxygen species. *Eur J Pharmacol*. 2017;804:82-93.
- Leite, LN *et al*. Ethanol consumption increases endothelin-1 expression and reactivity in the rat cavernosal smooth muscle. *Alcohol Alcohol*. 2013;48(6):657-66.
- Li H, Horke L, Forstermann U. Oxidative stress in vascular disease and its pharmacological prevention. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2013 Jul;34(6):313-9.
- Lian, C. L'alcoolisme, cause d'hypertension arterielle. *Bull. Acad. Natl. Med. (Paris)*. 1915;74,525-28.
- Lieber CS. Perspectives: do alcohol calories count? *American Journal of Clinical Nutrition*. 1991;54: 976-982.
- Limuro Y, Gallucci RM, Luster MI, Kono H, Thurman RG. Antibodies to tumor necrosis factor alfa attenuate hepatic necrosis and inflammation caused by chronic exposure to ethanol in the rat. *Hepatology*. 1997 Dec;26(6):1530-7.
- Lin HZ, Yang SQ, Zeldin G, Diehl AM. Chronic ethanol consumption induces the production of tumor necrosis factor-alpha and related cytokines in liver and adipose tissue. *Alcohol Clin Exp Res*. 1998;22(5 Suppl):231S-237S.
- Löhn M, Dubrovská G, Lauterbach B, Luft FC, Gollasch M, Sharma AM. Periadventitial fat releases a vascular relaxing factor. *FASEB J*. 2002;16:1057-1063.
- Lv X, Chen Z, Li J, Zhang L, Liu H, Huang C, Zhu P. Caffeine protects against alcoholic liver injury by attenuating inflammatory response and oxidative stress. *Inflamm Res*. 2010;59(8):635-45.
- MacMahon S. Alcohol consumption and hypertension. *Hypertension*. 1987;9(2):111-21.
- MacNaul K L, Hutchinson N I. Differential expression of iNOS and cNOS mRNA in human vascular smooth muscle cells and endothelial cells under normal and inflammatory conditions. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 1993;196:1330-1334.

- Mandrekar P, Bala S, Catalano D, Kodys K, and Szabo G. The opposite effects of acute and chronic alcohol on lipopolysaccharide-induced inflammation are linked to IRAK-M in human monocytes. *J Immunol*. 2009;183:1320-1327.
- Marchi KC, Ceron CS, Muniz JJ, De Martinis BS, Tanus-Santos JE, Tirapelli CR. NADPH Oxidase Plays a Role on Ethanol-Induced Hypertension and Reactive Oxygen Species Generation in the Vasculature. *Alcohol Alcohol*. 2016 Sep;51(5):522-34.
- Mathews JD. Alcohol usage a possible explanation for the socio-economic and occupational differentials in mortality from hypertension and coronary heart disease in England and Wales. *Aust. NZ J Med*. 1976; 6:393-7.
- Mcintyre M, Bohr DF, Dominiczak AF. Endothelial function in hypertension. The role of superoxide anion. *Hypertension*. 1999;34:539-45.
- Miao CY, Li ZY. The role of perivascular adipose tissue in vascular smooth muscle cell growth. *Br J Pharmacol*. 2011 Feb;165(3):643-58.
- Milon H, Froment A, Gaspard P, Guidollet J, Ripoll JP. Alcohol consumption and blood pressure in a French epidemiological study. *Eur Heart J*. 1982 Oct;3 Suppl C:59-64.
- Moe KT, Aulia S, Jiang F, *et al*. Differential upregulation of Nox homologues of NADPH oxidase by tumor necrosis factor- α in human aortic smooth muscle and embryonic kidney cells. *J Cell Mol Med*. 2006;10:231-239.
- Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev*. 1991 Jun;43(2):109-42.
- Montezano AC, Touyz RM. Oxidative stress, Noxs, and hypertension: experimental evidence and clinical controversies. *Ann Med*. 2012 Jun;44(Suppl 1):S2-16.
- Morgan MJ, Kim YS, Liu Z. Lipid rafts and oxidative stress induced cell death. *Antioxid Redox Signal* 2007;9:1471-1483.
- Morgan MJ, Kim YS, Liu ZG. TNF- α and reactive oxygen species in necrotic cell death. *Cell Res*. 2008 Mar;18(3):343-9.
- Murphy MP, Holmgren A, Larsson NG *et al*. Unraveling the biological roles of reactive oxygen species. *Cell Metab*. 2011;13(4):361-66.
- Nakamura M, Yoshida H, Arakawa N, Saitoh S, Satoh M, Hiramori K. Effects of tumor necrosis factor- α on basal and stimulated endothelium-dependent vasomotion in human resistance vessel. *J. Cardiovasc. Pharmacol*. 2000;36:487-92.
- Onyema OO, Farombi EO, Emerole GO, Ukoha AI, Onyeze GO. Effect of vitamin E on monosodium glutamate induced hepatotoxicity and oxidative stress in rats. *Indian J Biochem Biophys*. 2006;43:20-4.
- Organização Mundial da Saúde (OMS). Global status report on alcohol and health. Geneva: World Health Organization, 2011.

Organização Mundial da Saúde (OMS). Global status report on alcohol and health. Geneva: World Health Organization; 2014.

Organização Mundial da Saúde (OMS). Measure your blood pressure, reduce your risk. Geneva, World Health Organization, 2013.

Oriowo MA. Perivascular Adipose Tissue, Vascular Reactivity and Hypertension. *Med Princ Pract*. 2015;24(Suppl 1):29-37.

Pagano PJ, Ito Y, Tornheim K, Gallop PM, Tauber AI, Cohen RA. An NADPH oxidase superoxide-generating system in the rabbit aorta. *Am J Physiol*. 1995 Jun;268(6 Pt 2):H2274-80.

Panieri E, Santoro MM. ROS signaling and redox biology in endothelial cells. *Cell Mol Life Sci*. 2015;72(17):3281-303.

Paravicini TM, Touyz RM. NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities. *Diabetes Care*. 2008 Feb;31(Suppl 2):S170-80.

Park YM, Park MY, Suh Y, Park JB. NADPH oxidase inhibitor prevents blood pressure elevation and cardiovascular hypertrophy in aldosterone-infused rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2004;313:812-7.

Passaglia P, Ceron CS, Mecawi AS, Antunes-Rodrigues J, Coelho EB, Tirapelli CR. Angiotensin type 1 receptor mediates chronic ethanol consumption-induced hypertension and vascular oxidative stress. *Vascul Pharmacol*. 2015 Apr;11: S1537-1891.

Picchi A, Gao X, Belmadani S *et al*. Tumor necrosis factor-alpha induces endothelial dysfunction in the prediabetic metabolic syndrome. *Circ Res*. 2006 Jul7;99(1):69-77.

Popolo A, Autore G, Pinto A, Marzocco S. Oxidative stress in patients with cardiovascular disease and chronic renal failure. *Free Radical Research*. 2013 May;47(5):346-356.

Resstel LB, Tirapelli CR, Lanchote VL, Uyemura SA, de Oliveira AM, Correa FM. Chronic ethanol consumption alters cardiovascular functions in conscious rats. *Life Sci*. 2006 Apr 4;78(19):2179-87.

Rocha JT *et al*. Ethanol induces vascular relaxation via redox-sensitive and nitric oxide-dependent pathways. *Vascul Pharmacol*. 2012;56(1-2):74-83.

Rubany GM, Vanhoutte PM. Superoxide anions and hyperoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor. *Am J Physiol*. 1986;250:H822-7.

Schieber M, Chandel NS. ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Curr Biol* 2014;CB 24(10):R453–R462.

Schisler NJ, Singh SM. Effect of ethanol in vivo on enzymes which detoxify oxygen free radicals. *Free Radic Biol Med*. 1989;7(2):117-23.

Schlörff Ec, Husain K, Somani Sm. Dose- and time-dependent effects of ethanol on plasma antioxidant system in rat. *Alcohol*. 1999;17(2):97-105.

- Schreck R, Albermann K et al., Nuclear factor kappa β : na oxidative stress-responsive transcription factor of eukaryotic cells (a review). *Free Rad Res Commun*. 1992;17(4):221-37.
- Scott, R.B., Reddy, K.S., Husain, K., Somani, S.M. Time course response to ethanol of hepatic antioxidant system and cytochrome P450 II E1 in rat. *Environ. Nutr. Interac*. 1999;3:217-31.
- Secretaria Nacional Antidrogas (SENAD). Prevenção ao uso indevido de drogas. Brasília: Secretaria Nacional Antidrogas; 2011.
- Segawa S, Wakita Y, Hirata H, Watari J. Oral administration of heat-killed *Lactobacillus brevis* SBC8803 ameliorates alcoholic liver disease in ethanol-containing diet-fed C57BL/6N mice. *Int J Food Microbiol*. 2008;128(2):371-7.
- SENAD - Secretaria Nacional Antidrogas - I Levantamento Nacional sobre os padrões de consumo de álcool na população brasileira. Brasília, 2007.
- Simplicio JA, Resstel LB, Tirapelli DP, D'Orléans-Juste P, Tirapelli CR. Contribution of oxidative stress and prostanoids in endothelial dysfunction induced by chronic fluoxetine treatment. *Vascul Pharmacol*. 2015;73:124-37.
- Simplicio JA, Vale GT, Gonzaga NA, *et al.* Reactive oxygen species derived from NAD(P)H oxidase play a role on ethanol-induced hypertension and endothelial dysfunction in rat resistance arteries. *J Physiol Biochem*. 2017 Feb;73(1):5-16.
- Singh K, Ahluwalia P. Effect of monosodium glutamate on lipid peroxidation and certain antioxidant enzymes in cardiac tissue of alcoholic adult male mice. *J Cardiovasc Dis Res*. 2012;3(1):12-8.
- Singh K, Kaur J, Ahluwalia P, Sharma J. Effect of monosodium glutamate on various lipid fractions and certain antioxidant enzymes in arterial tissue of chronic alcoholic adult male mice. *Toxicol Int*. 2012;19(1):9-14.
- Skliros EA, Papadodima SA, Sotiropoulos A, Xipnitos C, Kollias A, Spiliopoulou CA. Relationship between alcohol consumption and control of hypertension among elderly Greeks. The Nemea primary care study. *Hellenic J Cardiol*. 2012 Jan-Feb;53(1):26-32.
- Soltis EE, Cassis LA: Influence of perivascular adipose tissue on rat aortic smooth muscle responsiveness. *Clin Exp Hypertens A*. 1991;13:277-96.
- Sprague AH, Khalil RA. Inflammatory cytokines in vascular dysfunction and vascular disease. *Biochem Pharmacol*. 2009;78:539-552.
- Stewart CW, Kennedy RH. Effects of chronic ethanol consumption on aortic constriction in male and female rats. *Eur J Pharmacol*. 1999;366:55-60.
- Strickland JA, Wooles WR. Effect of acute and chronic ethanol on the agonist responses of vascular smooth muscle. *Eur. J. Pharmacol*. 1988;152:83-91.
- Szasz T, Webb RC. Perivascular adipose tissue: more than just structural support. *Clin Sci (Lond)*. 2012;122:1-12.

- Tanabe K, Matsushima-Nishiwaki R, Yamaguchi S, Iida H, Dohi S, Kozawa O. Mechanisms of tumor necrosis factor-alpha-induced interleukin-6 synthesis in glioma cells. *J Neuroinflammation* 2010;7:16.
- Tajima M, Kurashima Y, Sugiyama K, Ogura T, Sakagami H. The redox state of glutathione regulates the hypoxic induction of HIF-1. *Eur J Pharmacol.* 2009 Mar;606(1-3):45-9.
- Tirapelli CR, Al-Khoury J, Bkaily G *et al.* Chronic ethanol consumption enhances phenylephrine-induced contraction in the isolated rat aorta. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006a Jan;316(1):233-41.
- Tirapelli CR, Casolari DA, Montezano AC *et al.* Ethanol consumption enhances endothelin-1-induced contraction in the isolated rat carotid. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006b Aug;318(2):819-27.
- Tirapelli CR, Leone A, Coelho EB *et al.* Effect of ethanol consumption on blood pressure and rat mesenteric arterial bed, aorta and carotid responsiveness. *J Pharm Pharmacol.* 2007;59(7):985-93.
- Tirapelli CR, Leone A, Yogi A, Tostes RC *et al.* Ethanol consumption increases blood pressure and alters the vascular responsiveness of the perfused mesenteric bed. *J Pharm Pharmacol.* 2008;60:331-41.
- Tousoulis D, Simopoulou C, Papageorgiou N *et al.* C. Endothelial dysfunction in conduit arteries and in microcirculation. Novel therapeutic approaches. *Pharmacol Ther.* 2014;144(3):253-67.
- Touyz RM, Briones AM. Reactive oxygen species and vascular biology: implications in human hypertension. *Hypertension Research.* 2011;34:5-14.
- Touyz RM, Briones AM. Reactive oxygen species and vascular biology: implications in human hypertension. *Hypertens Res.* 2011 Jan;34(1):5-14.
- Traish AM, Palmer MS, Goldstein I, Moreland RB. Expression of functional muscarinic acetylcholine receptor subtypes in human corpus cavernosum and in cultured smooth muscle cells. *Receptor.* 1995 Fall; 5(3):159-76.
- Urso, T., Gavalier, J.S., Van Thiel, D.H. Blood ethanol levels in sober alcohol users seen in an emergency room. *Life Sci.* 1981;28:1053-56.
- Utkan T, Yildiz F, Ilibay G *et al.* Blood pressure and vascular reactivity to endothelin-1, phenylephrine, serotonin and acetylcholine following chronic alcohol consumption in vitro. *Science Fund. Clin. Pharmacol.* 2001;15:157-65.
- Vander AJ. Chronic effects of lead on the renin-angiotensin system. *Environ Health Perspect.* 1988 Jun;78:77-83.
- Verlohren S, Dubrovskaya G, Tsang SY *et al.* Visceral periaortic adipose tissue regulates arterial tone of mesenteric arteries. *Hypertension.* 2004 Sep;44(3):271-6.
- VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. *Arq. Bras. Cardiol.* 2010, São Paulo, v. 95, n. 1.

- VII Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial. Arq. Bras. Cardiol. 2016, São Paulo, v. 107, n.3, Supl.3.
- Wilsnack R, Wilsnack SC. Gender and alcohol: individual and social perspectives. Rutgers Center of Alcohol Studies: New Brunswick, New Jersey, EUA. 1997;504.
- Wojcicka G, Jamroz-Wisniewska A, Atanasova P, Chaldakov GN, Chylinska-Kula B, Beltowski J. Differential effects of statins on endogenous H₂S formation in perivascular adipose tissue. Pharmacol Res. 2011 Jan;63(1):68-76.
- Wong GH, Goeddel DV. Induction of manganous superoxide dismutase by tumor necrosis factor: possible protective mechanism. Science 1988;242(4880):941-4.
- Warner BB, Burhans MS, Clarck JC, Wispé JR. Tumor necrosis factor-alpha increases Mn-SOD expression: protection against oxidant injury. Am J Physiol. 1991;260(4 Pt 1):L296-301.
- Wong GH. Protective roles of cytokines against radiation: induction of mitochondrial MnSOD. Biochim Biophys Acta. 1995;1271(1):205-9.
- Yazdanpanah B, Wiegmann K, Tchikov V *et al.* Riboflavin kinase couples TNF receptor 1 to NADPH oxidase. Nature. 2009 Aug 27;460(7259):1159-63.
- Yeligar SM, Harris FL, Hart CM, Brown LA. Ethanol induces oxidative stress in alveolar macrophages via upregulation of NADPH oxidases. J Immunol. 2012;188(8):3648-57.
- Yeomans, M.R. - Effects of alcohol on food and energy in human subjects: evidence for passive and active over consumption of energy. Br J Nutr. 2004;92(suppl 1):S31-34.
- Yeomans, M.R.; Caton, S.; Hetherington, M.M. Alcohol and food intake. Curr Opin Clin Nutr Metab Care. 2003;6(6):639-44.
- Yin M, Wheeler MD, Kono H *et al.* Essential role of tumor necrosis factor alpha in alcohol-induced liver injury in mice. Gastroenterology. 1999;117(4):942-52.
- Yogi A, Callera GE, Hipólito UV, Silva CR, Touyz RM, Tirapelli CR. Ethanol -induced vasoconstriction is mediated via redox-sensitive, cyclooxygenase-dependent mechanisms. Clin Sci (Lond). 2010 Mar 9;118(11):657-68.
- Yogi A, Callera GE, Mecawi AS, *et al.* Acute ethanol intake induces superoxide anion generation and mitogen-activated protein kinase phosphorylation in rat aorta: a role for angiotensin type 1 receptor. Toxicol Appl Pharmacol. 2012;264(3):470-8.
- Zhang C, Xu X, Potter BJ, Wang W, Kuo L, Michael L, *et al.* TNF-alpha contributes to endothelial dysfunction in ischemia/reperfusion injury. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2006 Mar;26(3):475-80.
- Zhang H, Park Y, Wu J, Chen X, Lee S, Yang J, Dellsperger KC, Zhang C. Role of TNF-alpha in vascular dysfunction. Clin Sci (Lond). 2009;116(3):219-30.

ANEXO

ANEXO A – Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Campus de Ribeirão Preto
Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho (Protocolo nº 12.1.1654.53.9), intitulado "Participação do TNF- α nas Disfunções Cardiovasculares Induzidas pelo Consumo Crônico de Etanol", de autoria de **Carlos Renato Tirapelli**, por estar de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotado pela **Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)** do *Campus* de Ribeirão Preto – USP foi aprovado em reunião da CEUA de 07.02.2013.

Colaborador: Thiago Mattar Cunha

This is to certify that the work (Protocol number 12.1.1654.53.9), entitled: "Participação do TNF- α nas Disfunções Cardiovasculares Induzidas pelo Consumo Crônico de Etanol", by **Carlos Renato Tirapelli**, is in accordance with the Ethic Principles in Animal Experimentation adopted by Ethic Commission for the Use of Animals (CEUA) of the *Campus* of Ribeirão Preto – USP, and was approved in the meeting, February, 07 2013.

Ribeirão Preto, 20 de fevereiro de 2013.

Presidente da CEUA
Profa. Dra. Claudia Maria Padovan

Secretária da CEUA
Maria Angélica Depiro